

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

ANA PAULA BAIONI TORRE

Síntese e Caracterização de
Nanopartículas de Hexacianoferrato de Cobre
e sua Aplicação em
Biossensores de Glicose e
Eletrodos Eletrocrômicos

São Paulo
06/09/2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANA PAULA BAIONI TORRE

**Síntese e Caracterização de
Nanoapartículas de Hexacianoferrato de Cobre e sua
Aplicação em Biossensores de Glicose e Eletrodos
Eletrocrômicos**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em
Química (Físico-Química)*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Susana I. Córdoba de Torresi

São Paulo

2006

Ana Paula Baioni Torre

Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Hexacianoferrato de Cobre e sua Aplicação em Biossensores de Glicose e Eletrodos Eletrocrômios

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre/Doutor em

.....

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Dedico ao meu
companheiro Pedro
e aos meus pais
Zesete e Édna*

AGRADECIMENTOS

Muitas foram as pessoas que contribuíram de forma significativa para que a presente dissertação se concretizasse.

À família LME. Aos Professores Roberto Manuel de Torresi e Susana I. Córdoba de Torresi que, à frente do grupo, conseguem sempre manter a harmonia e a produtividade, transmitindo sempre bons ensinamentos aos seus discípulos. Em especial, à Prof^a Susana I. Córdoba de Torresi pelas críticas construtivas, pela paciência e boa vontade. Aos amigos do laboratório, Gisela, Leonardo, Mariana, Marcelo, Rosângela, Simone, Suelen, Tânia, Vinícius, Renan, Bárbara, Lírian, Luís, Wendel, Fernanda e Eduardo pelo apoio e suporte técnico e científico pela agradável convivência. Aos amigos Pablo e Marcio que participaram de forma direta para a realização do projeto.

Aos funcionários do IQ-USP.

Gostaria de expressar também a minha imensa gratidão ao meu amigo e companheiro Pedro pelo carinho, compreensão e boa vontade. Aos meus pais que sempre priorizaram os meus estudos. E também à minha sogra Eliana pela amizade e pelos agradáveis finais de semana em sua casa.

À agência financiadora CAPES, sem a qual este trabalho não seria possível.

RESUMO

Torre, A. A. B. **Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Hexacianoferrato de Cobre e sua Aplicação em Biossensores de Glicose e Eletrodos Eletrocrômicos**. 2007. 108p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Neste trabalho, reportamos a síntese sonoquímica e a caracterização de nanopartículas de hexacianoferrato de cobre para a fabricação de filmes ultrafinos com espessura controlada. Aproveitando-se da sua estrutura nanométrica e do excesso de carga superficial negativa, os métodos de imobilização propostos foram a deposição eletrostática camada por camada (LBL), utilizando-se o PAH como polieletrólito positivo (hidroclorato de polialilamina); e a deposição eletroforética que utiliza um campo elétrico para que partículas carregadas em suspensão sejam atraídas para a superfície do eletrodo. Os eletrodos modificados pelas nanopartículas de hexacianoferrato de cobre foram estudados com respeito às suas propriedades eletrocatalíticas e eletrocrômicas. O hexacianoferrato de cobre (HexFeCu) possui algumas características interessantes como a oxidação eletrocatalítica do peróxido de hidrogênio a baixos potenciais e com a vantagem de ser eletroativo em meios contendo Na⁺. A utilização desse composto estruturado nanometricamente proporciona ainda uma grande área superficial podendo acentuar suas características eletrocatalíticas. Além da aplicação em biossensores amperométricos, também foi possível a sua utilização em dispositivos eletrocrômicos, ao se perceber que o material mudava de cor ao ser reduzido ou oxidado, demonstrando alta reversibilidade, durabilidade eletrocrômica além de uma boa aderência das camadas de nanopartículas eletrostaticamente depositadas ao substrato de ITO.

Palavras-chave: hexacianoferrato de cobre, nanopartículas, biossensores, dispositivos eletrocrômicos

ABSTRACT

Torre, A. P. B. **Synthesis and characterization of copper hexacyanoferrate nanoparticles and its application in Glucose Biosensor and electrochromic electrodes.** 2007. 108p. Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In this work, the sonochemical synthesis and the characterization of copper hexacyanoferrate nanoparticles for producing ultra thin films with controlled thickness is reported. Due to its nanometric structure and the excess of superficial negative charges, the proposed immobilization methods were the electrostatic deposition layer by layer (LBL), using the PAH as a positive polyelectrolyte Poly(allylamine hydrochloride) and the electrophoretic deposition which uses an electric field in order to attract the charged particles to the electrode surface. The study of the electrodes modified by the copper hexacyanoferrate nanoparticles was focused in its electrocatalytic and electrochromic properties. Copper hexacyanoferrate (HexFeCu) presents some interesting properties like the electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at low potential conditions with the advantage of being electroactive in media containing Na^+ . The utilization of this nanometrically-structured compound provides a very large surface area, enhancing its catalytic properties. Besides its use in amperometric biosensors, it was also possible its use in electrochromic devices because color changes observed during redox cycles, demonstrating high reversibility, electrochromic durability and due to high adherence of nanoparticles to the ITO electrode.

Keywords: copper hexacyanoferrate, nanoparticles, biosensors, electrochromic dispositives

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da evolução histórica dos materiais	16
Figura 2: Efeito da diminuição de tamanho de um material massivo: o volume se mantém constante, mas a área superficial se multiplicou.	20
Figura 3: Representação de um biossensor.....	25
Figura 4: Representação esquemática do funcionamento de um biossensor amperométrico	28
Figura 5: Representação esquemática de um biossensor amperométrico baseado em azul da prússia	30
Figura 6: Ilustração dos canais de azul da prússia e a impossibilidade de íons hidratados de Na^+ entrarem por entre seus canais	32
Figura 7: (a) Estrutura cúbica do hexacianoferrato de cobre; (b) Visão frontal da estrutura mostrando a coordenação dos átomos de Cu por átomos de N e dos átomos de Fe por átomos de C.....	34
Figura 8: Exemplos de janelas electrocrômicas que mudam o contraste óptico de acordo com o potencial aplicado.....	35
Figura 9: Célula electroquímica contendo um electrodo modificado por azul da prússia. Quando o material está no seu estado oxidado apresenta a coloração azul e quando é reduzido torna-se incolor.....	39
Figura 10: Representação esquemática da síntese ultrasônica das nanopartículas.....	43
Figura 11: Estrutura do polímero PAH	43
Figura 12: Foto do equipamento utilizado para construir as bicamadas de HexFeCu e PAH.....	44
Figura 13: A cavitação acústica e a síntese de materiais nanoestruturados	52

Figura 14: HRTM das nanopartículas de hexacianoferrato de cobre obtidas com ultra-som.....	53
Figura 15: Difratoograma do HexFeCu sintetizado via ultra-som.....	54
Figura 16: Espectroscopia Raman ($\lambda = 632,8$) do HexFeCu.....	57
Figura 17: MEV de um filme automontado de nanopartículas de hexfecu / PAH cuja camada superficial é constituída por PAH.....	59
Figura 18: Voltamograma cíclico com um filme de HexFeCu de 5 bicamadas em KCl 0,1M, pH 3,6 e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$	61
Figura 19: VC de um filme de HexFeCu de 25 bicamadas (A) e de um filme de AP eletrodepositado (B) em 0,1M de KCl e em 0,1M de NaCl; pH = 3,6.	63
Figura 20: Voltamogramas cíclicos com o filme de HexFeCu. Eletrólito de suporte: KCl (0,1M)+ HCl pH 3. Eletrodo de referência Ag/AgCl <i>sat.</i> Contra-eletrodo de Pt.	64
Figura 21: Relação entre carga e número de bicamadas.....	65
Figura 22: VC de um filme de Hexfecu immobilizado através da deposição eletroforética (1h de deposição, 2 V cm^{-1}).	66
Figura 23: Efeito do tempo de deposição.....	67
Figura 24: Espectros de absorção “in situ” de um eletrodo modificado por HexFeCu, 10 bicamadas. Utilizando Pt como contra-eletrodo e Ag/AgCl como referência. Eletrólito KCl 0,1 M / pH 3.	69
Figura 25: Voltamogramas “in situ” de eletrodos modificados por diferentes números de bicamadas de HexFeCu. Eletrólito KCl 0,1 M, pH 3. Utilizando Pt como contra-eletrodo e Ag/AgCl como referência, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$	70

Figura 26: Voltamogramas “in situ” de eletrodos modificados por azul da prussia eletrodepositado. Eletrólito KCl 0,1 M, pH 3, Ag/AgCl como referência, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$	71
Figura 27: Perfis de(-▲-) i/E e de (-○-) $d\%A/dt/dE$ para um eletrodo modificado por 20 bicamadas.....	72
Figura 28: Tempos de resposta para eletrodos modificados com diferentes números de bicamadas. Para a descoloração foi aplicado um potencial de 1,2 V e para a descoloração -0,2 V, utilizando Ag/AgCl como referência e Pt como contra eletrodo. Eletrólito KCl 0,1 M - pH 3.....	73
Figura 29: Testes de durabilidade dos eletrodos modificados por (a) 15 e (b) 20 e 25 (c) bicamadas.....	76
Figura 30: Resposta amperométrica para H_2O_2 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em um eletrodo de ITO modificado com 30 bicamadas de nanopartículas de Hexfecu e PAH, em solução de KCl (0,1M) e HCl, pH = 3,6.	79
Figura 31: Variação da sensibilidade em função do número de bicamadas	80
Figura 32: Arquitetura de imobilização das nanopartículas e da enzima glicose oxidase.....	81
Figura 33: Detecção amperométrica de glicose em um eletrodo de 20 bic. de nanopartículas e 5 bicamadas de enzima. Solução de KCl (0,1M) e HCl, pH = 7,0 a 0,0V.....	82
Figura 34: Detecção amperométrica de glicose para um eletrodo com 10 bic. de Hexfecu e 9 de enzima.....	83
Figura 35: Arquitetura alternada de deposição das nanopartículas de Hexfecu e da enzima glicose oxidase	85

Figura 36: Detecção amperométrica de glicose para um eletrodo com 10 bic de Hexfecu e 5 bic de enzima dispostos alternadamente. Solução de KCl (0,1M) e HCl, pH = 7,0 a 0,0V	86
Figura 37: Detecção amperométrica de glicose para um eletrodo com 10 bic de HexFeCu + enzima pelo método crosslinking. Solução de KCl (0,1M), pH = 7,0 a 0,0V.....	87
Figura 38: Detecção amperométrica de glicose para um eletrodo com 3h de deposição eletroforética de Hexfecu + enzima pelo método crosslinking. Solução de KCl (0,1M), pH = 7,0 a 0,0V.	89
Figura 39: Curva de sensibilidade para um eletrodo com 16 bicamadas de Hexfecu/PAH + enzima pelo método crosslinking. Solução de NaCl (0,1M), pH = 7,0 a 0,0V.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise elementar de 0,026g do pó do hexacianoferrato de cobre	55
Tabela 2: Sensibilidades para os biossensores de glicose	82
Tabela 3: Sensibilidades para os biossensores de glicose	88
Tabela 4: Sensibilidades para os biossensores de glicose (EPD).....	90
Tabela 5: Durabilidade (método crosslonking I)	93
Tabela 6: Durabilidade (método LBL).....	94
Tabela 7: Durabilidade (método crosslinking II)	94

LISTA DE ABREVIATURAS

AOT: Aerosol – OT (di-2-ethyl-1-hexyl sulfosuccinate)

AP: Azul da Prússia

BP: Branco da Prússia

BSA: Bovine serum albumin (soro de albumina bovina)

CNTs: Carbon Nanotubes (nanotubos de carbono)

EPD: Electrophoretic Deposition (deposição eletroforética)

Gox: Glicose Oxidase

HexFeCu: Hexacianoferrato de Cobre

HRTEM: High Resolution Transmission Electron Microscopy (microscopia eletrônica de alta resolução)

ICP: Inductively coupled plasma emission spectroscopy

ITO: Indium Tin Oxide (óxido de Índio dopado com estanho)

LBL: Layer by Layer (deposição eletrostática camada por camada)

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

PAH: Hidrocloro de Polialilamina

PAMAM: Poliamidoamina

RPM: Rotações por Minuto

U.V.: Ultravioleta

VC: Voltametria Cíclica

VB: Verde de Berlim

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. NANOMATERIAIS	15
1.2. NANOPARTÍCULAS: PROPRIEDADES, SÍNTESE E IMOBILIZAÇÃO.	18
1.3. APLICAÇÕES	24
1.3.1. <i>Biossensores</i>	24
1.3.1.1. Tipos de Biossensores	26
1.3.1.2. Mediadores: Análogos do Azul da Prússia.....	30
1.3.2. <i>Dispositivos eletrocrômicos</i>	35
2. OBJETIVOS	41
3. PARTE EXPERIMENTAL	42
3.1. REAGENTES	42
3.2. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE HEXACIANOFERRATO DE COBRE	42
3.3. IMOBILIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	43
3.4. EXPERIMENTOS ESPECTROELETROQUÍMICOS	45
3.5. DETECÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	45
3.6. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA	46
3.7. DETECÇÃO DE GLICOSE	46
3.8. TÉCNICAS E INSTRUMENTAÇÃO	47
4. RESULTADOS	50
4.1. NANOPARTÍCULAS DE HEXACIANOFERRATO DE COBRE	50
4.1.1. <i>A síntese sonoquímica</i>	50
4.1.2. <i>Caracterização das nanopartículas</i>	53
4.2. IMOBILIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	57
4.2.1. <i>Caracterização Eletroquímica do Filme</i>	61
4.2.1.1. Imobilização por LBL	61
4.2.1.2. Imobilizaçã por EPD	66
4.3. DISPOSITIVOS ELETROCRÔMICOS	68
4.4. BIOSSENSORES DE GLICOSE.....	78

4.4.1.	<i>Detecção de Peróxido de Hidrogênio</i>	78
4.4.2.	<i>Detecção de Glicose</i>	80
4.4.2.1.	Método de Imobilização LBL	81
4.4.2.2.	Método de imobilização crosslinking	86
4.4.3.	<i>Detecção de glicose em meio contendo Na⁺</i>	91
4.4.4.	<i>Testes de Durabilidade</i>	92
5.	CONCLUSÕES	96
6.	REFERÊNCIAS	98

1. Introdução

1.1. Nanomateriais

A relação entre o homem e os materiais é bastante antiga. Desde os primórdios da civilização, o homem vem transformando a natureza em busca de materiais que facilitassem seu cotidiano. Tãmanha foi a influência do desenvolvimento dos materiais em nosso cotidiano que vários períodos históricos receberam nomes como “Idade da pedra”, “Idade do bronze”, “Idade do ferro”, etc.

Desde então, a intensificação dos conhecimentos em ciência e tecnologia permitiram um avanço exponencial na área dos materiais, descobrindo suas propriedades e limitações que possibilitaram novas maneiras de manipulação, processamento e fabricação.

A nanociência e a nanotecnologia surgem como uma evolução natural e em resposta a necessidade de superação e de melhora das propriedades desses materiais. Com o desenvolvimento do microscópio, que cada vez mais atinge uma maior resolução, como por exemplo, os microscópios de tunelamento e de varredura que conseguem ampliar objetos em mais de 10 milhões de vezes. Outras técnicas como a ressonância magnética nuclear e os raios-X, além da microscopia de força atômica possibilitaram a compreensão dos átomos e moléculas em seu nível organizacional, assim como a sua manipulação na escala atômica¹. A Figura 1 ilustra a evolução dos materiais.



Figura 1: Representação da evolução histórica dos materiais

Muitas são as definições encontradas para nanociência e nanotecnologia, tais como as reportadas pela Royal Society e pela Royal Academy of Engineering²: “Nanociência é o estudo do fenômeno e da manipulação de materiais nas escalas atômica, molecular e macromolecular, onde as propriedades diferem significativamente daquelas de maior escala” e “Nanotecnologias são o projeto, a caracterização, a produção e a aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas com controle de forma e tamanho na escala nanométrica”. Outras ainda são mais específicas: “Nanotecnologia é constituída de áreas da tecnologia onde dimensões e tolerâncias no intervalo de 0,1 nm a 10 nm possuem um papel fundamental”.

O conceito de nanomateriais foi introduzido há mais de 40 anos. O físico Richard Feynman explorou a possibilidade de manipulação de materiais na escala de átomos e moléculas individuais. Ele sugeriu em 1959 que os átomos poderiam ser organizados, conforme a necessidade, desde que não houvesse violações às leis da natureza e ainda mostrou que não havia razões físicas que impedissem a

fabricação de dispositivos por meio de átomos individuais³. De fato, os nanomateriais vem sendo utilizados há centenas de anos – a bela cor avermelhada encontrada em alguns tipos de vidro pode ser explicada pela presença de nanopartículas de ouro presas na matriz do vidro, o esmalte decorativo encontrado em algumas cerâmicas medievais contém nanopartículas metálicas nele dispersas. As técnicas utilizadas para produzir tais materiais eram consideradas segredos de comércio naquele tempo, e mesmo hoje não são completamente entendidas.

A contribuição de diversas áreas do conhecimento tais como física, química, biologia, medicina e engenharia, foi imprescindível para melhor compreender e adquirir habilidade de controlar a estrutura dos materiais em escala nanométrica, propiciando, desta forma, um enorme avanço na área e conseqüentemente uma grande variedade de aplicações compreendendo desde dispositivos eletrônicos extremamente pequenos a biodispositivos nanoestruturados.

A variedade de nanomateriais é muito grande. Poucos materiais foram alvos de tanta pesquisa como os nanotubos de carbono. Em 1985 Kroto e colaboradores⁴ surpreenderam ao sintetizar os fulerenos, onde a arquitetura dos carbonos sp^2 e dos defeitos topológicos fornecem as condições necessárias para que as camadas planas de grafite sejam fechadas. Tais sínteses incentivaram a busca de novas estruturas de carbono fechadas, quando em 1991, Sumio Iijima⁵ apresentou um novo tipo de estrutura finita de carbono, sintetizado de maneira similar ao método de síntese dos qual foi chamado de “nanotubos de carbono”. Os nanotubos de carbono são 100 mil vezes mais finos que um fio de cabelo, possuem alta resistência mecânica – não quebram nem deformam quando dobrados ou submetidos a alta pressão. Dependendo do seu arranjo de anéis hexagonais ao longo da superfície tubular, os CNTs podem ser condutores ou semicondutores⁶. Também são

excelentes condutores de calor. Devido às suas propriedades extraordinárias, podem ser candidatos a diversas aplicações nanotecnológicas⁷ que vão de sensores e biossensores a nanoeletrônicos, etc.

Os dendrímeros constituem outra classe de nanomateriais também bastante estudada. São originalmente conhecidos como moléculas cascata e foram sintetizados pela primeira vez acidentalmente por Tomalia⁸. Dendrímeros são macromoléculas monodispersas, altamente ramificadas, apresentando estruturas bem definidas e um peso molecular uniforme. Recentemente, tem sido utilizados como moldes para sintetizar nanopartículas metálicas. Essa é uma técnica inovadora, desenvolvida por Crooks e colaboradores⁹, em que íons metálicos são complexados no interior do dendrímero e com a adição de um forte redutor, aqueles são convertidos a metais com proporções nanométricas. Um exemplo, é a síntese de nanopartículas de ouro que utiliza o dendrímero Poliamidoamina (PAMAM) como molde e o H₂ ou o NaBH₄ como agentes redutores, permitindo um controle de tamanho e de composição das nanopartículas¹⁰. Essa mesma rota sintética tem sido utilizada para a síntese de uma grande variedade de nanopartículas mono ou bimetálicas, incluindo: Au, Ag, Cu, Pt, Pd, Rh e Ru¹¹.

1.2. Nanopartículas: Propriedades, Síntese e Imobilização.

Nanopartículas por definição são estruturas com diâmetro entre 1-100 nm. Por consequência dessa diminuição de tamanho apresentam propriedades físico-químicas totalmente diferentes dos materiais com proporções maiores. O grande interesse nesse tipo de material é justamente essa mudança de propriedades. Por exemplo, nanopartículas de dióxido de titânio¹² e de óxido de zinco¹³ se tornam

transparentes e são capazes de absorver e refletir radiação UV e portanto podem ser utilizados como protetores solares.

Existe uma gama de discussões envolvendo os fatores que causam mudanças significativas das propriedades intrínsecas dos nanomateriais em relação aos materiais massivos e que não são necessariamente previsíveis a partir do comportamento observável em escalas maiores. Este efeito compreende mudanças nas propriedades eletrônicas¹⁴ de materiais, principalmente os semicondutores, onde tais mudanças são mais evidenciadas.

No caso de materiais massivos, com um grande número de átomos, o que define se um material é condutor, semicondutor ou isolante é a diferença nas respectivas energias de GAP, ou seja, entre as bandas de condução e de valência. Deste modo quando um material é condutor, as duas bandas se encontram sobrepostas. Já para um material isolante, essa diferença é muito grande, não permitindo que os elétrons que se encontram na banda de valência passem para a banda de condução. Os materiais semicondutores possuem uma diferença intermediária entre as bandas de valência e de condução, permitindo que, em determinadas situações, os elétrons passem para a banda de condução. Quando um material é nanoestruturado, um pequeno número de átomos confinados na estrutura reticular do cristal faz com que sua estrutura atômica com níveis eletrônicos discretos (antes eram bandas) origine novos fenômenos como o supermagnetismo, mudanças nas propriedades ópticas¹⁵ e também mecânicas¹⁶.

Além disso, nanopartículas com geometria definida apresentam algumas vantagens em relação aos materiais massivos (bulk), como por exemplo, possuem alta relação superfície/volume, potencializando, portanto as propriedades intrínsecas do material governadas por efeitos de superfície. Em materiais massivos, a

quantidade de átomos que ficam em contato com a superfície externa é relativamente muito pequena. Quando materiais são reduzidos de tamanho, a área superficial aumenta e por consequência, os sítios ativos ficam mais expostos. As propriedades tais como níveis de energia, estrutura eletrônica e reatividade dos átomos externos do material são bastante diferentes das dos seus átomos internos, justamente pelo seu íntimo contato com a superfície. A Figura 2 ilustra o efeito da diminuição de tamanho na área superficial do material.

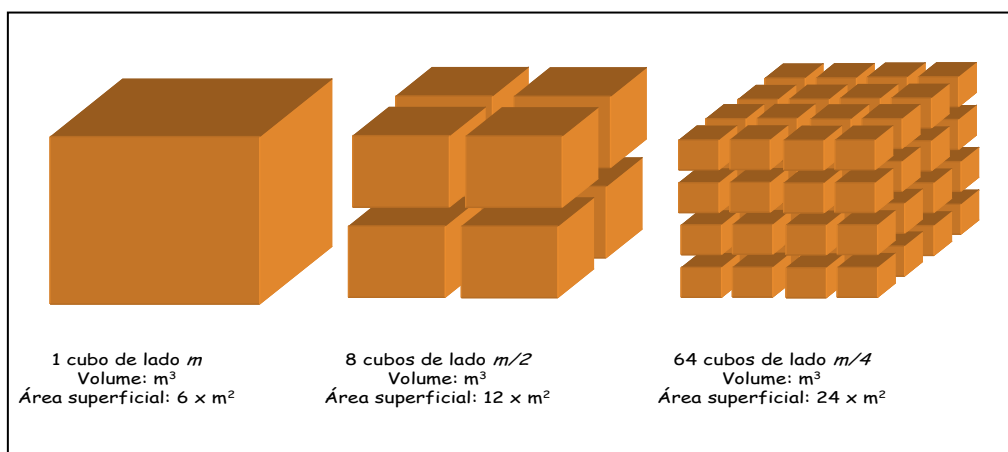


Figura 2: Efeito da diminuição de tamanho de um material massivo: o volume se mantém constante, mas a área superficial se multiplicou.

Nanopartículas metálicas tem também suas propriedades modificadas em relação ao metal massivo. Entretanto, as origens das propriedades de nanoescala dos metais são diferentes das encontradas para os semicondutores¹⁷. O ouro metálico com dimensões reduzidas para a escala nanométrica exibe propriedades muito diferentes, como por exemplo, a mudança de cor de amarelo para vermelho, roxo ou azul dependendo do tamanho¹⁸. No caso dos metais, essa mudança está relacionada com a oscilação de elétrons na banda de condução, mais conhecida como oscilação plasmônica¹⁹. Como o diâmetro das partículas é da ordem da

profundidade de penetração das ondas eletromagnéticas nos metais, a luz pode penetrar na partícula. O campo dentro da partícula desloca os elétrons da banda de condução com respeito às cargas positivas, gerando portanto, cargas opostas em lados opostos da partícula e conseqüentemente uma atração eletrostática entre as mesmas. Portanto, se a frequência de oscilação da luz entra em ressonância com frequência da oscilação coletiva de elétrons, mesmo um campo incidente de baixa intensidade pode provocar intensas oscilações. Além disso, a frequência da oscilação está relacionada com a separação de cargas e conseqüentemente com o tamanho das partículas, observando-se deste modo, alterações de cores quando o tamanho da partícula muda²⁰.

Para o ouro, essa oscilação se encontra geralmente na região visível do espectro. Devido às propriedades ópticas resultantes da diminuição de tamanho, as nanopartículas de metais nobres encontram muitas aplicações como em detectores ou em técnicas de imagem²¹.

Por outro lado, a diminuição de tamanho proporciona também ao ouro, um metal com características inertes, a possibilidade de atuar como catalisador²². Haruta e colaboradores demonstraram que nanopartículas de ouro apresentam alta atividade catalítica para a oxidação química e eletroquímica do monóxido de carbono e metanol²³.

A síntese dos nanomateriais é também um aspecto muito importante na ciência dos materiais. Consideráveis progressos na tentativa de solucionar problemas como a baixa cristalinidade, polidispersividade em tamanho e forma e defeitos eletrônicos de superfície, têm sido feitos ao longo dos anos.

De um modo geral, os métodos de síntese se dividem em métodos químicos e métodos físicos²⁴. Os físicos são conhecidos como *top down*, e vão da escala macro

para a micro, utilizando a quebra de partículas maiores através de processos físicos para que elas fiquem com tamanhos nanométricos. Exemplos desse tipo de síntese são a nanolitografia e a sonólise²⁴. Já os métodos químicos, conhecidos como *bottom up*, são baseados em reações químicas com a utilização de precursores moleculares ou atômicos, permitindo um maior controle sobre as características das nanopartículas que se deseja obter, além de serem mais simples e eficazes.

A síntese de materiais nanoestruturados muito tem em comum com a síntese dos materiais coloidais já que as nanopartículas obtidas em solução permanecem dispersas, representando uma forma de dispersão coloidal.

A maior parte das rotas sintéticas para produzir nanopartículas utiliza, para impedir o crescimento descontrolado das partículas, algumas moléculas estabilizantes que por efeito estérico impedem a aglomeração. Outra rota sintética é a utilização de partículas eletricamente carregadas, que por repulsão entre cargas não se aglomeram, evitando deste modo o crescimento. Uma terceira forma de impedir o crescimento é a separação temporal dos processos de nucleação e de crescimento. Se a nucleação é induzida por uma perturbação do sistema, como elevação da temperatura, e abaixamento repentino, a nucleação e o crescimento acontecem separadamente e darão origem a nanopartículas menores²⁵.

Existem diversas técnicas para a síntese de nanopartículas, das quais podem ser citados o processo sol-gel²⁶, o tratamento térmico de metais²⁷, o eletrospray²⁸, reações confinadas envolvendo micelas²⁹ ou dendrímeros⁹ e a síntese ultrassônica^{30,31} que, aliás, será abordada com mais detalhes na parte de discussão deste projeto. Existem na literatura muitos trabalhos reportando a síntese de nanopartículas de hexacianoferratos de metais de transição³²⁻³⁴. Nanopartículas de

hexacianoferrato de cobre, por exemplo, podem ser preparadas utilizando microemulsões de água em óleo (H₂O/AOT/*n*-heptano)³⁵.

A imobilização das nanopartículas em um substrato também é uma etapa muito importante na construção de dispositivos nanoestruturados. A grande dificuldade desta etapa é justamente incorporá-las junto ao substrato sem, no entanto, prejudicar o seu caráter nano, impedindo que se aglomerem e voltem ao estado massivo.

Existem várias técnicas de imobilização, algumas são técnicas químicas como a deposição química de vapor³⁶, envolvendo reações químicas e outras simplesmente físicas. Como métodos físicos pode-se citar a **deposição física de vapor**³⁷ onde os precursores da nanoestrutura desejada são vaporizados de diferentes formas e depositados num substrato de forma a originar o cristal desejado na qual estão apenas envolvidos processos físicos; **casting**³⁸ onde o material a ser depositado é dissolvido em um solvente e colocado sobre o substrato e depois evaporado para a formação do filme; **deposição eletroforética**³⁹ que consiste em aplicar um campo elétrico para que partículas carregadas em suspensão sejam atraídas para a superfície do eletrodo; **deposição eletrostática camada por camada**⁴⁰ mais conhecida como LBL (do inglês layer by layer), nesse método, nanopartículas e polieletrólitos com cargas opostas são depositados alternadamente sobre um eletrodo, através de atrações eletrostáticas, formando bicamadas consecutivas.

Os dois últimos métodos serão abordados nos tópicos de discussão por se tratar dos métodos utilizados no presente trabalho.

1.3. Aplicações

Os materiais baseados em hexacianoferratos de metais de transição têm encontrado aplicações em diversas áreas do conhecimento. Podem ser citadas aplicações⁴¹ em formação de fotoimagens, trocadores iônicos, sensores de íons, baterias, dispositivos fotomagnéticos, eletrocromismo, sensores e biossensores. Por se tratar do tema deste trabalho, nos próximos tópicos será dada uma abordagem mais detalhada sobre biossensores e dispositivos eletrocromáticos e a importância das nanopartículas de hexacianoferrato de cobre para tais fins.

1.3.1. Biossensores

Sensores químicos são dispositivos capazes de fornecer informações quanto à composição do meio em que operam, transformando uma informação química em sinal analítico. São constituídos por dois componentes básicos, um sistema de reconhecimento químico que promove a seletividade requerida para um determinado analito; e um sistema de transdução físico-químico que transforma o sinal analítico em sinal físico. Nos biossensores o sistema de reconhecimento químico é composto por um elemento biológico⁴². A Figura 3 a seguir mostra uma representação esquemática de um biossensor.

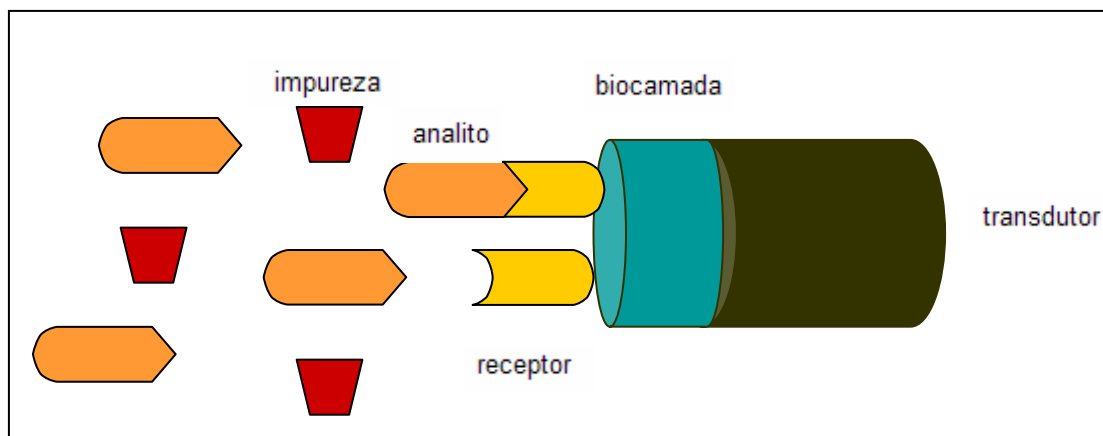


Figura 3: Representação de um biossensor

Os elementos de reconhecimento biológicos podem ser enzimas, células, organelas, anticorpos, antígenos ou tecidos⁴³. Dentre esses, os mais comumente empregados são as enzimas devido à possibilidade de poderem ser utilizadas em sua forma pura, interagirem com um substrato específico e a sua propriedade catalítica que promove a amplificação da resposta durante a transdução do sinal. As oxidases são as enzimas mais utilizadas, sendo o sinal produzido pela oxidação de peróxido de hidrogênio sobre o eletrodo, gerado como produto da reação enzimática⁴⁴.

Nos recentes anos, a combinação dos conhecimentos das áreas de eletroquímica, bioquímica, física e engenharia tornou possível produzir biossensores com alta especificidade, sensibilidade, acurácia, seletividade e confiança.

Os biossensores ficaram também mais compactos, simples para o uso, rápidos, com baixo consumo de reagente e com baixo custo; características as quais os tornam uma alternativa bastante atrativa às técnicas de análise para amostras biológicas convencionais. Oferecem também oportunidades de aplicação promissora

em diversos campos como na biomedicina, cuidados com a saúde, agricultura e veterinária.

O primeiro biossensor foi proposto em 1962 por Clarck e Lyons⁴⁵, que consistia em um eletrodo de monitoramento do consumo de oxigênio como um fina camada de enzima nele imobilizada. A partir de então, tem-se registrado um crescente interesse no desenvolvimento dessa área. Durante os anos 80, bastante atenção foi dada aos biossensores, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de biossensores de glicose de segunda geração⁴⁶ e à utilização de eletrodos modificados para incrementar o desempenho do sensor⁴⁷. Já nos anos 90, intensificou-se a busca por materiais os quais melhorassem a comunicação entre o centro redox da enzima e a superfície do eletrodo; e desde então, o interesse voltou-se para dispositivos subcutâneos minimamente invasivos⁴⁸, com aplicações clínicas potenciais para o monitoramento em tempo real e diagnósticos in vivo.

1.3.1.1. Tipos de Biossensores

Os biossensores podem ser classificados de acordo com a sua **especificidade biológica**, possuindo um elemento de reconhecimento biocatalítico (enzimas, células ou tecidos) ou um elemento de reconhecimento por bioafinidade ou biocomplexação (interação anticorpo-antígeno); e podem também ser classificados de acordo com o **princípio físico utilizado pelo transdutor** (sensores eletroquímicos, piezoelétricos⁴⁹, termoelétricos⁵⁰ ou ópticos⁵¹).

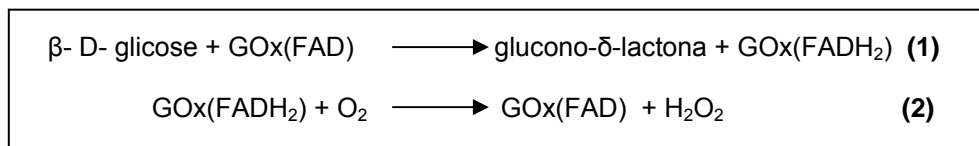
Os **biossensores eletroquímicos**⁵² são os mais comumente utilizados. Seu princípio de funcionamento é baseado nas reações redox, que acontecem na interface eletrodo / analito, transformando o sinal analítico conferido pela especificidade da biomolécula em sinal elétrico que será medido por um detector

eletroquímico. Portanto, os biosensores eletroquímicos combinam a seletividade de enzimas como a glicose oxidase, por exemplo, com a versatilidade e a simplicidade dos sistemas eletroquímicos⁵³. Os biosensores eletroquímicos podem ainda ser divididos em três categorias: os **condutimétricos**⁵⁴, os **potenciométricos**^{55,56} e os **amperométricos**.

Dos biosensores eletroquímicos, os mais amplamente empregados são os do tipo amperométricos. O método amperométrico pode proporcionar altas sensibilidades ao dispositivo. Muitas moléculas de interesse biológico não são intrinsecamente eletroativas e, portanto não podem ser detectadas diretamente. A utilização de enzimas cujas reações redox catalíticas e bioespecíficas podem produzir espécies eletroativas que podem ser detectadas eletroquimicamente. O método de detecção amperométrico envolve basicamente um potencial constante aplicado, entre o eletrodo de trabalho e o de referência, que controla a corrente produzida pela reação redox dos produtos da reação bioquímica (no caso dos biosensores) na superfície do eletrodo que por sua vez é proporcional à concentração do analito em questão. Diferentemente do modo potenciométrico, no amperométrico, existe consumo do analito e conseqüentemente, o transporte de massa é de fundamental importância e deve ser controlado. O O₂ e o H₂O₂ são o co-substrato e o produto de muitas reações enzimáticas e são também moléculas eletroativas podendo ser detectadas eletroquimicamente e relacionadas à concentração do analito.

Os biosensores amperométricos de glicose são geralmente categorizados em três classes (ou gerações), baseados no mecanismo da reação eletroquímica envolvida.

Os de **primeira geração** são baseados na oxidação da glicose pela glicose oxidase (GOx) de acordo com as seguintes reações:



Neste caso o incremento na concentração de H_2O_2 ou o decréscimo na concentração de O_2 devido a reação 2 são detectados eletroquimicamente e são proporcionais à concentração de glicose. Um inconveniente deste tipo de biossensor é que ele é dependente da concentração de oxigênio dissolvido no meio⁵⁷. A Figura 4, a seguir representa um biossensor de primeira geração.

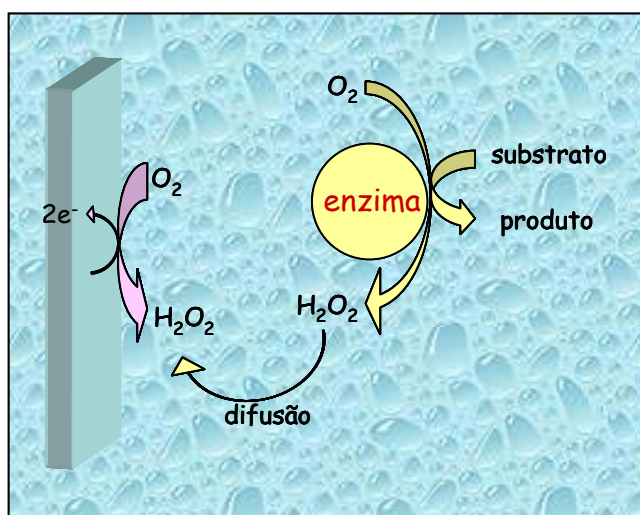
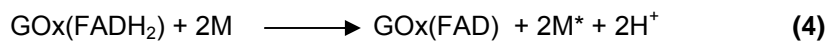


Figura 4: Representação esquemática do funcionamento de um biossensor amperométrico

Porém, o potencial requerido para essa oxidação é de aproximadamente 650 mV, reduzindo, portanto a própria especificidade conferida pela presença da enzima.

Uma alternativa para o referido problema é a modificação da superfície do eletrodo com agentes que permitam que a oxidação aconteça em potenciais mais baixos. Esses agentes são chamados de mediadores e podem prontamente participar da reação redox com um componente biológico promovendo a rápida transferência do elétron⁵⁸. Além disso, os mediadores ainda diminuem a dependência com relação ao O₂.

Esses biossensores são classificados como de **segunda geração**. As equações a seguir representam reações que envolvem a utilização de mediadores.



Os hexacianoferratos de metais de transição são mediadores bastante conhecidos por suas propriedades eletrocatalíticas. A oxidação eletrocatalítica do peróxido de hidrogênio pelo azul da prússia (hexacianoferrato de ferro) foi extensivamente estudada⁵⁹⁻⁶¹ pois possibilita a sua detecção seletiva a baixos potenciais, evitando as interferências causadas por compostos redutores presentes nas amostras. A Figura 5 representa um biossensor amperométrico baseado em Azul da Prússia (AP).

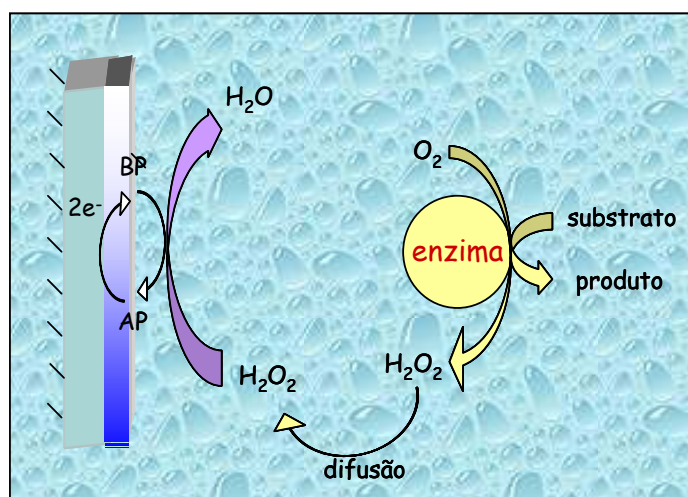


Figura 5: Representação esquemática de um biossensor amperométrico baseado em azul da prússia

A classe de biossensores de **terceira geração** é baseada na transferência direta de elétrons entre a enzima e o eletrodo⁶². Para tanto, a distância entre o sítio ativo da enzima e a superfície do eletrodo deve ser mínima. Uma das formas de fazer isso seria a utilização do método de orientação preferencial da enzima⁶³. Outra forma seria conectar a enzima através de fios moleculares que facilitem a transferência de elétrons⁶⁴, ou ainda utilizar polímeros condutores como matriz para a imobilização da enzima⁶⁵

1.3.1.2. Mediadores: Análogos do Azul da Prússia

Os eletrodos enzimáticos mediados são conhecidos por serem menos susceptíveis á interferências devido aos baixos potenciais de eletrodo.

Como já dito anteriormente, os hexacianoferratos de metais de transição são mediadores bastante conhecidos por suas propriedades eletrocatalíticas. Pertencem a uma importante classe de compostos de valência mista, sendo que a presença de

dois picos redox, um de alto spin e outro de baixo spin eletrônico, no caso do azul da prússia, proporciona aplicações potenciais em diversas áreas.

Apesar de o AP possuir essas excelentes propriedades eletrocatalíticas, sua incapacidade de mediar a eletrocatalise do peróxido de hidrogênio em meios contendo íons Na^+ ⁶⁶ restringe sua utilização em amostras biológicas. A atividade eletrocatalítica do AP depende do fluxo de cátions através dos canais e buracos do sólido para que se efetue o balanço de cargas durante as reações de oxidação e de redução. Como a sua estrutura possui canais de diâmetro de aproximadamente 1,6 Å, íons com raios hidrodinâmicos maiores que esse valor, como no caso do Na^+ que possui raio hidrodinâmico de 1,83 Å, não poderão efetuar a compensação de cargas (Figura 6).

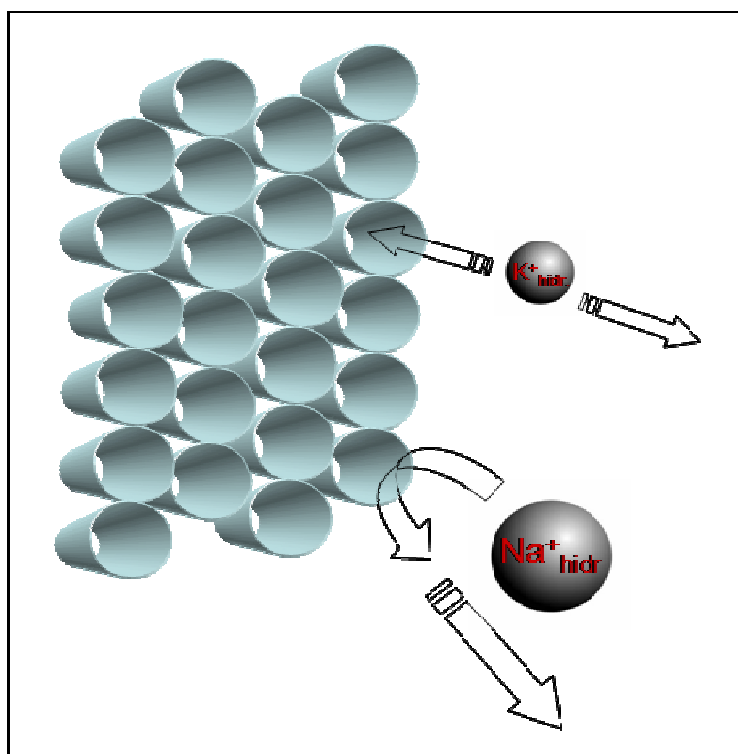


Figura 6: Ilustração dos canais de azul da prússia e a impossibilidade de íons hidratados de Na^+ entrarem por entre seus canais

Dessa forma, é de grande interesse estudar compostos alternativos ao AP, atualmente é possível encontrar diversos trabalhos em literatura onde são estudados compostos análogos ao AP, como, por exemplo, o hexacianoferrato de níquel, cobalto e de cobre, onde temos a substituição de átomos de Fe^{3+} por níquel⁶⁷, cobalto e cobre^{68, 69} respectivamente. Esses compostos análogos têm sido bastante utilizados em eletroanalises. A detecção de dopamina⁷⁰, $NADH$ ⁷¹, cisteína⁷², hidrazina⁷³ e vitamina B_6 ⁷⁴ foram realizadas utilizando os hexacianoferratos de níquel, cobalto e cobre.

O hexacianoferrato de níquel, por exemplo, é caracterizado por exibir excelentes propriedades redox, com respostas reprodutíveis, reversíveis e bem definidas podendo também atuar em meios contendo outros metais alcalinos além do potássio⁷⁵. Apresentou bons resultados também quando utilizado para catalizar a

eletrorredução do peróxido de hidrogênio, principalmente quando utilizado juntamente com o polipirrol, formando um híbrido⁷⁶.

O hexacianoferrato de cobalto também exhibe respostas eletroquímicas muito boas e bem definidas. É um forte candidato para aplicações eletroanalíticas, possuindo atividade eletrocatalítica para uma grande diversidade de compostos incluindo ácido ascórbico, nitrito, hidrazina, NADH, hidroxilamina e paracetamol⁷⁷.

Um comportamento semelhante pode ser encontrado no análogo do AP, o hexacianoferrato de cobre (Figura 7), o nosso material de interesse. Nele, os átomos de ferro (III) (raio iônico = 78,5 pm), do AP, coordenados a átomos de Nitrogênio são substituídos por Cu (II) (raio iônico = 87 pm), distorcendo a sua estrutura cúbica de face centrada. Nesse caso, os átomos de cobre podem ocupar dois tipos de sítios: Cu^A formando um quadrado planar com os átomos de Nitrogênio (CuN₄); ou Cu^B com número de coordenação fracionada e igual a 1/4, sendo que os átomos de Cobre não são ligados ao ferro por ponte CN e são mais móveis que os Cu^A. A distorção provocada pelos átomos Cu resulta em uma estrutura cúbica mais aberta, com vacâncias que podem mais facilmente ser ocupadas por moléculas de H₂O ou de íons como, por exemplo, o Na⁺, podendo, diferentemente do azul da prússia, atuar em meios contendo outros íons de metais alcalinos.

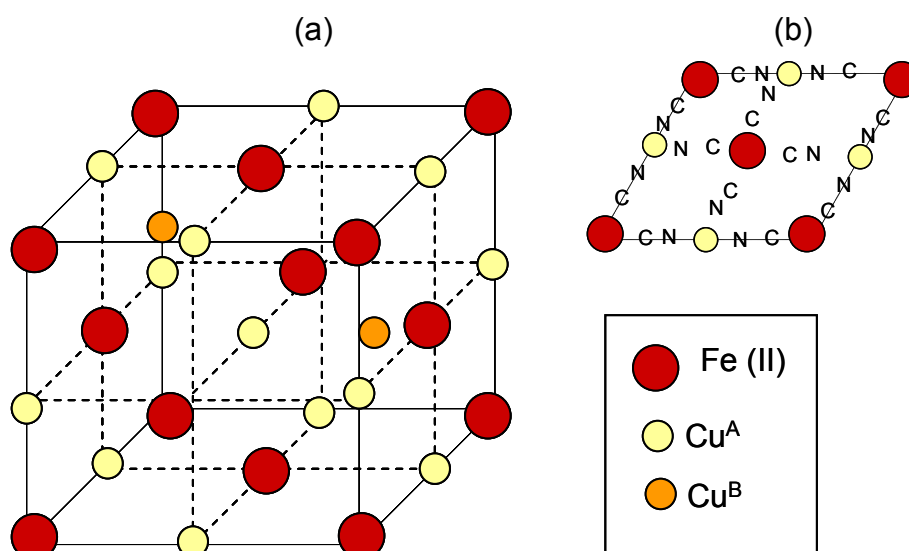


Figura 7: (a) Estrutura cúbica do hexacianoferrato de cobre; (b) Visão frontal da estrutura mostrando a coordenação dos átomos de Cu por átomos de N e dos átomos de Fe por átomos de C.

O hexacianoferrato de cobre possui também atividade eletrocatalítica para ascorbato, hidrazina, vitamina B₆, hidroxilamina, ascorbato e hidroxilamina.

Propriedades ainda mais interessantes são esperadas desses materiais em proporções nanométricas. Efeitos de superfície e compensação de cargas mais rápidas potencializam suas propriedades eletrocatalíticas, tornando-os mais atraentes quando utilizados em sensores, biossensores e em dispositivos eletrocromáticos, como trataremos a seguir. O azul da prússia nanoparticulado tem sido bastante estudado, principalmente nas áreas que envolvem eletrocatalise⁷⁸ e eletrocromismo⁷⁹.

1.3.2. Dispositivos eletrocromicos

O eletrocromismo é a propriedade que alguns materiais cromógenos possuem em alterar sua cor reversivelmente, induzida pela aplicação de um potencial externo. É a mudança visível e reversível na transmitância e/ou reflectância que está associada com a reação eletroquimicamente induzida de oxirredução⁸⁰. A mudança de cor resulta de diferentes bandas de absorção no visível dos estados reduzidos e oxidados do material.

Os materiais eletrocromicos são de grande interesse tecnológico e comercial. Possuem algumas características vantajosas em relação aos dispositivos de cristal líquido, utilizados atualmente em janelas e visores, tais como alto contraste óptico, independência em relação ao ângulo de visão, memória óptica, estabilidade aos raios ultravioleta e ampla operação em várias faixas de temperatura⁸¹. Possuem aplicação prática principalmente em espelhos retrovisores eletrocromicos para automóveis, displays e janelas eletrocromicas (Figura 8).



Figura 8: Exemplos de janelas eletrocromicas que mudam o contraste óptico de acordo com o potencial aplicado.

Os estudos envolvendo eletrocromismo utilizam técnicas comuns à eletroquímica como a voltametria cíclica, a amperometria ou a coloumetria acopladas a métodos espectroscópicos in situ. Essa técnica, que combina a eletroquímica com a espectroscopia é conhecida como espectroeletroquímica. Algumas modificações especiais são feitas à configuração da célula eletroquímica, como por exemplo, o eletrodo de trabalho deve ser transparente a radiação visível (para os casos em que as medidas são feitas com base na radiação que atravessa o eletrodo), assim como a própria célula. O material eletrocromico pode ser apropriadamente imobilizado sobre o eletrodo de trabalho que por sua vez deve ser colocado no caminho óptico da radiação incidente para que as mudanças espectroscópicas sejam simultaneamente medidas com relação às medidas eletroquímicas.

As bases envolvidas na espectroeletroquímica são simples. No caso da técnica espectroscópica ser o UV-visível, se um feixe de radiação eletromagnética atravessa um eletrodo transparente, onde um material eletrocromico está imobilizado e em que se está produzindo uma reação de oxirredução, a evolução deste processo pode ser seguida pelas variações de absorbância do sistema. Para que isso aconteça, as espécies que participam da reação devem interagir com a radiação incidida. Suponha-se que o material eletrocromico (M) adsorvido no eletrodo passe de um estado reduzido (M_{Red}) para oxidado (M_{ox}). As variações de absorbância detectadas são consequência da formação da espécie oxidada. Os conceitos espectroscópicos⁸² como a lei de Lambert-Beer continuam valendo para esses casos, de acordo com equação a seguir:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot C_{Mox} \quad (6)$$

Onde A é a absorbância, ε é a absorvidade molar e b é o caminho óptico.

Deste modo, pode-se relacionar a concentração de sítios eletrocromicamente ativos do material com a absorbância medida.

Alguns parâmetros são importantes para avaliar o desempenho de um dispositivo eletrocromico, entre eles, a memória óptica, o tempo de resposta (τ), a eficiência eletrocromica (η), contraste óptico e durabilidade.

A memória óptica de um dispositivo eletrocromico pode ser definida como o tempo que o material eletrocromico retém a cor (induzida pela mudança eletroquímica) sem nenhum potencial aplicado, ou seja, em potencial de circuito aberto.

O contraste óptico é a diferença de transmitância ($\Delta\%T$ ou $\Delta\%A$) entre os estados colorido e descolorido.

O tempo de resposta eletrocromico (τ) é o tempo necessário para que o dispositivo mude de cor. Para aplicações em dispositivos comerciais, tempos de respostas rápidos são requeridos. Não existe atualmente nenhuma definição específica sobre qual a proporção exata da variação total de transmitância que o tempo de resposta deve ser medido. Alguns simplesmente consideram o tempo como sendo o necessário para que ocorra a variação total de transmitância, outros consideram 90 % dessa variação, etc.

A eficiência eletrocromica (η), expressa em $C^{-1} cm^2$, corresponde à quantidade de carga envolvida na mudança de cor em um determinado comprimento de onda (λ) e por unidade de área. Altas eficiências eletrocromicas são exigidas na construção de um dispositivo. Pode ser calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\eta (\text{l}) = \frac{\Delta A}{Q} \quad (7)$$

Onde ΔA é a variação de absorbância e Q é a carga elétrica envolvida.

O fenômeno eletrocromismo foi descoberto com o óxido de tungstênio⁸³ que ainda é um dos principais materiais eletrocromicos utilizados e candidatos para o uso em larga escala em dispositivos eletrocromicos. Outros óxidos de metais de transição são também eletrocromicos, como se podem citar os óxidos de rutênio⁸⁴, de cobalto e de manganês⁸⁵, etc

Os polímeros condutores⁸⁶ constituem uma classe de materiais eletrocromicos também bastante estudada. Entre eles, o polipirrol⁸⁷ e a polianilina⁸⁸ são os mais conhecidos.

O azul da prússia⁸⁹ é um reconhecido pigmento pertencente à família dos hexacianoferratos de metais de transição cujo arranjo estrutural único (cúbico de face centrada com o íon do metal de transição ligado a grupos cianetos ricos em elétrons) lhe confere propriedades importantes como a modulação da sua absorbância óptica por processos eletroquímicos reversíveis nos centros de metal, sendo portanto um material eletrocromico que no estado oxidado é azul e quando reduzido se torna incolor de acordo com a Figura 9.

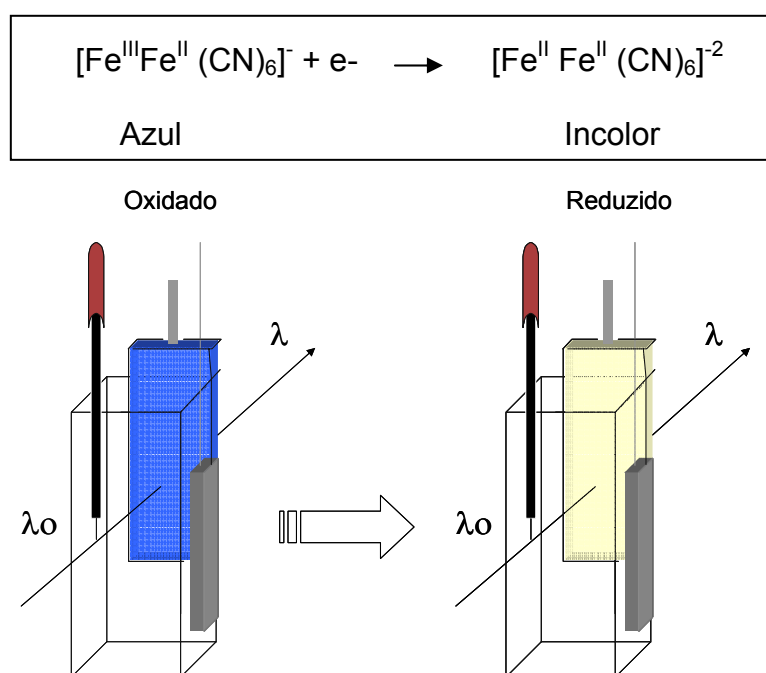


Figura 9: Célula eletroquímica contendo um eletrodo modificado por azul da prússia. Quando o material está no seu estado oxidado apresenta a coloração azul e quando é reduzido torna-se incolor

Além dos estados de oxidação acima descritos, o azul da prússia ainda possui a forma $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^-$, que é conhecida como verde de berlim (VB). Esse material possui características bastante difundidas no meio científico com uma grande produção literária sobre o tema. Hammond e colaboradores têm desenvolvido novos aspectos do AP como material eletrocromico na sua escala nanométrica^{79, 90}.

Dispositivos eletrocromicos baseados em materiais com estruturas nanométricas proporcionam, além de uma grande área superficial, um contato íntimo com a solução eletrocatalítica fazendo com que se tenha compensação de cargas rapidamente, resultando em tempos de coloração/descoloração igualmente rápidos, da ordem de mili-segundos⁹¹.

Muitos artigos relativos a síntese de nanopartículas inorgânicas, como óxido de molibdênio⁹², hidróxidos de níquel⁹³ e de cobalto⁹⁴, azul da prússia, óxido de

tungstênio⁹⁵ e dióxido de titânio modificado por cromóforos orgânicos⁹⁶, entre outros, tem sido reportados na literatura, mas apenas alguns exemplos desses nanomateriais com aplicação em dispositivos eletrocromicos tem sido publicados.

Diferentemente do filme de hexaicianoferrato de cobre, não existe nenhuma referência com relação ao eletrocromismo deste análogo do azul da prússia com estrutura nanométrica na literatura. Dessa forma, os estudos envolvendo a diminuição de tamanho do hexacianoferrato de cobre sob a perspectiva eletrocromica são de grande importância.

2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivos principais a síntese de nanopartículas de hexacianoferrato de cobre, um análogo do azul da prússia, assim como a sua caracterização físico-química visando a sua utilização em biossensores de glicose e em dispositivos eletrocromicos.

3. Parte Experimental

3.1. Reagentes

Todos os sais inorgânicos ($\text{CuCl}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, KCl , NaCl (Synth)), HCl e hidrocloreto de polialilamina, (PAH, Aldrich) foram de máxima pureza e utilizados tais como recebidos. A enzima Glicose Oxidase (EC 1.1.3.4) 162.000 u/g foi adquirida da Sigma. As soluções de D-glicose anidra (Synth) permaneceram em repouso por uma noite antes de sua utilização, para se alcançar o equilíbrio mutorrrotacional. O glutaraldeído (Merck, 25%) e o e o soro de albumina bovina (BSA, Sigma) foram utilizados tais como recebidos. Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando água ultra-pura (Elga System UHQ, $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$).

3.2. Síntese das Nanopartículas de Hexacianoferrato de Cobre

A síntese do hexacianoferrato de cobre se deu de maneira extremamente simples. Combinou-se a síntese química com a irradiação ultrasônica, e para tanto, gotejou-se vagarosamente uma solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 20 mmol L^{-1} + KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sobre uma solução de CuCl_2 20 mmol L^{-1} + KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, cujo recipiente continha uma sonda de ultra-som (20 kW , 10 W cm^{-1}). Utilizou-se o modo de vibração pulsado. A seguir, na Figura 10, segue a representação esquemática da síntese.

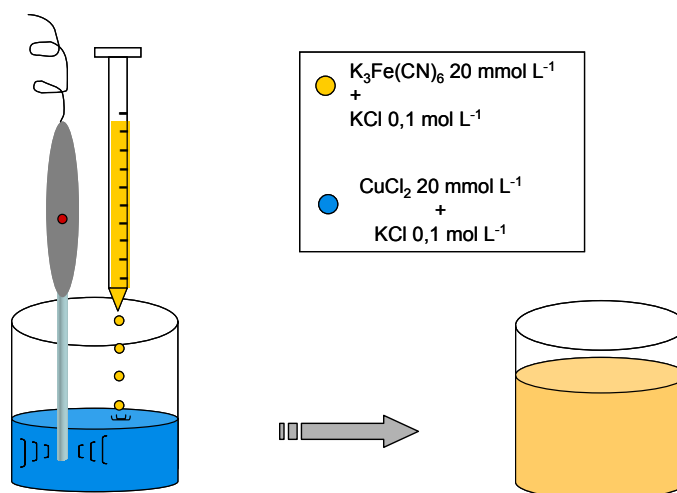


Figura 10: Representação esquemática da síntese ultrasônica das nanopartículas

Logo após a síntese, o hexacianoferrato de cobre foi submetido a um processo de diálise por dois dias, e depois estocado em recipiente apropriado.

3.3. Imobilização das Nanopartículas

Foram empregadas duas diferentes técnicas de imobilização: a deposição eletrostática camada por camada (LBL) e a deposição eletroforética (EPD).

A imobilização por LBL consistiu em intercalar as nanopartículas de hexacianoferrato de cobre com um polycation como o PAH sobre um eletrodo de ITO (eletrodo transparente modificado por um filme condutor de óxido de índio dopado com estanho). A estrutura do PAH pode ser vista na Figura 11.

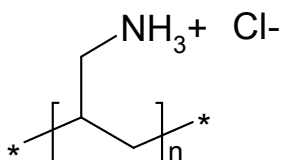


Figura 11: Estrutura do polycation PAH

O substrato de ITO foi mergulhado em uma solução de PAH (5mg mL^{-1}) durante 5 minutos, depois mergulhado em água sob agitação magnética durante 1 minuto e seco com uma corrente de N_2 . Posteriormente imergiu-se o substrato na dispersão de nanopartículas de hexacianoferrato de cobre (3 mg mL^{-1}) por 5 minutos e novamente foi lavado com água durante 1 minuto e seco com N_2 . Estas operações foram repetidas até atingir o número desejado de bicamadas. Todas essas operações foram executadas por um equipamento especialmente desenvolvido para o nosso grupo de trabalho pela empresa Prossiga Informática. Tal equipamento (Figura 12) consiste de um braço mecânico que realiza movimentos de subida e descida, de um disco rotatório que determina a posição dos béqueres que contém as soluções desejadas, de um agitador magnético interno e de um sistema de secagem a gás que pode ser conectado, por exemplo, à saída de nitrogênio e também de um sistema computadorizado que controla os comandos de tempo de mergulho, secagem, agitação, etc.

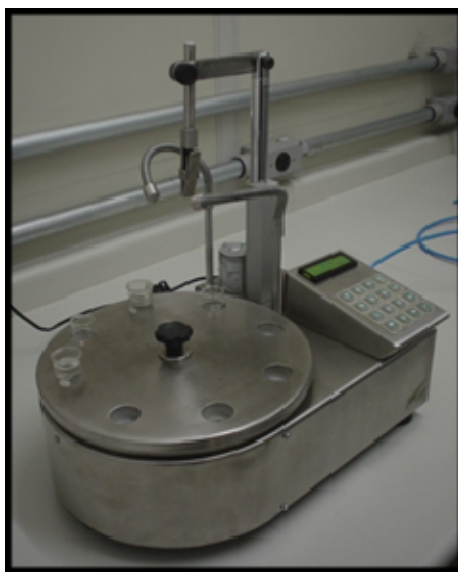


Figura 12: Foto do equipamento utilizado para contruir as bicamadas de HexFeCu e PAH.

Na imobilização por EPD, utilizou-se um eletrodo de ITO previamente modificado por uma camada de PAH. Para tanto, mergulhou-o em uma solução de PAH de concentração 5 mg mL^{-1} por 10 minutos. Posteriormente esse eletrodo foi colocado na célula de deposição juntamente com um eletrodo de platina de dimensões $2 \times 0,4 \text{ cm}$ como contraeletrodo. O campo aplicado para a deposição foi de 2 V cm^{-1} , o volume da suspensão de nanopartículas de hexacianoferrato de cobre (3 mg mL^{-1}) foi de $3,4 \text{ mL}$ e os tempos de deposição foram de 1, 2, 3 e 4 horas.

3.4. Experimentos espectroeletroquímicos

A caracterização espectroeletroquímica foi feita em solução de KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) + HCl e pH 3,6 e em intervalo de potencial de $-0,2$ a $1,2 \text{ V}$, cubeta de plástico com 1 cm largura, eletrodo de referência $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$ e contra eletrodo de platina. As análises cromogênicas foram efetuadas simultaneamente com as medidas eletroquímicas. Utilizou-se radiação monocromática verde (comprimento de onda de 510 nm).

3.5. Detecção do Peróxido de Hidrogênio

A cronoamperometria para a detecção de peróxido de hidrogênio foi feita com eletrodos de diferentes números de bicamadas a $0,0 \text{ V vs Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$. Foram feitas adições da solução de peróxido de hidrogênio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em 20 mL de solução de KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) a pH 3,6. A cada nova adição da solução de peróxido de hidrogênio a concentração resultante (em peróxido) aumentava em $0,042 \text{ mmol L}^{-1}$. Todos os experimentos foram realizados utilizando-se eletrodo de referência de $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$ e contra eletrodo de platina.

3.6. Imobilização da Enzima

Foram utilizadas duas técnicas para a imobilização da enzima.

Uma delas foi a de automontagem eletrostática (LBL). Para tanto, ajustou-se o pH da solução de glicose oxidase (10 mg mL^{-1}) para 7 para que ficasse com carga negativa, já que seu ponto isoelétrico é de 4,2. Além disso, o pH ótimo para o funcionamento desta enzima é 7. Como polícatión utilizou-se o PAH ($\text{pKa} \sim 8,5$).

Os filmes foram preparados mergulhando os eletrodos alternadamente nas soluções de PAH e enzima durante 5 minutos até se obter o número de bicamadas desejado. Depois de cada deposição, o sistema substrato/filme foi mergulhado na solução de lavagem durante 1 minuto e seco com uma corrente de N_2 .

A outra técnica utilizada foi a de ligação cruzada, onde se utiliza um agente bifuncional, no caso, o glutaraldeído e também um estabilizante, o BSA (bovine serum albumine). Para tanto, preparou-se uma solução de 1 mL contendo glicose oxidase (10 mg mL^{-1}) e BSA (10 mg mL^{-1}) em um mesmo frasco. Em um outro frasco, colocou-se uma solução de glutaraldeído (0,3125 %). Misturaram-se as duas soluções nas mesmas proporções em volume e aplicou-se uma alíquota desta mistura sobre o eletrodo de ITO que foi deixado em repouso na geladeira ($T=5^\circ\text{C}$) por 5 dias.

3.7. Detecção de Glicose

Após a imobilização da enzima pelo método (LBL) foram feitos testes amperométricos com eletrodos de diferentes números de bicamadas de Hexfecu/PAH a 0,0V. Foram feitas adições de solução de glicose 1 mol L^{-1} , $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, dependendo do experimento em uma célula eletrolítica contendo

8,0 mL de solução de KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) ou de NaCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7 e a concentração na célula eletrolítica aumentava em 0,625 mM a cada adição de glicose. Esses experimentos foram feitos utilizando-se eletrodo de referência de $\text{Ag/AgCl}_{\text{sat}}$ e contra eletrodo de platina.

Para realizar os experimentos em que a enzima foi imobilizada através do método crosslinking, utilizou-se um eletrodos modificados por n bicamadas de Hexfecu, e uma mistura 1 :1 de glicose oxidase/BSA (10 mg mL^{-1}) e glutaraldeído (0,31%). O equivalente a 50 μL da mistura foi gotejado sobre o eletrodo que em seguida foi deixado em repouso por 5 dias para só então ser utilizado para a detecção amperométrica de glicose. A célula eletrolítica continha 8 mL de solução de KCl e os incrementos na concentração de glicose foram de 0,0625 mM.

3.8. Técnicas e Instrumentação

Para a síntese das nanopartículas utilizou-se uma sonda de ultrassom de titânio (Sonics), que possibilita o controle do modo de vibração (contínuo ou pulsado) e da potência aplicada (0 a 100 W).

Para a caracterização química do material foram utilizadas as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (HRTEM), microscopia eletrônica de varredura (LVMEV), Uv-Vis, difração de raios X, espectroscopia Raman e ICP – ES. As três últimas técnicas foram realizadas com os pós do hexacianoferrato de cobre. Para a obtenção desses pós, centrifugou-se (14000 RPM) por 30 minutos alíquotas de 1,5 mL das soluções coloidais das nanopartículas. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado e centrifugado novamente. O sedimento restante foi colocado em um dessecador (sob pressão reduzida e temperatura ambiente) até

eliminar a parte líquida por completo. Depois de seco, o material foi moído em um almofariz, pesado e espalhado no porta-amostras do difratômetro de raios-x.

A análise e tratamento de dados de microscopia eletrônica de transmissão, Microscópio Eletrônico de Transmissão de alta resolução (HRTEM-JEM 3010 URP) operando em 300KV com resolução pontual de 0,17 nm, foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME), situado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS-Campinas). A microscopia eletrônica de varredura, Microscópio Eletrônico de Varredura Baixo Vácuo (LV-SEM JSM 5900LV) operando entre de 1KV a 30KV, foi realizada na Central Analítica situada Instituto de Química da Universidade de São Paulo. As análises de difração de raios X foram obtidas a partir do pó do hexacianoferrato de cobre em um difratômetro Rigaku Miniflex

O estudo sobre as propriedades espectroscópicas foi realizado registrando os espectros Raman dos pós do hexacianoferrato de cobre em um equipamento Renishaw Raman Imaging microscope 3000, utilizando radiação excitante de 632,8nm.

Os espectros eletrônicos no UV-vis foram obtidos em um Hewlett-Packard 8453 Diode Array Spectrophotometer onde uma célula eletroquímica foi montada na própria cubeta, acoplado a um potenciostato PAR 362 para medidas "in situ" dos eletrodos modificados.

Os experimentos de espectroscopia de emissão atômica com fonte de excitação de plasma de argônio induzido foram realizados na Central Analítica do Instituto de Química da USP, utilizando um Spectro Ciros CCD.

Para a caracterização eletroquímica foi utilizada a técnica de voltametria cíclica. Os voltamogramas cíclicos foram feitos utilizando um potenciostato / galvanostato Ecochemie, modelo AUTOLAB PGSTAT 30.

As análises espectroeletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato / galvanostato Ecochemie, modelo AUTOLAB PGSTAT 30 acoplado à uma fonte de luz de estado sólido (WPI, Inc). Cabos plásticos de fibra óptica de 1mm de diâmetro foram usados no transporte da luz da cela eletroquímica a um amplificador fotodiodo PDA 1 (WPI, Inc), arquitetado para a detecção de baixos níveis de luz com uma corrente de resolução tipicamente de 1 pA. A saída do sinal PDA 1 foi distribuída à entrada analógica do potenciostato, obtendo-se assim medidas “in situ” de corrente/ transmitância com o potencial aplicado.

4. Resultados

4.1. Nanopartículas de Hexacianoferrato de cobre

4.1.1. A síntese sonoquímica

Existem diversos métodos descritos em literatura para a síntese do complexo hexacianoferrato de cobre. Um deles é a síntese química que se procede através da mistura de soluções de $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ e Cu^{+2} ⁹⁷ ou de soluções de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e Cu^{+2} ⁷⁴. Outro método é a sua síntese eletroquímica⁹⁸, utilizando a voltametria cíclica, através do qual se deposita eletroquimicamente um filme de cobre metálico (a -0,4 V numa solução de CuSO_4 5,0 mmol L⁻¹ + K_2SO_4 0,5 mmol L⁻¹) sobre um eletrodo de carbono vítreo que posteriormente é imerso em solução $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e ciclado. Outra possibilidade da síntese eletroquímica é a de uma só etapa, através da qual, o eletrodo é ciclado em uma solução eletrolítica contendo $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e Cu^{+2} ⁹⁹.

O filme de hexacianoferrato de cobre, assim como os outros análogos do azul da prússia, encontra aplicações principalmente nas áreas de eletrocatalise¹⁰⁰, eletrocromismo¹⁰¹, sensores para íons¹⁰², baterias¹⁰³, etc. Entretanto, a capacidade eletrocatalítica para peróxido de hidrogênio do filme de hexacianoferrato de cobre, independentemente do substrato, apresenta uma eficiência muito baixa quando comparada aos seus análogos azul da prússia ou hexacianoferrato de níquel. Quando se trata de eletrocromismo, a sua eficiência eletrocromica também deixa a desejar quando é novamente comparado com o azul da prússia¹⁰⁴. Portanto, visando aumentar a capacidade catalítica do hexacianoferrato de cobre para o peróxido de hidrogênio além de melhorar o seu desempenho eletrocromico (como eficiência eletrocromica e tempo de resposta), eletrodos foram modificados por nanoestruturas deste material.

Materiais com proporções nanométricas tem sido alvo de exaustivos estudos a fim de se aproveitar suas características físico-químicas específicas como a alta área superficial efetiva. Além disso, a simples diminuição no tamanho das partículas pode produzir materiais com propriedades totalmente diferentes daquelas encontradas nos respectivos materiais com partículas maiores, como previamente demonstrado no item de introdução deste trabalho.

Dentre as técnicas conhecidas para a síntese de nanopartículas, a sonoquímica se destaca por ser uma técnica simples e versátil. A sonoquímica foi uma das primeiras técnicas utilizadas para preparar nanomateriais. Suslick, em 1991, sonicou uma solução contendo $\text{Fe}(\text{CO})_5$ e obteve partículas de 10 a 20 nm de ferro amorfo¹⁰⁵. A partir de então, observou-se um crescente interesse na síntese sonoquímica de nanomateriais, como pode ser mencionado o review do próprio Suslick tratando da utilização do ultrassom na química de materiais¹⁰⁶.

A síntese sonoquímica do azul da prússia é relatada em literatura por produzir partículas esféricas de 5nm com boa distribuição de forma e tamanho e portanto decidiu-se por utilizar esse método sintético para produzir nanopartículas do análogo do AP, o hexacianoferrato de cobre, esperando alguma similaridade na sua distribuição de tamanho e propriedades.

O fenômeno físico responsável pelo processo sonoquímico é a cavitação acústica¹⁰⁷. Eventos como a criação, o crescimento e o colapso de bolhas que são formadas no líquido são responsáveis pela formação das nanopartículas, apesar das razões não estarem ainda totalmente esclarecidas. Ao chegar ao seu tamanho máximo, a bolha colapsa atingindo temperaturas extremamente altas (5000 – 25000K) ao redor, capazes de provocar a quebra de ligações químicas. Entretanto, a taxa de resfriamento após o colapso é muito alta (da ordem de 10^{11} K s^{-1}) induzindo

a cristalização rápida e a organização dos produtos. Por este motivo, a utilização de precursores voláteis, cuja reação acontecerá em fase gasosa, promoverá a formação de nanopartículas amorfas. Já a formação de estruturas cristalinas está ligada à rápida cinética que não permite o crescimento do núcleo, enquanto uma grande quantidade de centros de nucleação é formada no colapso das micro-bolhas e cuja reação acontece em fase líquida, na periferia da bolha. A ilustração do processo de cavitação acústica pode ser vista na Figura 13.

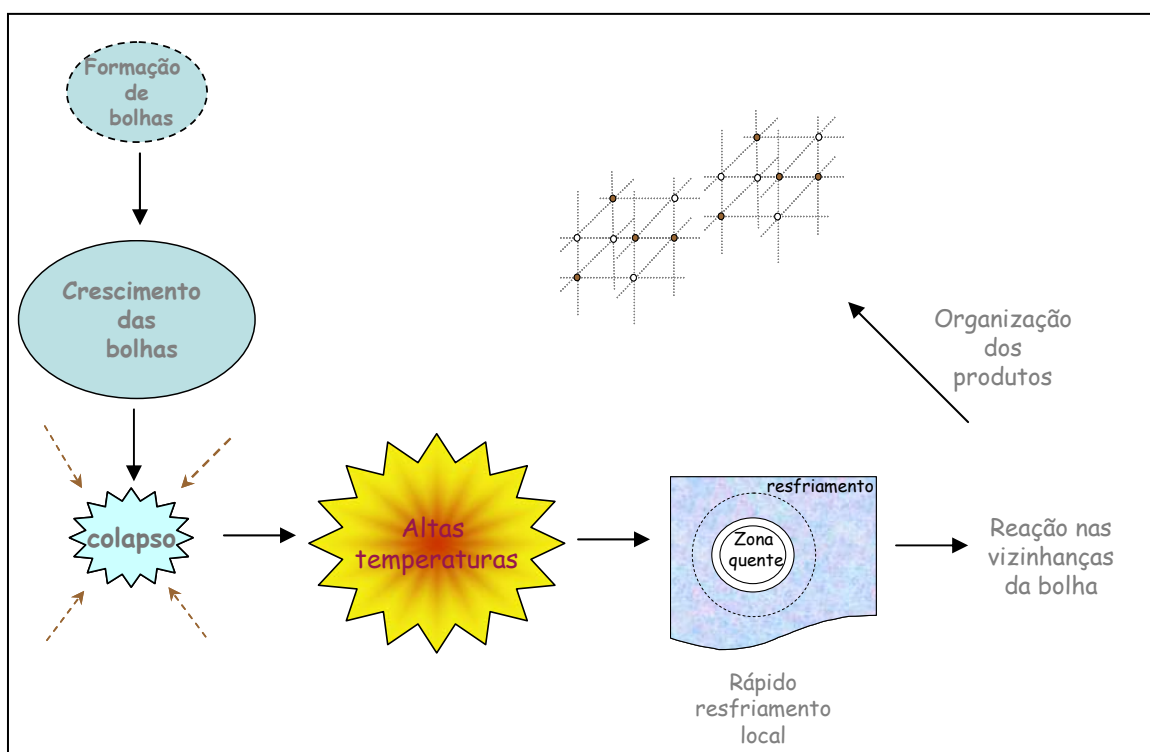


Figura 13: A cavitação acústica e a síntese de materiais nanoestruturados

A síntese do hexacianoferrato de cobre foi realizada em um recipiente contendo uma sonda de ultrassom e a solução de cloreto de cobre sobre a qual era gotejada a solução de hexacianoferrato de potássio durante 50 minutos. Durante a síntese, observou-se o aparecimento de um precipitado amarelo mostarda. A suspensão resultante foi submetida a um processo de diálise por dois dias para a

remoção do excesso de íons. Tal suspensão permaneceu estável por um longo período de tempo (aproximadamente um mês).

4.1.2. Caracterização das nanopartículas

Para a caracterização das nanopartículas obtidas a partir da síntese ultrassônica foram adotados as seguintes técnicas: difração de raios-X, espectroscopia Raman, análise elementar, ICP- ES, microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) e microeletroforese.

A partir da microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução foi possível obter informações quanto ao tamanho e forma das nanopartículas. Para tal, uma alíquota da suspensão de hexacianoferrato de cobre foi colocada sobre uma grade de ouro coberta com carbono amorfo e examinada no microscópio. O resultado pode ser visto na Figura 14.

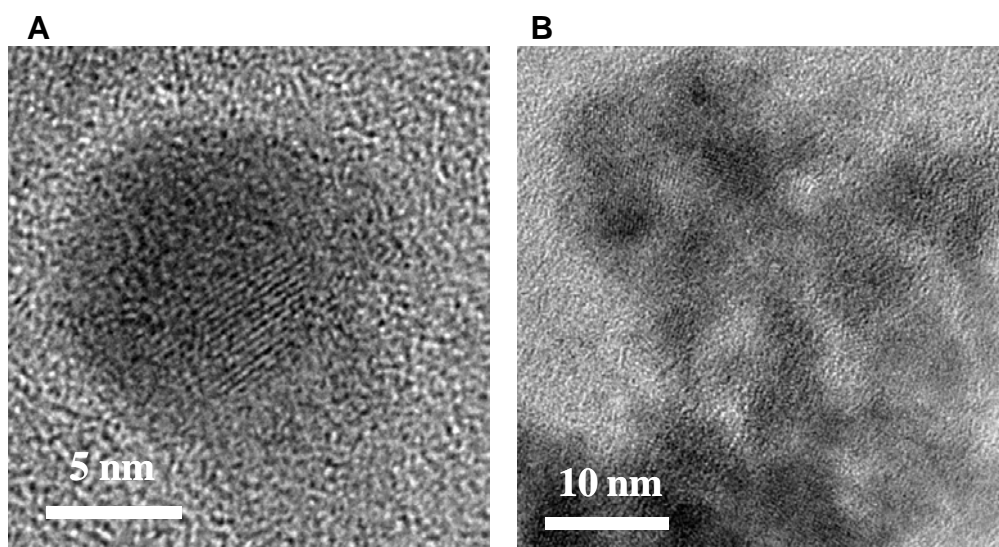


Figura 14: HRTM das nanopartículas de hexacianoferrato de cobre obtidas com ultra-som.

Pode-se observar a presença de uma partícula esférica (Fig. 14A) com aproximadamente 10 nm de diâmetro. A foto ao lado (Fig. 14B), mostra que algumas partículas, porém, não estão suficientemente afastadas umas das outras, formando um aglomerado.

A técnica de difração de raio-X permitiu constatar a presença do produto hexacianoferrato de cobre através da comparação de um raio-X padrão para o composto e também avaliar o tamanho das partículas. A Figura 15 mostra os resultados de tal análise.

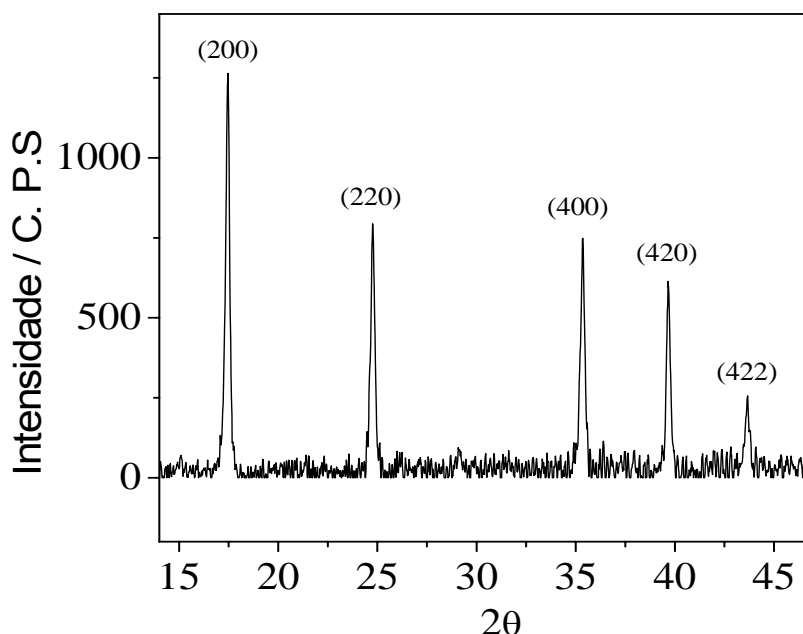


Figura 15: Difratograma do HexFeCu sintetizado via ultra-som

O difratograma obtido é idêntico ao difratograma padrão para o HexFeCu (JCPDS card No 86-0513), os planos cristalinos estão denotados na figura. A largura dos picos é um indicativo de que as partículas possuem proporções nanométricas. Um padrão de difração como o obtido, com picos largos é característico de cristais nanométricos, sendo que o diâmetro dos cristais pode ser estimado através da

Resultados

relação da largura de meio pico com a intensidade do mesmo¹⁰⁸. O diâmetro (d) das partículas foi calculado segundo a equação de Scherer ($d = 0,9 \cdot \lambda / \beta \cdot \cos \theta$) onde λ é comprimento de onda no raio-x, β é a largura de meio pico e θ é o ângulo de difração. O diâmetro encontrado foi de 28 nm.

A análise seguinte foi feita com o intuito de se estabelecer a real composição do material. Para tanto, uma parte do pó resultante do processo de centrifugação foi submetida á análise elementar e análise por ICP-ES. As análises foram feitas em duplicatas (a e b) e os dados resultantes estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1: Análise elementar de 0,026g do pó do hexacianoferrato de cobre

Amostra (% em massa)	%C	%N	%H	%Cu	%Fe
HexFeCu (a)	19,75	18,99	2,54	19,76	8,31
HexFeCu (b)	19,73	18,78	2,35	19,34	7,93
Média	19,74	18,89	2,44	19,55	8,12
Mol	$4,32 \times 10^{-4}$	$3,56 \times 10^{-4}$	$6,34 \times 10^{-4}$	$8,1 \times 10^{-5}$	$3,8 \times 10^{-5}$

Tais resultados permitiram comprovar a existência do composto de cobre baseado em um hexacianoferrato assim como determinar a sua composição elementar. A relação molar entre Fe e Cu encontrada foi de 1 : 2, a relação entre C e N foi de 1 : 1, e a relação entre Fe e CN foi de 1 : 10. Chegou-se a conclusão de que a composição elementar do composto é a seguinte: $\text{Cu}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, com um pequeno excesso de grupos cianetos livres, indicando que uma porção de grupos

cianetos não está coordenada aos metais de transição. Essa observação pode ser explicada pelo método de síntese das nanopartículas utilizada. O fenômeno de cavitação acústica resulta em temperaturas de até 5000K e pressões de 10000 bar como previamente relatado. Tais condições extremas levam a produção de estados excitados, ruptura de ligações e a formação de radicais livres. O excesso de grupos cianetos livres pode ser, portanto, gerado pela dissociação dos íons $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ expostos à cavitação acústica. Os grupos cianetos livres também estão relacionados ao excesso de carga superficial negativa das nanopartículas de hexacianoferrato de cobre. Eles estariam adsorvidos superficialmente nos nanocristais, fornecendo a carga negativa necessária para a sua imobilização através do método eletrostático. A mobilidade eletroforética encontrada para a solução de nanopartículas sonoquimicamente sintetizadas foi de $-3,6 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$, ou seja, de fato, possuem carga superficial negativa. O potencial zeta (ζ) calculado a partir do valor da mobilidade eletroforética foi de -50,8 mV.

O excesso de grupos cianetos também pôde ser comprovado através da espectroscopia Raman, mostrada na Figura 16. Nele observa-se uma banda larga na região de 2100 cm^{-1} atribuída à presença de grupos cianetos livres. Já os cianetos coordenados a metais de transição mudam os estiramentos para frequências mais altas (2185 cm^{-1}), fato este muito característico dos cianocomplexos¹⁰⁹. Em adição às bandas CN^- , também é possível encontrar bandas de baixa frequência (por volta de 500 cm^{-1}); bandas típicas de coordenação ao Fe: $\nu_3(\text{Fe-N}) = 503 \text{ cm}^{-1}$, $\delta(\text{Fe-C-N}) = 436 \text{ cm}^{-1}$, $\delta(\text{N-Fe-N}) = 208 \text{ cm}^{-1}$ e os coordenados ao Cu: $\nu_1(\text{Cu-N}) = 472 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_2(\text{Cu-N}) = 504 \text{ cm}^{-1}$, $\delta(\text{Cu-C-N}) = 432 \text{ cm}^{-1}$, $\delta_1(\text{N-Cu-N}) = 194 \text{ cm}^{-1}$, $\delta_2(\text{N-Cu-N}) = 267 \text{ cm}^{-1}$ ^{110, 111}.

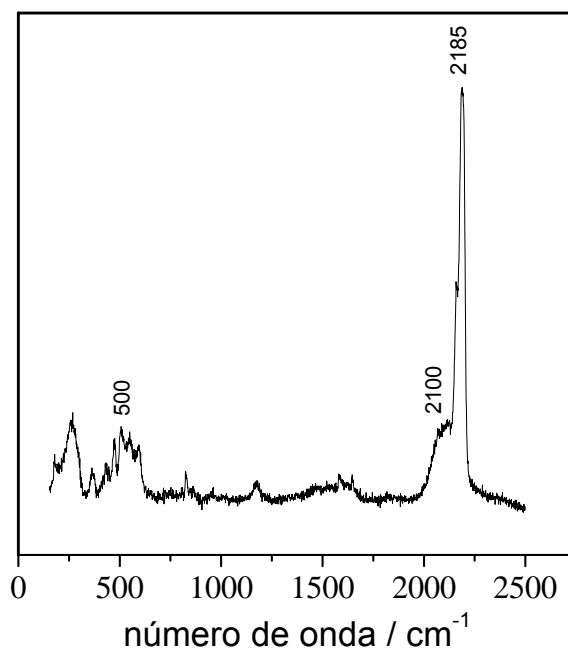


Figura 16: Espectroscopia Raman ($\lambda = 632,8$) do HexFeCu

4.2. Imobilização das Nanopartículas

Foram desenvolvidas nas últimas décadas várias técnicas de imobilização de materiais nanométricos em substratos. Porém, muitas dessas técnicas (deposição química de vapor, deposição química de camada atômica a partir do vapor¹¹², epitaxia por feixe molecular¹¹³) são caras ou requerem ambiente extremamente controlado, com equipamentos bastante sofisticados e que envolvem altos custos operacionais.

A técnica reportada por Decher e col conhecida como automontagem eletrostática camada por camada (LBL), entretanto, se mostrou simples e barata. Ela se baseia nas interações eletrostáticas entre macromoléculas iônicas de diferentes cargas^{114 -118} e envolve baixos custos e facilidade operacional. Polieletrólitos (que são polímeros solúveis em água, existindo na forma de sal ou na forma de cadeias poliméricas com grupos iônicos e contra-íons quando dissolvidos em água) positivos

e negativos¹¹⁹⁻¹²⁵ se intercalam para formar a estrutura de multicamadas. Entretanto, no presente trabalho, o “poliânion” não é um polieletrólito de carga negativa mas uma dispersão aquosa de nanopartículas de hexacianoferrato de cobre que possuem excesso de carga superficial negativa.

Um dos aspectos mais importantes da técnica LBL é o fato de que elementos ativos podem ser introduzidos sem que ocorram mudanças significativas em suas propriedades elétricas ou químicas. Através dessa técnica, é possível depositar consecutivamente camadas planares de moléculas em um suporte sólido formando dessa maneira multicamadas em que o arranjo em nanoescala pode ser controlado e mantido em pelo menos uma dimensão. Os filmes podem ser organizados de diversas maneiras, incorporando materiais diferentes que podem ser pequenas moléculas orgânicas, polímeros, proteínas, clusters inorgânicos, colóides, etc. A sua arquitetura é completamente determinada pela sequência de deposição e a espessura do filme geralmente independe do substrato aumentando quase que linearmente com o número de bicamadas. Do ponto de vista eletrocromico, a vantagem é a possibilidade de se combinar dois ou mais sistemas coloridos dentro do mesmo filme para dar origem a novas colorações.

Portanto, aproveitando-se da carga superficial negativa ($\zeta = -50,8$ mV) das nanopartículas sintetizadas de HexFeCu, seria muito interessante utilizar esse método de imobilização, com o intuito de estudar o seu comportamento eletroquímico, assim como tentar modular as características (como a sensibilidade para os biossensores ou o contraste óptico para os dispositivos eletrocromicos) dos filmes automontados em função da quantidade de material imobilizado, ou seja, do número de bicamadas.

Os filmes nanoestruturados obtidos através dessa técnica foram bastante robustos com uma coloração marron avermelhada bastante intensa dependendo do número de bicamadas imobilizadas.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar a estrutura superficial do filme automontado. Abaixo, mostramos duas imagens, onde as nanopartículas podem ser identificadas, os eletrodos em questão foram modificados por 25 bicamadas sendo a camada superficial constituída por nanopartículas de HexFeCu.

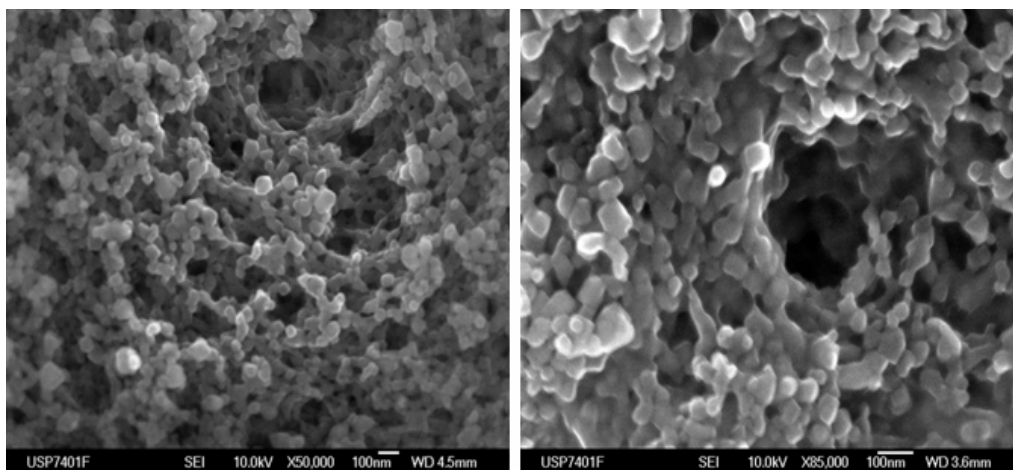


Figura 17: MEV de um filme automontado de nanopartículas de hexfecu / PAH cuja camada superficial é constituída por PAH

Outro método de imobilização também muito simples é a deposição eletroforética (EPD). Esta técnica apesar de conhecida desde 1808 foi primeiramente estudada com aspectos teóricos e práticos em 1940 e posteriormente reportada por Hamaker¹²⁶. Atualmente vem ganhando bastante interesse, principalmente porque combina alta versatilidade com o baixo custo e simplicidade da instrumentação. Na EPD, partículas carregadas, dispersas ou suspensas em um

meio líquido são atraídas e depositadas em um substrato de carga oposta sob influência de um campo elétrico¹²⁷.

O processo de deposição eletroforética envolve dois tipos de parâmetros; um deles está relacionado à suspensão e o outro aos processos físicos. Os parâmetros relacionados à suspensão incluem: tamanho de partícula, constante dielétrica do líquido, condutividade da suspensão, viscosidade da suspensão, potencial zeta e estabilidade da suspensão. Já os parâmetros relacionados ao processo envolvem: efeito do tempo de deposição, voltagem aplicada, concentração do sólido na suspensão e condutividade do substrato. Todos esses parâmetros devem ser considerados no processo da técnica de deposição eletroforética, entretanto, os parâmetros que influenciam de forma preponderante o processo são a voltagem aplicada, o tempo de deposição e a concentração das partículas na suspensão¹²⁸.

A técnica oferece ainda a possibilidade de controle de espessura e morfologia através do simples ajuste do tempo de deposição e do potencial aplicado.

Na deposição de nanopartículas de hexacianoferrato de cobre através da EPD, utilizou-se novamente o substrato de ITO. Nesse caso, o filme resultante não possuía uma coloração tão intensa pois a quantidade de material depositada sobre o eletrodo, através das condições de imobilização previamente impostas, não foi o suficiente para formar um filme tão robusto quanto no caso das bicamadas.

Foram, portanto utilizados como métodos de imobilização tanto o LBL quanto o EPD, contudo, a discussão do presente trabalho está baseada principalmente nos filmes construídos pela técnica LBL sendo a técnica de EPD utilizada para se obter uma abordagem comparativa entre as duas técnicas apenas para a parte de biossensores enzimáticos.

4.2.1. Caracterização Eletroquímica do Filme

4.2.1.1. Imobilização por LBL

A próxima etapa foi estudar o comportamento eletroquímico do filme. O voltamograma de um filme de 5 bicamadas de HexFeCu onde as nanopartículas foram imobilizadas através da técnica LBL pode ser visto na Figura 18. Diferentemente do comportamento eletroquímico do azul da prússia, observa-se apenas um par de picos, que são relativos ao processo redox reversível $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ a $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$.

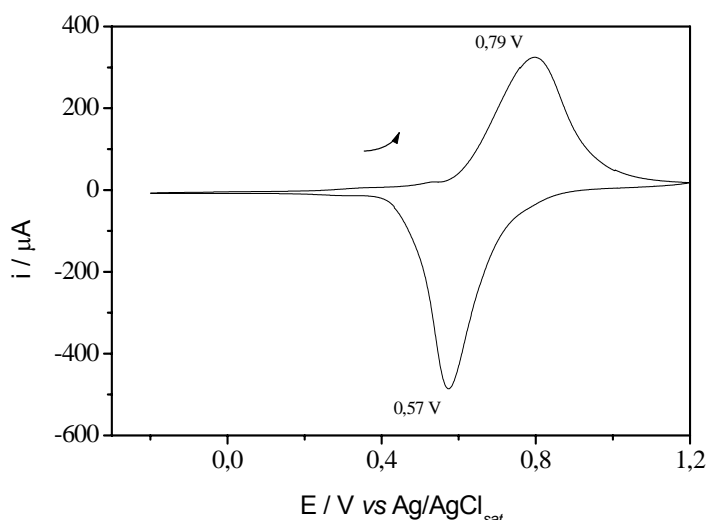


Figura 18: Voltamograma cíclico com um filme de HexFeCu de 5 bicamadas em KCl 0,1M, pH 3,6 e $V = 10 \text{ mV s}^{-1}$

O azul da prússia apresenta dois processos redox reversíveis que são as transformações de $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ para $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ e de $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ para $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{III}}$, que correspondem às transições de branco da prússia (BP) ao azul da prússia (AP) e do azul da prússia ao verde de Berlim (VB) respectivamente. Nesse caso, tanto o átomo de ferro que faz ligação com o grupo $-\text{CN}$ quanto o ferro que faz ligação com o grupo $-\text{NC}$ na estrutura do hexacianoferrato são eletroativos.

Já no hexacianoferrato de cobre, somente o ferro é eletroativo. O cobre que se liga ao grupo através do nitrogênio (Figura 7) não é eletroativo, pelo menos nas condições experimentais utilizadas. Existem alguns estudos que demonstram a eletroatividade do cobre no hexacianoferrato de cobre sob certas condições específicas. Quando um eletrodo modificado com hexacianoferrato de cobre é ciclado em 0,1M de NH_4Cl entre os potenciais de -0,2 e 1,0V, dois picos redox reversíveis aparecem, um deles referindo-se à transição $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ e o outro à transição $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$ ¹²⁹. Entretanto, esses processos redox, de acordo com o referido artigo não correspondem ao cobre ligado ao nitrogênio do cianeto mas estariam presentes nos buracos da estrutura do hexacianoferrato que se complexam com a amônia.

Outro aspecto importante da eletroquímica dos hexacianoferratos é influência do eletrólito de suporte. Como demonstrado na seção 1.3.1.2, o fluxo de cátions dentro dos canais e buracos dos hexacianoferratos é imprescindível para que se efetue a compensação de cargas. A atividade eletrocatalítica do azul da prússia fica comprometida em meios contendo Na^+ devido ao tamanho desses íons que não poderiam penetrar na sua estrutura para efetuar a compensação de cargas, o que não acontece com o hexacianoferrato de cobre que possui uma estrutura mais aberto.

Este fato pode ser confirmado através da Figura 19, que mostra voltamogramas de um filme de azul da prússia eletrodepositado e de um filme nanoestruturado de hexacianoferrato de cobre, ambos ciclados em KCl e em NaCl.

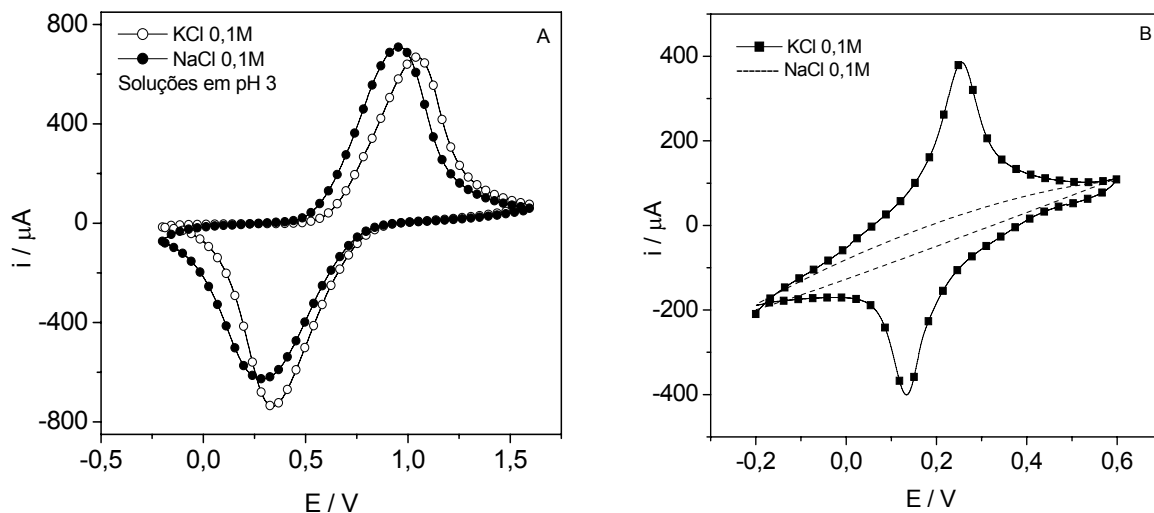


Figura 19: VC de um filme de HexFeCu de 25 bicamadas (A) e de um filme de AP eletrodepositado (B) em 0,1M de KCl e em 0,1M de NaCl; pH = 3,6.

De fato, quando o AP é ciclado em NaCl, nenhum processo redox é observado.

Os filmes automontados de hexacianoferrato de cobre com 25 bicamadas possuem grande eletroatividade em meios contendo Na^+ , além de serem bastante reversíveis, apresentando a relação $Q_{\text{oxi}} / Q_{\text{red}} \sim 1$. No meio contendo K^+ , os picos de oxidação e de redução se encontram em 1,05 V e 0,33 V e no meio contendo Na^+ os mesmos se encontraram um pouco deslocados, em 0,95 V e 0,30 V. Entretanto, estudos feitos com este composto em diferentes meios (Li^+ , H^+ , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Rb^+) por Chen e colaboradores, demonstraram que existe uma grande diferença nas posições dos picos, sendo estes deslocados para potenciais catódicos e perfeitamente simétricos ($E_{\text{Pc}} = E_{\text{Pa}}$). Estudos realizados por Siperko e Kuwana mostraram as mesmas diferenças.

No entanto, os estudos relatados anteriormente tratam de filmes eletrodepositados, enquanto que os resultados apresentados no presente projeto se referem a nanopartículas (depositadas eletrostaticamente) onde mudanças significativas de comportamento podem acontecer devido a simples redução de

tamanho. Além disso, entre as camadas de nanopartículas estão presentes camadas poliméricas de PAH, que possuem caráter isolante, o que provavelmente interferirá no comportamento eletroquímico do eletrodo, principalmente no que diz respeito a processos difusionais.

Foram feitos também voltamogramas cíclicos dos filmes de HexFeCu a cada 5 bicamadas depositadas pelo método LBL com o intuito de avaliar o crescimento do filme assim como a interconectividade entre as camadas. Os resultados se encontram na Figura 20.

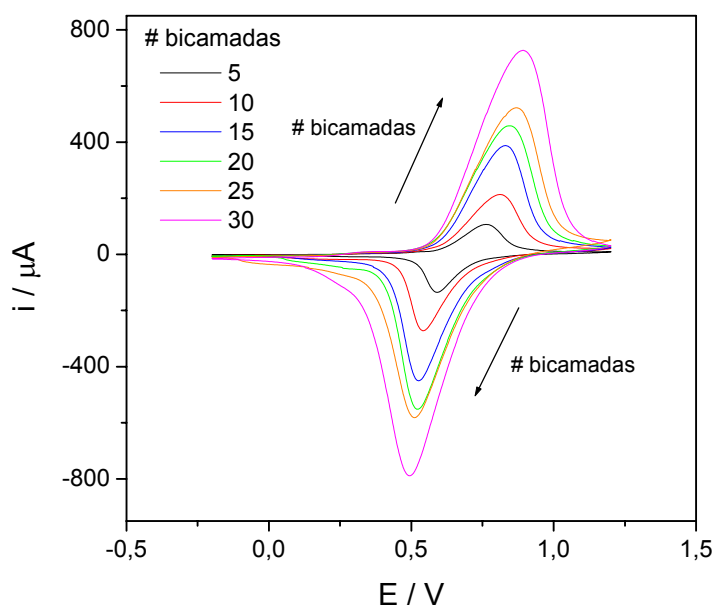


Figura 20: Voltamogramas cíclicos com o filme de HexFeCu. Eletrólito de suporte: KCl (0,1M)+ HCl pH 3. Eletrodo de referência Ag/AgCl_{sat.} Contra-eletrodo de Pt.

Percebe-se que a cada bicamada depositada, a carga no voltamograma aumenta, colocando em evidência que as nanopartículas estão eletricamente conectadas umas às outras, tanto em uma mesma camada como em camadas diferentes. Esse comportamento se deve ao fenômeno muito bem conhecido de interpenetração, com uma superposição entre as camadas adjacentes, permitindo a transferência de carga por todo o filme¹³⁰. Percebe-se também que conforme o

número de bicamadas aumenta, aumenta também a histerese dos filmes que como resultado tem-se distorções maiores entre os picos de redução e oxidação. Esse aumento na resistência acontece pois conforme o número de bicamadas aumenta, a espessura do filme também aumenta, gerando problemas difusionais, e associado a isso, tem-se também o aumento da quantidade de PAH que é um material de caráter isolante, dificultando a transferência de carga. Até pelo menos a trigésima bicamada a conexão elétrica ainda existe, o que é uma vantagem quando se trata da modulação das propriedades eletrocatalíticas em função do número de bicamadas, ou seja em função da quantidade de material depositado.

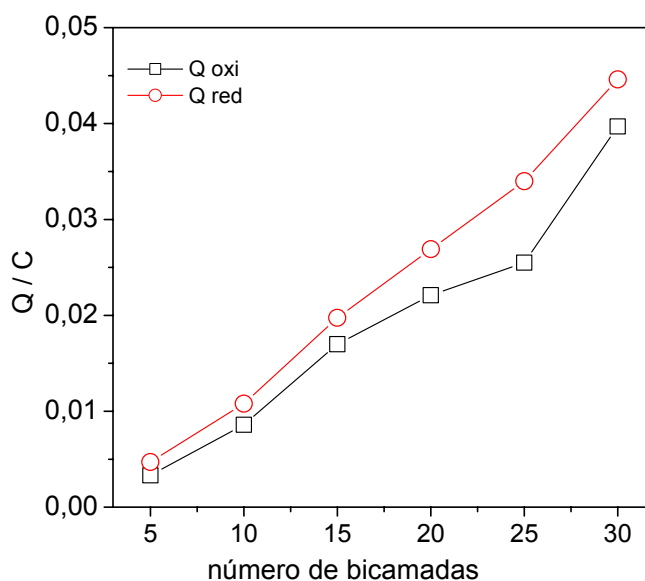


Figura 21: Relação entre carga e número de bicamadas

A Figura 21 mostra como as cargas de redução e de oxidação dos voltamogramas variam em função do número de bicamadas, e como era de se esperar, realmente a carga aumenta quase linearmente com o número de bicamadas.

4.2.1.2. Imobilizaçã por EPD

Também foi avaliado o comportamento eletroquímico dos filmes de hexacianoferrato de cobre cuja técnica de imobilização foi a deposição eletroforética. O resultado pode ser visto na Figura 22, onde um filme com uma hora de deposição foi submetido à voltametria cíclica.

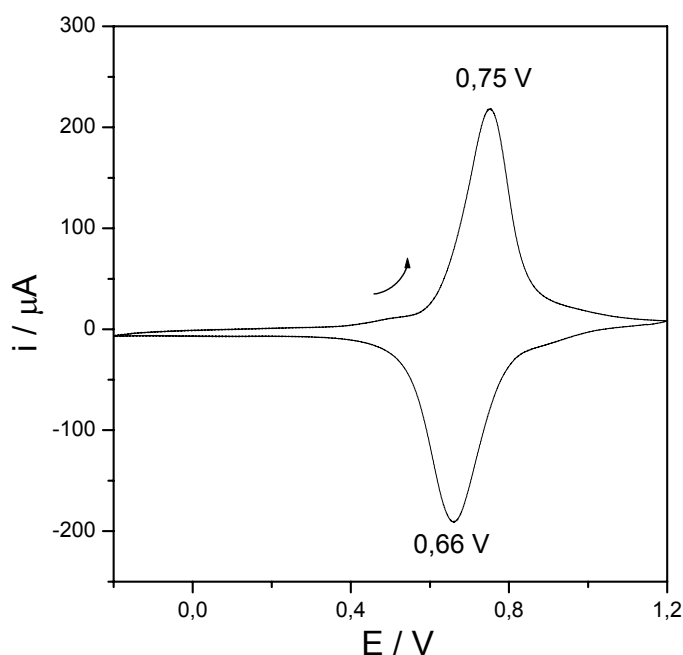


Figura 22: VC de um filme de Hexfecu imobilizado através da deposição eletroforética (1h de deposição, 2 V cm^{-1}).

O filme obtido através da deposição eletroforética apresenta picos de oxidação e redução muito bem definidos e reversíveis. Observe que a diferença de potenciais entre os picos de redução e de oxidação é bem menor para o filme eletroforéticamente depositado ($0,09 \text{ V}$) que para o filme de 5 bicamadas obtido através da técnica LBL ($0,22 \text{ V}$, Figura 18). A carga de oxidação encontrada para o filme obtido pela eletroforese foi de $1,7 \text{ mC cm}^{-2}$ e é menor que para o filme de 5 bicamadas obtido a partir do LBL que foi de $4,6 \text{ mC cm}^{-2}$. Isso porque a quantidade de material imobilizada por EPD foi menor. Além disso, a ausência do PAH, que

possui caráter isolante, propiciou uma melhor transferência de carga através do filme nanoestruturado.

O efeito do tempo de deposição para a técnica de deposição eletroforética também foi avaliado. Foram feitos filmes com tempos de deposição de 1h, 2h e 4h (Figura 23). Quanto maior o tempo de deposição, maior a carga envolvida nos processos de oxirredução e, além disso, os picos permaneceram praticamente no mesmo potencial.

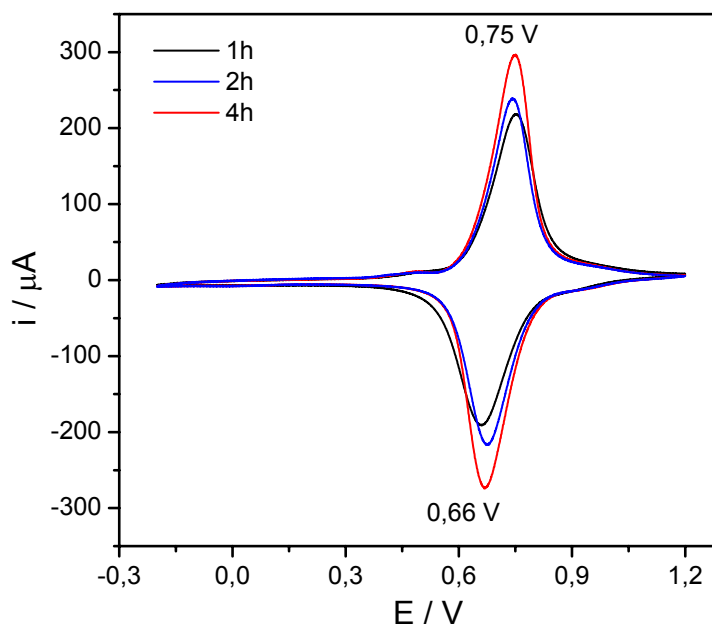


Figura 23: Efeito do tempo de deposição

4.3. Dispositivos Eletrocromicos

Os experimentos eletrocromicos foram feitos a partir da observação de experimentos voltamétricos. Nesses experimentos percebia-se uma mudança na coloração dos eletrodos modificados com as nanopartículas de hexacianoferrato de cobre, quando estes se reduziam e se oxidavam. O comportamento eletrocromico do azul da prússia já é bem conhecido assim como o de suas nanopartículas, então, era de se esperar que o seu análogo, hexacianoferrato de cobre, também apresentasse alguma característica eletrocromica.

A primeira etapa desta parte do projeto foi realizar experimentos de espectroscopia UV-vis "in situ" acoplado a um potenciostato com o intuito de estudar o comportamento do material frente à radiação e também de descobrir qual era a região de maior absorção para que se pudesse realizar os experimentos posteriores. Os espectros feitos com eletrodos modificados por 10 bicamadas de HexFeCu podem ser observados na Figura 24. O eletrodo, quando em potencial de circuito aberto (0,65V), apresenta uma coloração marrom. Quando é oxidado, começa a ficar com um tom alaranjado. Os dados espectroeletroquímicos confirmam esses fatos; a intensidade da banda em 510 nm diminui com o aumento simultâneo da banda em 406 nm.

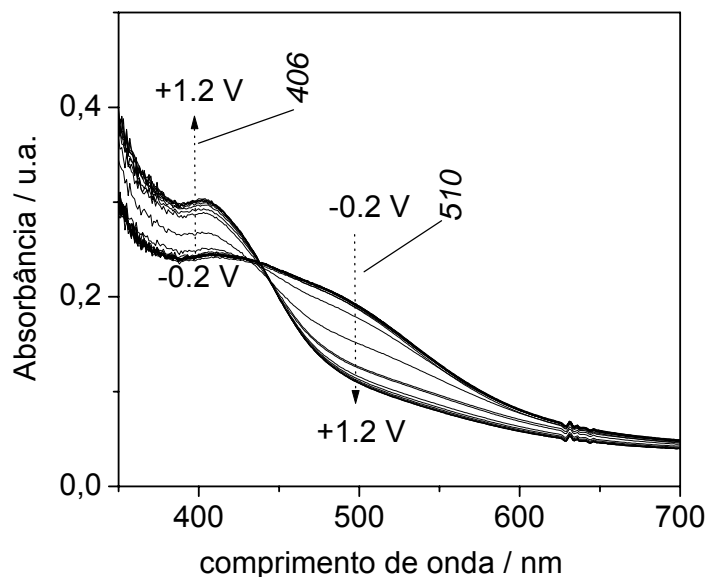


Figura 24: Espectros de absorção “in situ” de um eletrodo modificado por HexFeCu, 10 bicamadas. Utilizando Pt como contra-eletrodo e Ag/AgCl como referência. Eletrólito KCl 0,1 M / pH 3.

Desse modo, as medidas potenciodinâmicas “in situ” seguintes foram realizadas utilizando-se radiação monocromática verde (comprimento de onda de 510 nm), região esta que apresentou a maior absorção de radiação, de acordo com a Figura 24.

A Figura 25 mostra voltamogramas cíclicos e a variação de absorbância simultânea, realizados com eletrodos de 5, 10 e 20 bicamadas. O processo anódico que acontece em aproximadamente 0,79V é acompanhado por uma diminuição no valor da absorbância até um valor de 0,031, descolorindo o eletrodo. A onda catódica localizada em aproximadamente 0,57V produz uma variação de absorbância, no caso do filme de 5 bicamadas, de 0,031 até 0,051 deixando o eletrodo com uma tonalidade mais escura. A repetição dos ciclos voltamétricos permitiu concluir que os processos de coloração e de descoloração são totalmente reversíveis, já que a absorbância inicial foi totalmente restaurada ao final da reação redox do material.

Observa-se novamente que à medida que as bicamadas crescem, as cargas dos voltamogramas aumentam. Além disso, esse experimento mostra que a variação

de transmitância também varia em função do número de bicamadas. Cresce também a histerese na transmitância, provavelmente provocada pela dificuldade que se cria para que os processos difusionais ocorram em consequência do aumento da espessura do filme.

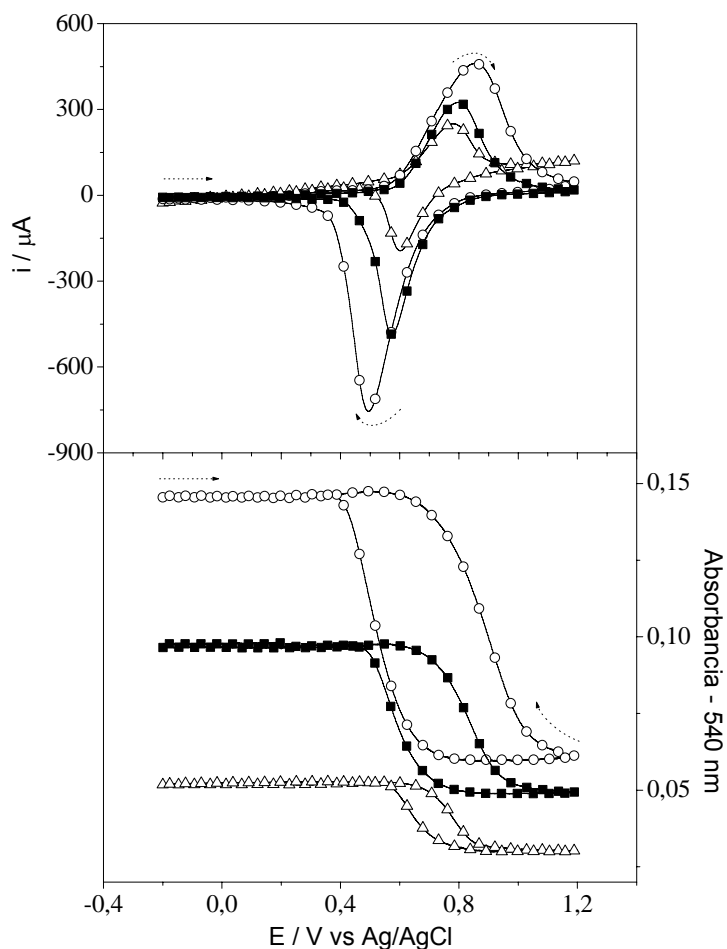


Figura 25: Voltamogramas “in situ” de eletrodos modificados por diferentes números de bicamadas de HexFeCu. Eletrólito KCl 0,1 M, pH 3. Utilizando Pt como contra-eletrodo e Ag/AgCl como referência, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

A eficiência electrocrômica (contraste electrocrômico por carga) encontrada para um eletrodo de 20 bicamadas de hexacianoferrato de cobre foi de $3,8 \text{ cm}^2 \text{ C}^{-1}$. Este valor não é tão alto se comparado com aquele para o PB, reportado por Hammond. Isso pode ser explicado considerando que, nesse caso, o contraste cromático baixo

está relacionado à transição de $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ para $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ que equivale à transição da forma AP para a VB no hexacianoferrato de ferro, ou seja, é a oxidação do ferro ligado ao carbono. O alto contraste óptico obtido para o hexacianoferrato de ferro é proveniente da transição do BP para o AP ($\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ para $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$) que é a oxidação do ferro ligado ao nitrogênio.

Para efeito de comparação, a figura a seguir mostra a resposta electrocrômica para um filme fino de azul da prússia eletrodepositado. Nela observa-se as transições $\text{BP} \longrightarrow \text{AP} \longrightarrow \text{VB}$. Nota-se que o contraste cromático referente ao processo redox do PB ao BG é bem menor que o do BP ao AP.

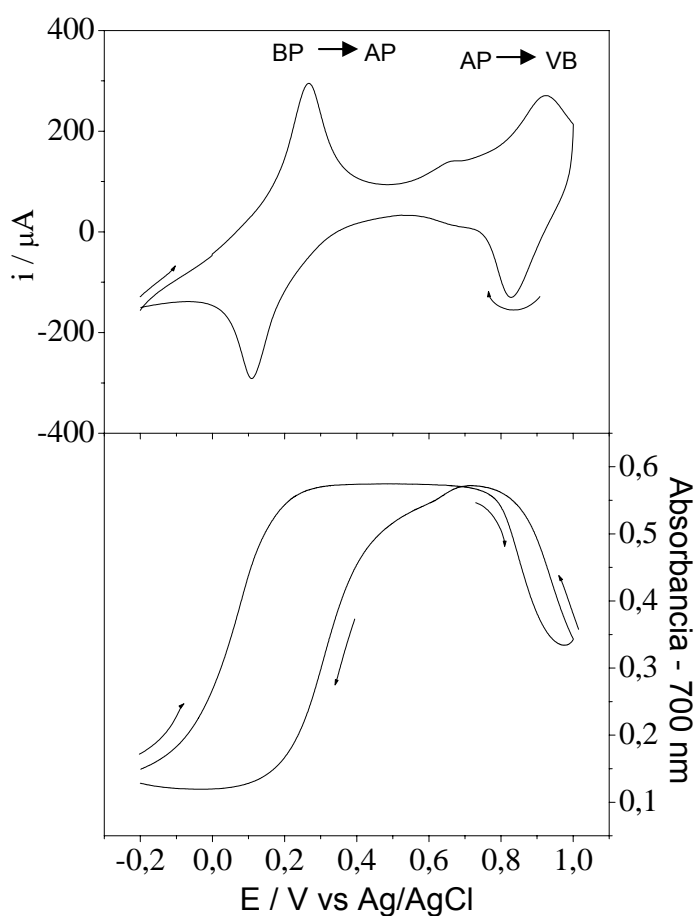


Figura 26: Voltamogramas “in situ” de eletrodos modificados por azul da prússia eletrodepositado. Eletrólito KCl 0,1 M, pH 3, Ag/AgCl como referência, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

A Figura 27 relaciona o voltamograma com variação de absorbância. Observa-se a coincidência de picos de máximo de corrente catódica e a curva diferencial de absorbância. Porém, a variação de corrente anódica não demonstra o mesmo resultado, ou seja, a variação de absorbância não foi simultânea á variação de corrente, onde existe uma diferença de picos de 50 mV, indicando que a velocidade de injeção de carga ocorre mais rapidamente que a mudança cromogênica. Esse fato pode estar relacionado com a compensação de cargas na oxidação, que leva a perda de massa do filme devido a saída dos cátions para a solução eletrolítica, sendo que esta saída não ocorre de maneira suficientemente rápida resultando também em um pico anódico mais largo que o catódico.

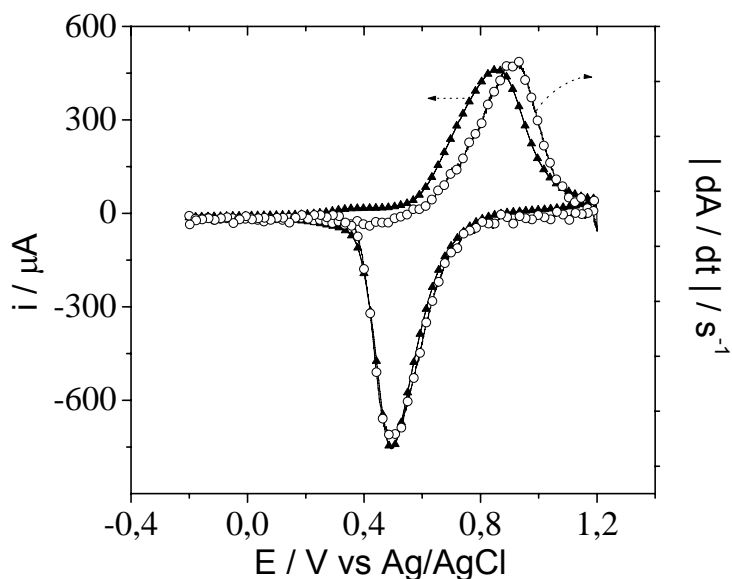


Figura 27: Perfis de(-▲-) i/E e de (-○-) $dA/dt/dE$ para um eletrodo modificado por 20 bicamadas

Tal comportamento certamente configura numa diferença nos processos de compensação de cargas entre a redução e a oxidação; a inserção de íons quando o filme é reduzido se dá de maneira praticamente simultânea á coloração, fato este que não se observa na descoloração (oxidação) onde os íons não são tão facilmente

expulsos da estrutura do filme. Esse fato provoca um descompasse entre o processo eletroquímico (oxidação) e o cromogênico (descoloração), sendo essa uma característica comum em filmes poliméricos, como no caso da poli(anilina)¹³¹.

O desempenho electrocrômico foi avaliado de acordo com o tempo de resposta que pode ser definido como o tempo necessário para mudar em 2/3 do valor total da variação de transmitância, a partir de seu valor inicial. Esse experimento (Figura 28) consiste em aplicar o potencial para que ocorra oxidação (1,2V) descolorindo o eletrodo, mantendo por algum tempo este valor de potencial, e posteriormente aplicando o potencial para que ocorra redução (-0,2V), colorindo o filme.

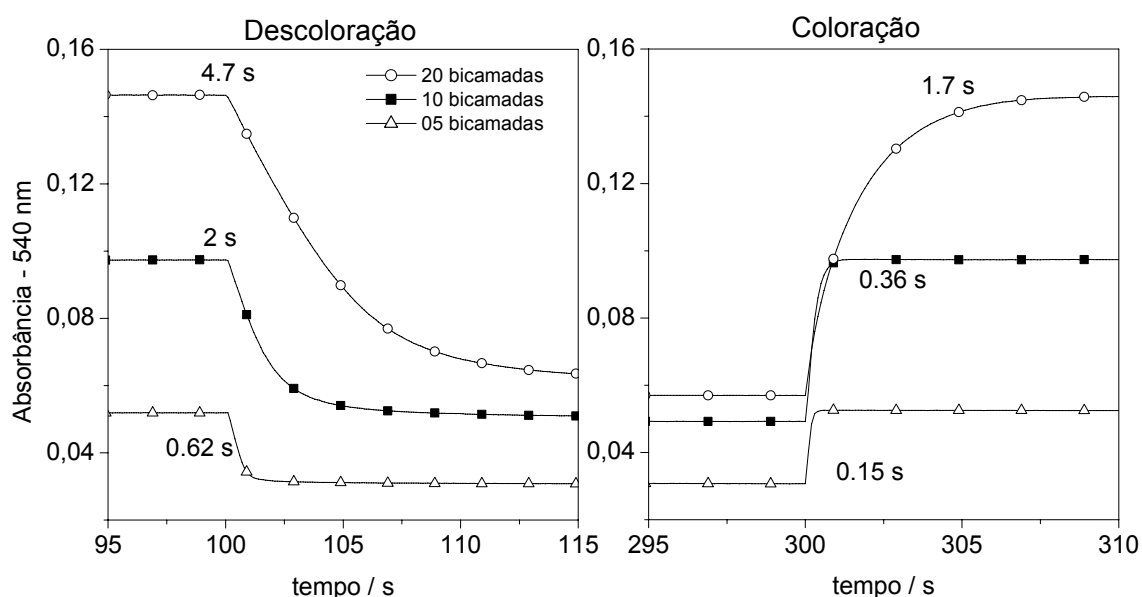


Figura 28: Tempos de resposta para eletrodos modificados com diferentes números de bicamadas. Para a descoloração foi aplicado um potencial de 1,2 V e para a descoloração -0,2 V, utilizando Ag/AgCl como referência e Pt como contra eletrodo. Eletrólito KCl 0,1 M - pH 3.

O primeiro processo electrocrômico é a descoloração. As variações totais de transmitância são de 5, 9 e 15% para os eletrodos com 5, 10 e 20 bicamadas respectivamente. Os valores encontrados para a descoloração foram de 0,62, 2 e 4,7 segundos e para a coloração foram de 0,15, 0,36 e 1,7 segundos para os

eletrodos de 5, 10 e 20 bicamadas. Observa-se novamente que com o aumento do número de bicamadas os tempos de repostas também aumentam devido ao aumento de material adsorvido sobre o eletrodo tornando mais difícil a difusão dos íons do eletrólito de suporte do/para o interior do filme, especialmente para as primeiras camadas.

Também pode ser observado que os tempos de resposta da descoloração (oxidação) são pronunciadamente superiores aos da coloração (redução), independentemente do número de bicamadas. Tal comportamento é consequência provável da diferente relaxação do material quando submetido à redução e à oxidação, dando suporte à suposição de que o transporte de massa dentro do filme é mais lento durante o processo de oxidação, como discutido anteriormente.

Hammond também analisou esses aspectos para eletrodos de PB nanoestruturados e encontrou tempos de respostas maiores conforme o número de bicamadas aumentava. Os valores encontrados por Hammond para os filmes finos de PB para o primeiro processo redox ($\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ para $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$) são da mesma ordem que os encontrados aqui para as nanoestruturas de hexacianoferrato de cobre, apesar do processo redox para este último ser equivalente à transição AP /VB, que é notavelmente mais lento que o AP/VB.

Outra observação importante em relação aos eletrodos de AP é que os tempos de resposta de descoloração também são superiores aos de coloração, indicando que a ejeção/inserção de íons do/para a matriz de hexacianoferrato de cobre ocorrem com constantes de tempo diferentes.

Os tempos de respostas para os eletrodos nanoestruturados, tanto de AP quanto de HexFeCu, são menores que para os filmes sem nanoestruturação. Isto deve estar relacionado tanto à geometria quanto às dimensões das partículas, onde

a alta relação superfície/volume faz com que uma porção maior de sítios ativos estejam disponíveis na superfície. Considerando, também, que o eletrocromismo é um processo de estado sólido, o caminho de difusão é diminuído devido às dimensões reduzidas das partículas.

O filme com nanopartículas de hexacianoferrato de cobre demonstrou excelente durabilidade e reversibilidade promovida pela alta aderência das camadas ao eletrodo, não sendo observado nenhum desprendimento, mesmo quando lavado com fortes jatos de água. Essa é uma das vantagens do método de deposição eletrostática camada por camada onde as atrações muito fortes promovem a alta aderência entre as camadas.

Quando o filme nanoestruturado de azul da prússia é submetido a longos ciclos de redução/oxidação, o contraste cromático decai indefinidamente, para o processo redox AP/VB. Este é um dos motivos para que os filmes de azul da prússia sejam utilizados, com fins de aplicação prática, restritamente no processo que envolve a transição BP/AP. A razão para esta perda foi atribuída à gradual desestabilização do filme sob sucessivos ciclos de oxidação e redução. O filme uma vez oxidado, forma-se $\text{Fe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$, diminuindo o excesso de carga negativa das nanopartículas, com a concomitante perda da atração eletrostática com o polícatión, levando a expulsão das nanopartículas da estrutura do filme e conseqüentemente à diminuição do contraste eletrocromico. Este fato, já não acontece com os filmes de HexFeCu, pois, mesmo no estado totalmente oxidado ($\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$), ainda existe um excesso de carga superficial negativa promovida pelos grupos cianetos livres, o suficiente para manter a estabilidade eletrostática do filme.

Como pode ser visto na Figura 29 onde eletrodos de 15, 20 e 25 bicamadas foram submetidos a sucessivos ciclos de redução e oxidação e a variação de

transmitância permaneceu praticamente a mesma durante todo o tempo de experimento.

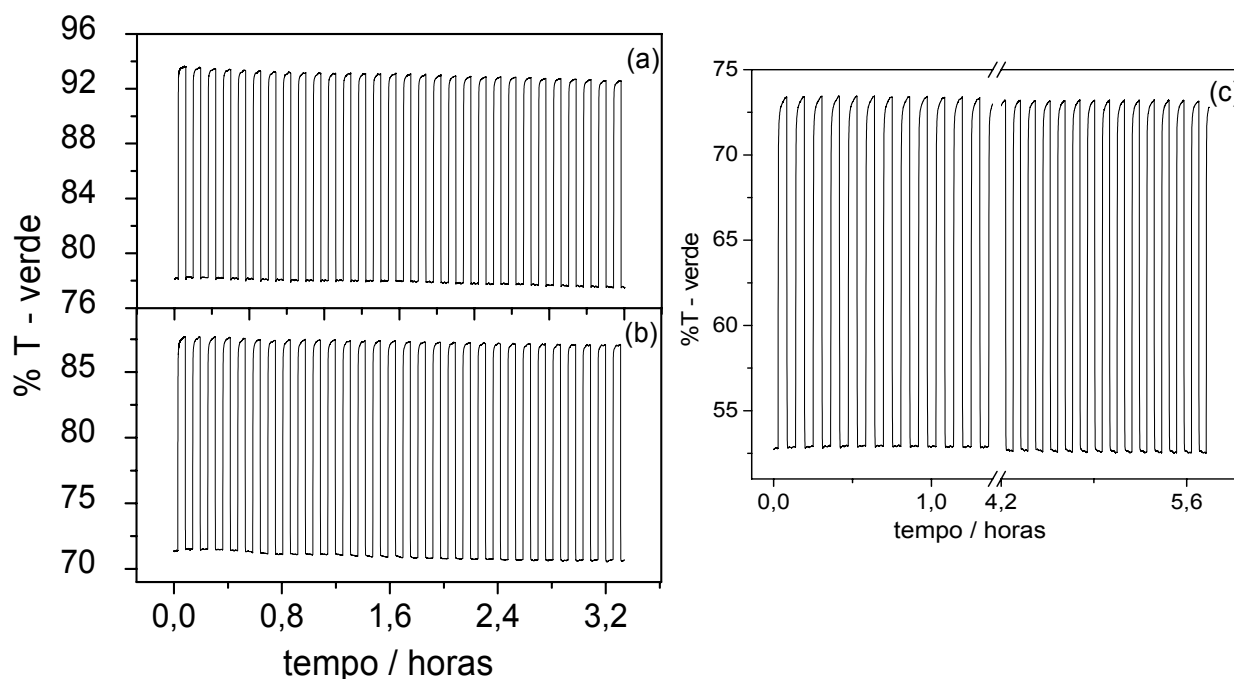


Figura 29: Testes de durabilidade dos eletrodos modificados por (a) 15 e (b) 20 e 25 (c) bicamadas.

O eletrodo com 25 bicamadas apresentou uma grande durabilidade electrocrômica permanecendo estável por um longo período de tempo, sendo que ao final de quase 6 horas de experimento, a diferença de transmitância permaneceu praticamente inalterada com um valor de 21%.

Dois resultados importantes podem ser obtidos da análise electrocrômica. Um deles é o baixo contraste electrocrômico e a alta carga envolvida nos processos de redução e oxidação, levando a uma baixa eficiência electrocrômica para os filmes de HexFeCu. O contraste dos filmes automontados de azul da prússia que chegam a 55,5% para um eletrodo de 25 bicamadas. Outro resultado é a alta durabilidade e reversibilidade encontrada para os filmes de HexFeCu se comparado também aos filmes de AP que perdem parcialmente seus contrastes ópticos em apenas alguns minutos devido a baixa aderência ao eletrodo. Esses resultados permitem cogitar a

utilização dos filmes de HexFeCu como contra-eletrodos, já que para esse fim não se precisa necessariamente de altos contrastes eletrocromicos.

4.4. Biossensores de glicose

As nanopartículas de hexacianoferrato de cobre também foram utilizadas para fins eletrocatalíticos, sendo empregadas para mediar a eletrorredução do peróxido de hidrogênio que é o subproduto da reação enzimática da glicose oxidase com a glicose.

A primeira etapa a ser realizada foi, portanto, avaliar o desempenho das nanopartículas de Hexfecu frente ao peróxido de hidrogênio

4.4.1. Detecção de Peróxido de Hidrogênio

A detecção amperométrica para peróxido de hidrogênio pode ser vista na Figura 30. O filme modificado por 30 bicamadas de hexacianoferrato de cobre e PAH mostrou atividade eletrocatalítica na presença de H_2O_2 . A sensibilidade encontrada foi de $31,45 \mu\text{A mmol}^{-1}\text{L cm}^{-2}$. Este resultado foi 200 vezes maior que o obtido para o hexacianoferrato de cobre sintetizado quimicamente e imobilizado em eletrodo de carbono vítreo ($0,14 \mu\text{A mmol}^{-1}\text{L cm}^{-2}$). São também comparáveis às sensibilidades utilizando-se eletrodos modificados por nanopartículas de azul da prússia/ PAH (depositadas também pela técnica LBL), cujas sensibilidades obtidas foram de 35,4; 76,8 e $103,5 \mu\text{A mmol}^{-1}\text{L cm}^{-2}$ para filmes com 5, 10 e 15 bicamadas, respectivamente.

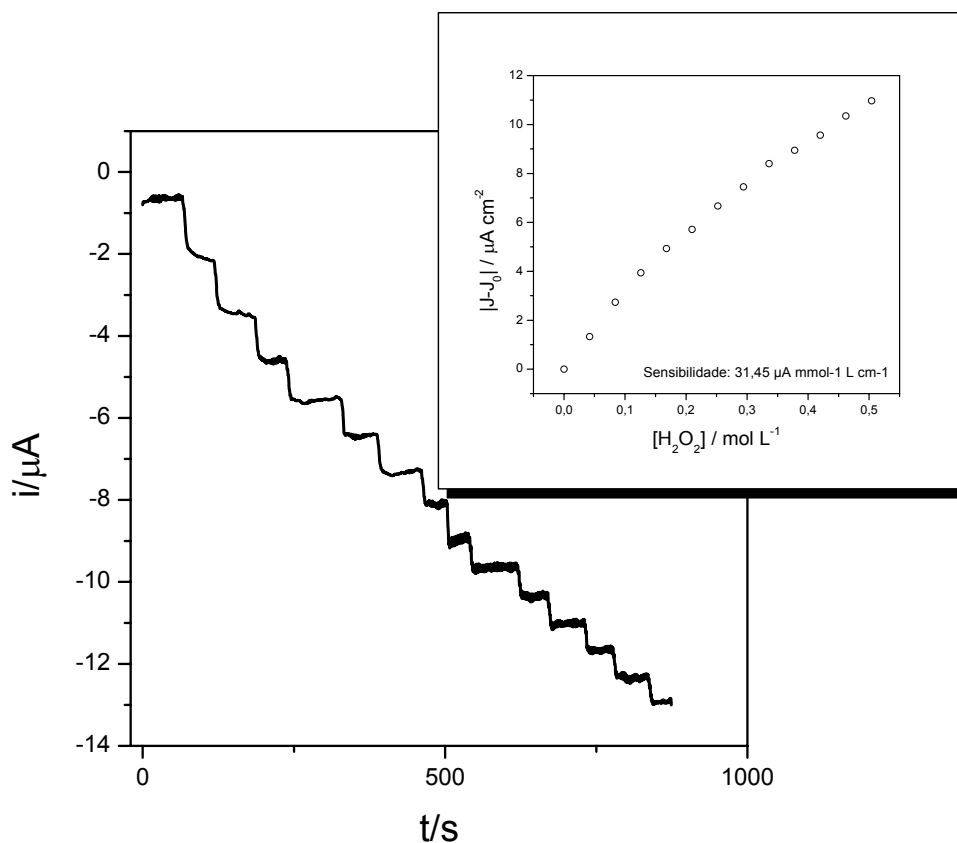


Figura 30: Resposta amperométrica para H₂O₂ (0,1 mol L⁻¹) em um eletrodo de ITO modificado com 30 bicamadas de nanopartículas de Hexfecu e PAH, em solução de KCl (0,1M) e HCl, pH = 3,6.

Outro resultado importante é o aumento progressivo da sensibilidade em função da quantidade de material depositado, ou seja, do número de bicamadas de Hexfecu / PAH. Os eletrodos de 5, 15, 20 e 30 bicamadas apresentaram sensibilidades de 11,68; 22,04; 29,65 e 31,45 $\mu\text{A mmol}^{-1}\text{L cm}^{-2}$ respectivamente (Figura 31).

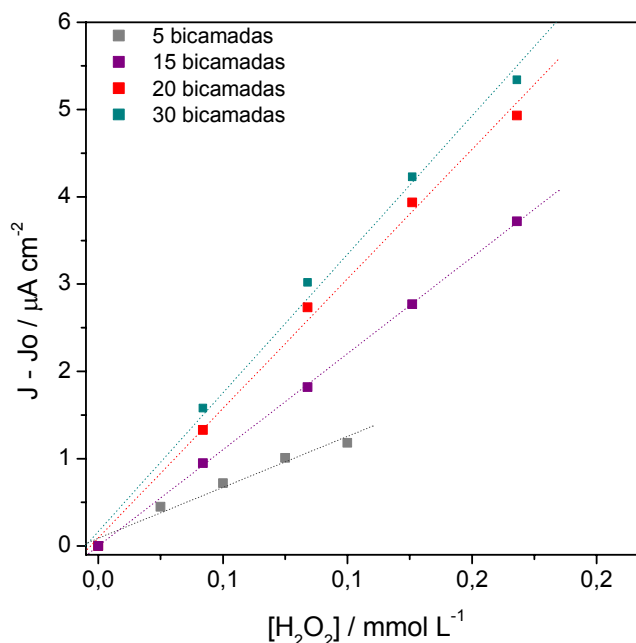


Figura 31: Variação da sensibilidade em função do número de bicamadas

Esses valores demonstram a praticidade e a versatilidade do método de deposição camada por camada já que a sensibilidade do sensor pode ser ajustada ao valor desejado simplesmente variando a quantidade de bicamadas depositadas.

4.4.2. Detecção de Glicose

Para a detecção de glicose foi preciso imobilizar a enzima sobre os eletrodos com as nanopartículas previamente imobilizadas através dos métodos anteriormente descritos (LBL e deposição eletroforética). Para tanto, dois diferentes métodos foram utilizados. Um deles foi a automontagem eletrostática (LBL) onde intercala-se o polieletrólito positivo PAH e a enzima glicose oxidase com carga negativa adquirida através do ajuste do pH para 7. O outro método foi o crosslinking que utiliza um agente de ligação cruzada, no caso o glutaraldeído, e um estabilizante, o BSA, além da enzima, como descrito previamente na seção experimental.

4.4.2.1. Método de Imobilização LBL

Através do método LBL de imobilização tanto das nanopartículas quanto da enzima pôde-se avaliar a influência de cada componente (nanopartículas ou enzima) no biossensor. Para tanto, variou-se o número de bicamadas de nanopartículas mantendo o número de bicamadas de enzima constante e posteriormente fez-se o inverso. A figura a seguir ilustra a arquitetura utilizada para montar o biossensor.

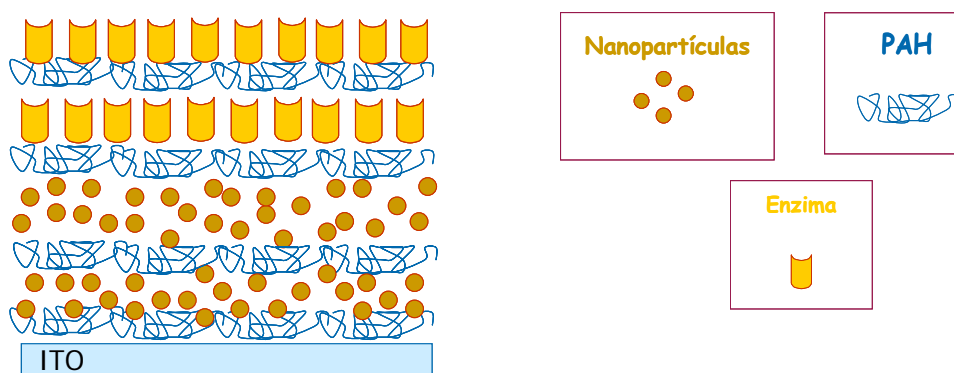


Figura 32: Arquitetura de imobilização das nanopartículas e da enzima glicose oxidase

A seguir, na Figura 33, pode-se observar uma detecção amperométrica de glicose e também sua curva de sensibilidade para um eletrodo de 20 bicamadas de nanopartículas e 5 bicamadas enzima. O volume da célula eletrolítica foi de 8 mL, a área do eletrodo de $0,25 \text{ cm}^2$ e a cada adição a concentração de glicose aumentava de $0,625 \text{ mM}$ na célula.

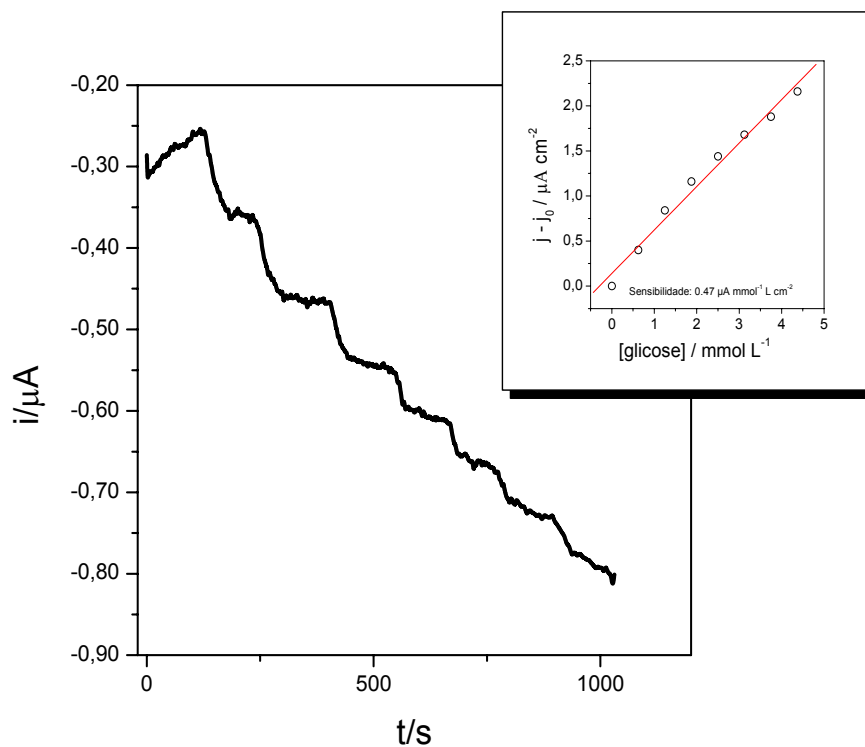


Figura 33: Detecção amperométrica de glicose em um eletrodo de 20 bic. de nanopartículas e 5 bicamadas de enzima. Solução de KCl (0,1M) e HCl, pH = 7,0 a 0,0V.

A tabela a seguir mostra a variação independente do número de bicamadas de nanopartículas e de enzima, com as suas respectivas sensibilidades.

Tabela 2: Sensibilidades para os biossensores de glicose

Método de Imobilização		
LBL		
Bicamadas de nanopartículas	Bicamadas de Gox	Sensibilidade $\mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$
10	3	0.20
10	9	0.43
10	5	0.32
15	5	0.41
20	5	0.47
25	5	1.41

A análise da Tabela 2 permite obter um resultado importante com relação à influência de cada componente (nanopartículas e enzima) no biossensor. Quando se mantem o número de bicamadas de nanopartículas constante e varia-se o número de bicamadas de enzima, a sensibilidade também varia, indicando que a quantidade de enzima é um fator importante para o biossensor. Quando a quantidade de enzima aumenta até o número de bicamadas igual a 5, a sensibilidade igualmente aumenta. Porém, para 9 bicamadas de enzima, apesar de a sensibilidade aumentar, a detecção se torna lenta e praticamente sem definição, como pode ser visto na Figura 34 para um eletrodo com 9 bicamadas de enzima. Esse fato pode ser atribuído ao aumento da quantidade de PAH (de caráter isolante) sem conexão com as nanopartículas condutoras. Além disso, a camada de PAH na superfície do biossensor dificulta também a difusão iônica através do eletrodo.

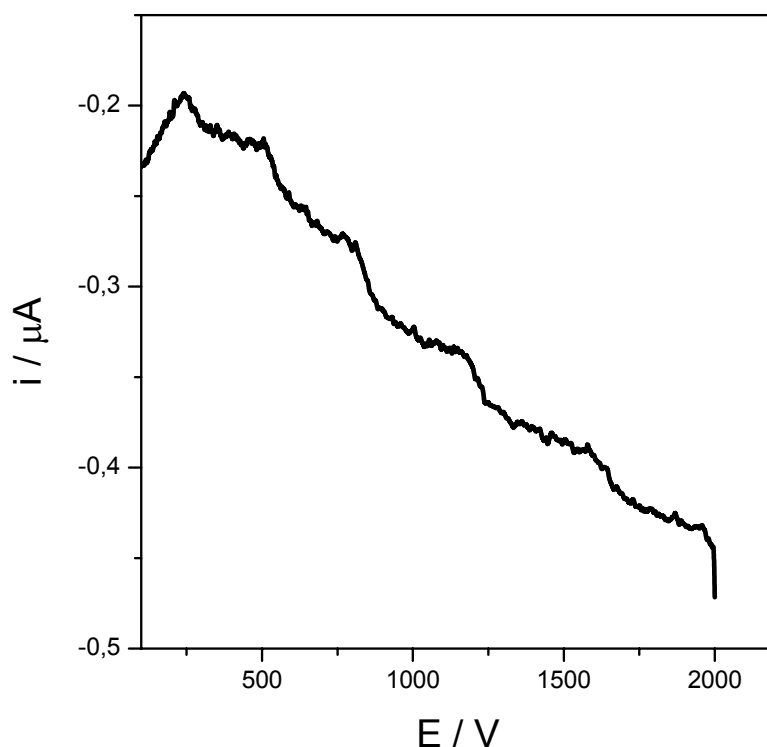


Figura 34: Detecção amperométrica de glicose para um eletrodo com 10 bic. de Hexfecu e 9 de enzima.

Voltando à análise da Tabela 2, como o número de bicamadas de enzima ideal encontrado foi de 5, decidiu-se manter esse número constante e variou-se o número de bicamadas de nanopartículas. A sensibilidade, nesse caso, também variou. Quanto maior o número de bicamadas de nanopartículas, maior a sensibilidade. Nesse caso, como o número de bicamadas não é um fator limitante para a sensibilidade, como foi no caso da enzima, pôde-se concluir de tal análise que a quantidade de nanopartículas de Hexfecu é o fator preponderante para melhorar os resultados quanto à performance do biossensor.

Apesar do método LBL de imobilização da enzima ter sido importante para a análise de alguns parâmetros do biossensor, não foi muito eficiente quanto a detecção amperométrica, que como já dito anteriormente possui uma quantidade de material não condutor (PAH) na superfície dificultando o transporte de elétrons e de íons pelo eletrodo. Entretanto, a técnica LBL é muito versátil, e em função da dificuldade de transporte na superfície do eletrodo decidiu-se mudar a arquitetura das camadas na tentativa de buscar mais resultados com relação ao comportamento eletroquímico e eletrocatalítico do biossensor. Desta vez, as camadas de enzima e de nanopartículas se intercalaram desde o começo e assim permaneceram até a superfície. A ilustração a seguir permite um melhor entendimento dessa nova arquitetura de deposição.

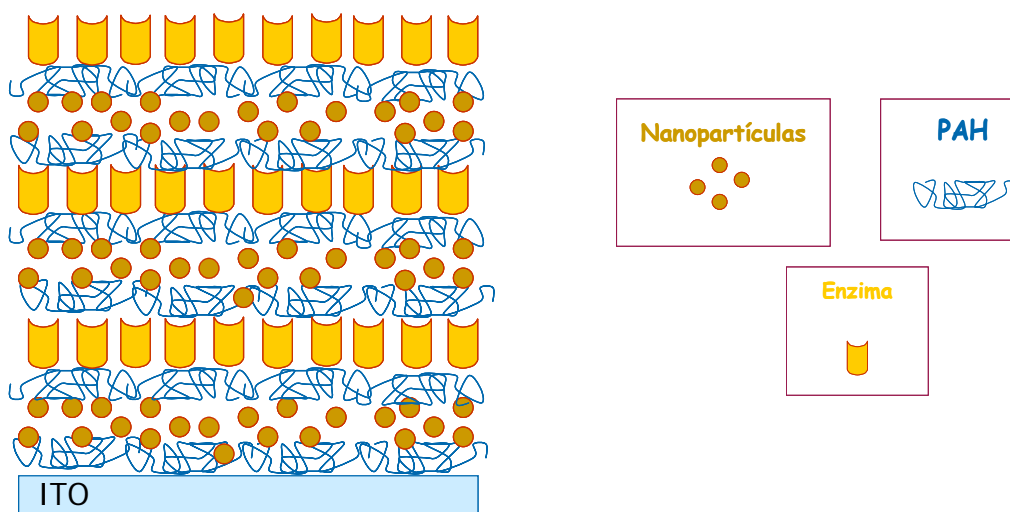


Figura 35: Arquitetura alternada de deposição das nanopartículas de Hexfecu e da enzima glicose oxidase

O resultado de uma detecção amperométrica a baixo potencial de glicose para um eletrodo modificado de acordo com a arquitetura disposta na ilustração anterior se encontra na Figura 36. Percebe-se que a sensibilidade melhorou, contudo, a detecção se tornou mais imprecisa, ruidosa e lenta. O que se pode inferir neste caso é que a conexão não esteja tão boa devido a uma camada adicional de material não condutor (enzima e PAH) entre as camadas de nanopartículas condutoras.

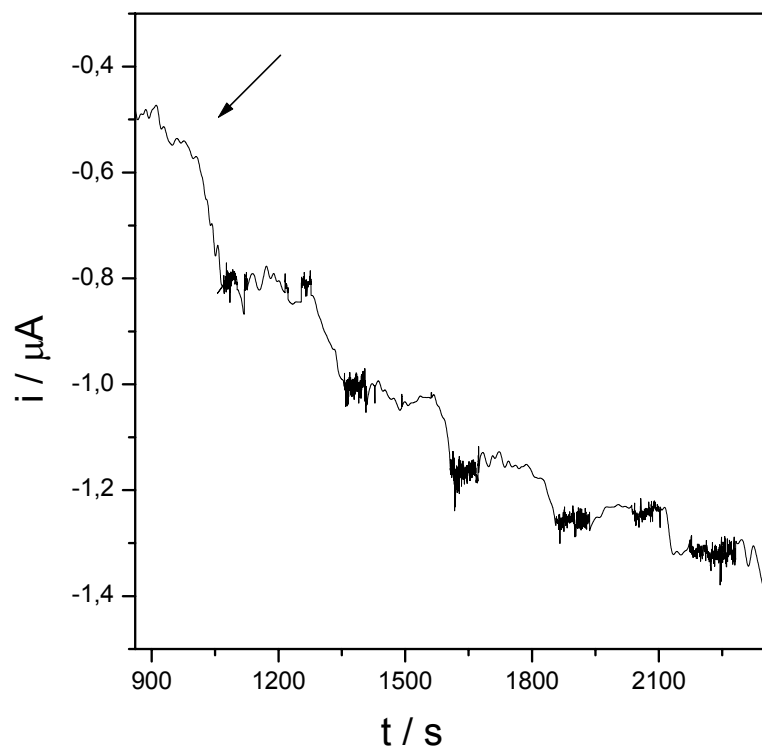


Figura 36: Detecção amperométrica de glicose para um eletrodo com 10 bic de Hexfecu e 5 bic de enzima dispostos alternadamente. Solução de KCl (0,1M) e HCl, pH = 7,0 a 0,0V

4.4.2.2. Método de imobilização crosslinking

Com o intuito de melhorar o desempenho do biossensor baseado em nanopartículas de HexFeCu, decidiu-se tentar uma nova maneira de imobilizar a enzima glicose oxidase sobre o eletrodo modificado pelas bicamadas.

A técnica de crosslinking consiste em adicionar uma mistura de glutaraldeído (agente de ligação cruzada), enzima e um estabilizante (BSA) sobre o eletrodo previamente modificado por n bicamadas de nanopartículas de HexFeCu. Um dos resultados pode ser visto na seguinte figura:

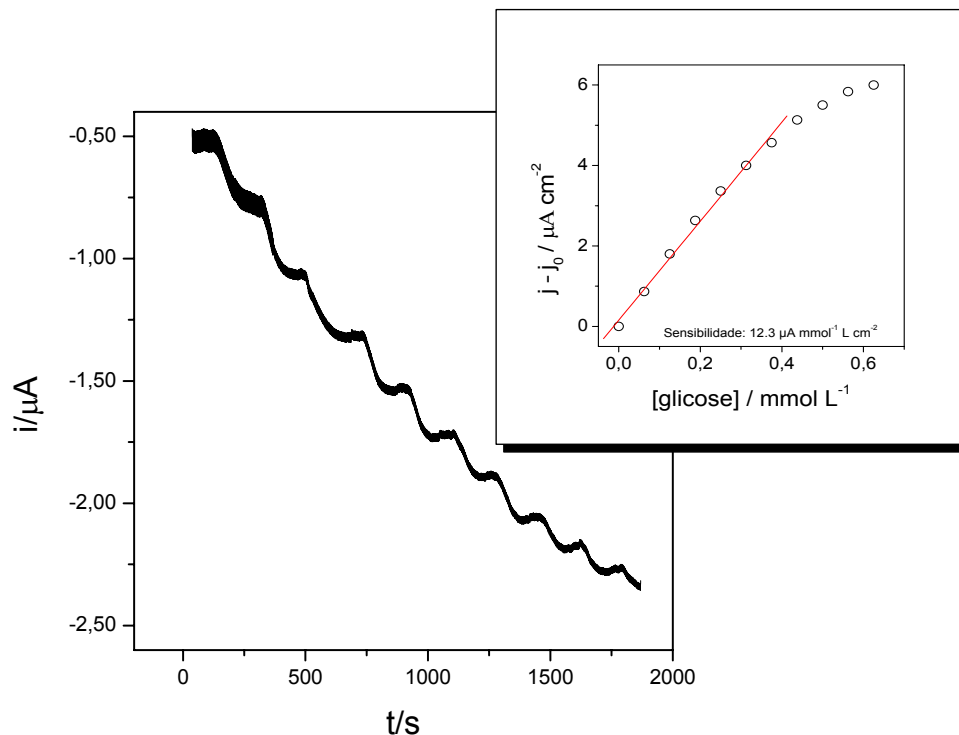


Figura 37: Detecção amperométrica de glicose para um eletrodo com 10 bic de HexFeCu + enzima pelo método crosslinking. Solução de KCl (0,1M), pH = 7,0 a 0,0V

O experimento anterior foi feito com um eletrodo modificado por 10 bicamadas de HexFeCu e a enzima glicose oxidase imobilizada através do método crosslinking. Nota-se que a sensibilidade aumentou bastante ($12,3\mu\text{A mmol}^{-1}\text{L cm}^{-2}$) e, além disso, a detecção se tornou muito mais rápida e também muito menos ruidosa em relação às detecções anteriores. Este fato pode ser consequência da maior quantidade de enzima imobilizada por este método, além da maior estabilidade conferida pela presença do BSA.

Outro fato que também pode ser observado a partir da comparação dos resultados obtidos pelas duas técnicas de imobilização da enzima é a diferença do intervalo de resposta linear. Para o método LBL, esse intervalo foi de 0 - 5 mM e para o método de glicose oxidase foi de 0 a 0,5 mM, ou seja, uma diferença de dez vezes. Apesar do método LBL não ter tido uma performance tão boa quanto a sensibilidade para glicose, a comparação permite obter informações com respeito à

acessibilidade do substrato à enzima. Para o método LBL, essa acessibilidade parece ser dificultada pelas camadas adjacentes de PAH. Além disso, a quantidade de enzima imobilizada por LBL é menor que por crosslinking.

A tabela a seguir relaciona as sensibilidades obtidas para diferentes quantidades de nanopartículas imobilizadas.

Tabela 3: Sensibilidades para os biossensores de glicose

Método de Imobilização		
Crosslinking: com glutaraldeído e BSA		
Bicamadas de nanopartículas	Concentração da Gox	Sensibilidade $\mu A \text{ mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$
5	10mg mL ⁻¹	6.65
10	10mg mL ⁻¹	12.30
20	10mg mL ⁻¹	14.91

Novamente, a tendência para o aumento da sensibilidade é acompanhada pelo aumento na quantidade de nanopartículas imobilizadas, confirmando os indícios obtidos anteriormente de que HexFeCu nanoparticulado é bastante importante para a performance do biossensor.

O método crosslinking de imobilização de enzimas também foi testado para os eletrodos cuja imobilização das nanopartículas ocorreu por deposição eletroforética. Utilizou-se diferentes tempos de deposição eletroforética para imobilizar as nanopartículas e posteriormente adicionou-se a mistura de enzima, glutaraldeído e BSA (nas mesmas concentrações já mencionadas). Os eletrodos foram deixados em repouso por 5 dias para em seguida serem realizados os testes amperométricos para glicose. A figura a seguir mostra a detecção amperométrica de

glicose para um eletrodo com 3h de deposição eletroforética e com a enzima glicose oxidase imobilizada pelo método crosslinking.

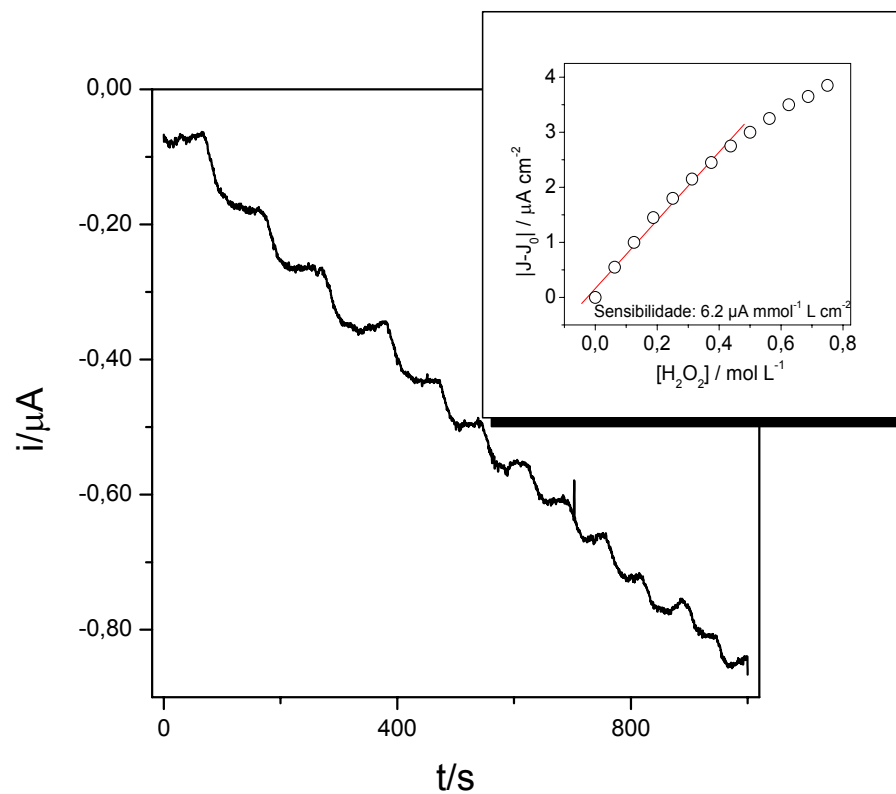


Figura 38: Detecção amperométrica de glicose para um eletrodo com 3h de deposição eletroforética de Hexfecu + enzima pelo método crosslinking. Solução de KCl (0,1M), pH = 7,0 a 0,0V.

A tabela a seguir exhibe as sensibilidades obtidas para os diferentes tempos de deposição das nanopartículas de HexFeCu.

Tabela 4: Sensibilidades para os biossensores de glicose (EPD)

Métodos de imobilização		
Deposição eletroforética (HexFeCu) / Crosslinking (Gox)		
Tempo de Deposição (h)	Concentração da Gox	Sensibilidade $\mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$
1	10mg mL^{-1}	2,51
2	10mg mL^{-1}	4,71
3	10mg mL^{-1}	6,20
4	10mg mL^{-1}	6,13

De posse das sensibilidades obtidas pelos dois diferentes métodos de imobilização das nanopartículas (LBL e EPD), uma comparação entre as sensibilidades apresentadas por esses pode ser feita. Pelos dados mostrados nas tabelas acima, a sensibilidade de um eletrodo modificado por LbL – 5 bicamadas foi encontrada como sendo de $6,65 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$, valor absoluto semelhante ao encontrado para a modificação por EPD – 3 horas, que foi de $6,62 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$.

Contudo, se analisarmos os voltamogramas destes dois eletrodos modificados, encontraremos diferentes cargas elétricas envolvidas nos processos redox. Para o eletrodo LbL, foi obtida uma carga de redução de $4,6 \text{mC cm}^{-2}$, e para o EPD de $1,7 \text{mC cm}^{-2}$. Como a carga elétrica é uma medida direta da quantidade de material adsorvida sobre o eletrodo, podemos normalizar as sensibilidades, ou seja, dividir as sensibilidades pelas respectivas cargas voltamétricas, dos eletrodos pela quantidade de material contida nos mesmos.

As sensibilidades corrigidas encontradas para o LBL e para o EPD foram de $1,45 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2} \text{mC}^{-1}$ e $3,65 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2} \text{mC}^{-1}$ respectivamente, mostrando uma melhor eficiência de detecção para os eletrodos modificados por EPD. Além disso, a detecção é mais rápida e melhor definida, o que pode ser

explicado pela ausência de material não condutor entre as nanopartículas (PAH), melhorando a condução eletrônica e o transporte de íons pelo eletrodo.

Um outro aspecto da detecção utilizando a EPD como método de imobilização das nanopartículas é o aumento da sensibilidade em função do tempo de deposição. Quanto maior o tempo de deposição, maior a sensibilidade, já que com o aumento do tempo de deposição, a quantidade de nanopartículas também aumenta, revelando, deste modo, que assim como o método LBL, o EPD também é um método versátil.

Como esperado, a sensibilidade não aumenta indefinidamente com o aumento do tempo de deposição. Quando o tempo de deposição chega a 3 horas, a sensibilidade começa a se estabilizar em torno de $6 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$. O campo que influencia a deposição eletroforética decai com o aumento do tempo de deposição¹³² enquanto o potencial é mantido constante. Isto ocorre devido à formação da camada de partículas sobre a superfície do eletrodo e pela consequente diminuição da condutividade do eletrodo. Entretanto, durante o período inicial da EPD, há geralmente uma relação linear entre o tempo de deposição e a massa depositada.

4.4.3. Detecção de glicose em meio contendo Na^+

Para essa detecção foi utilizado um eletrodo de 16 bicamadas de nanopartículas de PAH com a enzima glicose oxidase imobilizada através do método crosslinking. Utilizou-se um volume de solução de NaCl 0,1M de 8 mL e a concentração de glicose aumentava em 0,3125 mM na solução eletrolítica (Figura 39).

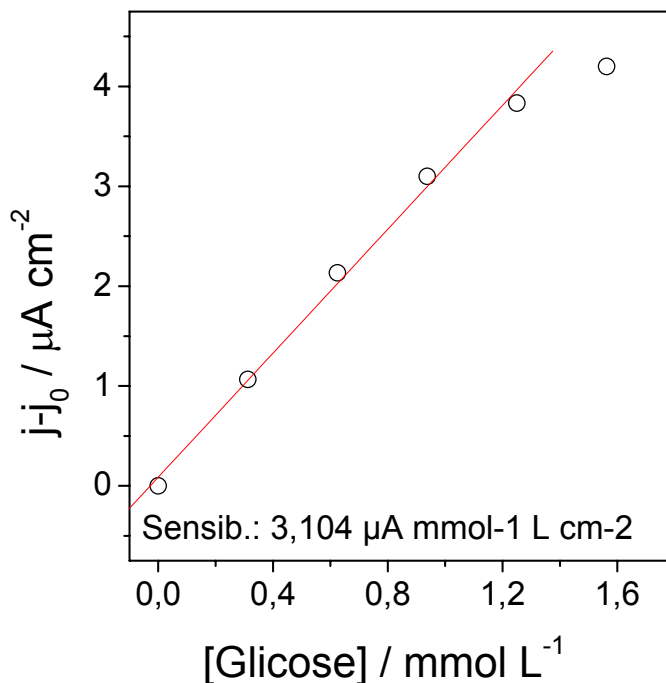


Figura 39: Curva de sensibilidade para um eletrodo com 16 bicamadas de Hexfecu/PAH + enzima pelo método crosslinking. Solução de NaCl (0,1M), pH = 7,0 a 0,0V.

O resultado foi positivo e apesar da detecção ter sido mais lenta, a ordem da sensibilidade encontrada foi a mesma que a encontrada em meios contendo KCl.

4.4.4. Testes de Durabilidade

Com o intuito de verificar quanto tempo o biossensor continuaria a detectar a glicose repetiu-se as detecções feitas anteriormente por volta de três meses e mediu-se a sensibilidade. As tabelas a seguir expõem um exemplar de cada tipo de biossensor com as sensibilidades variando com o tempo desde a primeira detecção.

Tabela 5: Durabilidade (método crosslonking I)

20 bicamadas HexFeCu + enzima	
Dias após primeiro teste	Sensibilidade $\mu A \text{ mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$
0	14,91
7	6,63
14	1,11
21	1,24
42	0,88
63	0,69
84	0,51
105	0,29

Para o eletrodo anterior, apesar de a sensibilidade cair quase que exponencialmente com o tempo, nota-se que ainda é possível fazer a detecção de glicose mesmo depois de mais de 3 meses após primeira detecção.

O fato de a sensibilidade cair significativamente com o passar do tempo com relação ao primeiro teste, é consequência da estocagem do eletrodo para os testes de durabilidade. O eletrodo não foi guardado em solução tampão, que seria a melhor forma de manter a enzima ativa. Experimentos anteriores, utilizando tampão fosfato, demonstraram que a estrutura de bicamadas de nanopartículas se desfez quando o eletrodo era estocado durante algum tempo em tal solução e as detecções se tornaram inviáveis.

Tabela 6: Durabilidade (método LBL)

25 bicamadas HexFeCu + enzima	
Dias após primeiro teste	Sensibilidade $\mu A \text{ mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$
0	1,410
7	0,090
14	0,064
21	0

Os resultados da tabela 7 mostram que quando a enzima é imobilizada através do método LBL, a durabilidade do biossensor diminui. Quanto mais o tempo passa, a detecção se torna cada vez mais lenta e imprecisa, até cair a zero, sinal de que a enzima está em um ambiente mais agressivo quando se compara com a imobilização utilizando glutaraldeído e BSA.

A tabela a seguir exhibe os resultados para os eletrodos onde as nanopartículas foram imobilizadas através da deposição eletroforética.

Tabela 7: Durabilidade (método crosslinking II)

HexFeCu 3h (EPD) + enzima	
Dias após primeiro teste	Sensibilidade $\mu A \text{ mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$
0	6,2
7	5,51
14	1,6
21	0,86
42	0,49

O biossensor que utiliza a EPD como forma de imobilização das nanopartículas também exibe uma durabilidade maior, mesmo depois de 42 dias após o primeiro teste, ainda respondia à glicose.

5. Conclusões

Foi possível sintetizar nanopartículas de hexacianoferrato de cobre utilizando-se o método de síntese sonoquímico. As nanopartículas foram caracterizadas por HRTEM sendo encontradas estruturas com tamanhos de 10 nm e também aglomerados delas. As análises de raio-X, raman, análise elementar e ICP permitiram identificar o composto como hexacianoferrato de cobre com a seguinte fórmula molecular: $\text{Cu}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. A mobilidade eletroforética e o potencial zeta permitiram comprovar a carga superficial negativa das nanopartículas. Esse material foi imobilizado em eletrodos de ITO através da automontagem eletrostática utilizando como polieletrólito positivo o PAH, técnica pela qual se mostrou bastante eficiente ao promover uma alta aderência das camadas ao eletrodo. O filme foi analisado por MEV sendo possível observar as nanopartículas de hexacianoferrato de cobre por entre a estrutura polimérica do PAH. Foi também utilizada com sucesso a técnica de deposição eletroforética (EPD) para a imobilização das nanopartículas.

Os experimentos eletroquímicos revelaram a interconexão elétrica entre as camadas de nanopartículas e também, diferentemente do azul da prússia, o hexacianoferrato de cobre possui atividade eletroquímica em meios contendo Na^+ .

Na primeira parte do relatório foi abordada a utilização dos mesmos eletrodos em dispositivos eletrocrômicos. Os experimentos espectroeletroquímicos mostraram que os eletrodos sintetizados possuem atividade eletrocrômica, descolorindo quando oxidado e colorindo quando reduzido. Os contrastes obtidos não foram muito altos (21% para eletrodos com 25 bicamadas), mas em contrapartida, a boa aderência das camadas ao eletrodo promove alta reversibilidade e durabilidade eletrocrômica, sendo que o contraste permanece inalterado por mais de seis horas.

Além disso, os testes amperométricos dos eletrodos modificados por LBL, mostraram um bom desempenho analítico na detecção do peróxido de hidrogênio com sensibilidade de $31,45 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$ (eletrodo com 25 bicamadas), duas ordens de magnitude maior que os eletrodos modificados com hexacianoferrato de cobre depositados eletroquimicamente.

Os resultados amperométricos utilizando os eletrodos com enzima glicose oxidase, imobilizada através das técnicas de LBL e crosslinking, para a detecção de glicose também foram bastante promissores, com boas sensibilidades, embora o intuito com relação aos biossensores não tenha sido exatamente o de obter um dispositivo com altíssimo desempenho, mas sim o de estudar o comportamento eletroquímico das nanopartículas de HexFeCu, um material que foi sintetizado de forma inédita, comparando diferentes formas de imobilização das nanopartículas e da enzima assim e as diferentes arquiteturas de deposição.

6. Referências

1. Pereira, F. C., E. P. Bergamo, et al. Applications of nanoelectrodes as sensors in analytical chemistry. *Quimica Nova*, v.29, n.5, Sep-Oct, p.1054-1060. 2006.
2. THE ROYAL SOCIETY AND THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING: Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties - ISBN 0 85403 604 0. Londres, R 2004.
3. R. Feynman There's Plenty of Room at the Bottom. *Engineering and Science*, v 23, p. 22. 1960.
4. Kroto, H. W., J. R. Heath, et al. C-60 - Buckminsterfullerene. *Nature*, v.318, n.6042, p.162-163. 1985.
5. Iijima, S. Helical Microtubules of Graphitic Carbon. *Nature*, v.354, n.6348, Nov 7, p.56-58. 1991.
6. Tasis, D., N. Tagmatarchis, et al. Chemistry of carbon nanotubes. *Chemical Reviews*, v.106, n.3, Mar, p.1105-1136. 2006.
7. Dresselhaus, M. S. e P. Avouris. Introduction to carbon materials research. *Carbon Nanotubes*, v.80, p.1-9. 2001.
8. Tomalia, D. A. Dendrimer Molecules. *Scientific American*, v.272, n.5, May, p.62-66. 1995.
9. Crooks, R. M., M. Q. Zhao, et al. Dendrimer-encapsulated metal nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications to catalysis. *Accounts of Chemical Research*, v.34, n.3, Mar, p.181-190. 2001.
10. Korkosz, R. J., J. D. Gilbertson, et al. Dendrimer templates for supported Au catalysts. *Catalysis Today*, v.122, n.3-4, Apr 30, p.370-377. 2007.
11. Scott, R. W. J., O. M. Wilson, et al. Synthesis, characterization, and applications of dendrimer-encapsulated nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, v.109, n.2, Jan 20, p.692-704. 2005.
12. Choi, J. W., J. Y. Kim, et al. UV protection characteristics and fabrication of modified TiO₂ nanoparticles. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v.10, n.3, May, p.428-434. 2004.
13. Liu, X., Y, Zhizhong. Manufacture of UV shielding/absorbing zinc oxide nanoparticles. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu* 2000, 6 pp. CODEN: CNXXEV CN 1260366 A 20000719 CAN 134:197859 AN 2001:174436.
14. Ray, S. C., J. W. Chiou, et al. The electronic properties of nanomaterials elucidated by synchrotron radiation-based spectroscopy. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, v.31, n.4, Oct-Dec, p.91-110. 2006.

15. Brongersma, M. L., J. W. Hartman, et al. Electromagnetic energy transfer and switching in nanoparticle chain arrays below the diffraction limit. *Physical Review B*, v.62, n.24, Dec 15, p.16356-16359. 2000.
16. Mukai, T., S. Suresh, et al. Nanostructured Al-Fe alloys produced by e-beam deposition: static and dynamic tensile properties. *Acta Materialia*, v.51, n.14, Aug 15, p.4197-4208. 2003.
17. Eustis, S. e M. A. El-Sayed. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Society Reviews*, v.35, n.3, p.209-217. 2006.
18. Brust, M., M. Walker, et al. Synthesis of Thiol-Derivatized Gold Nanoparticles in a 2-Phase Liquid-Liquid System. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, n.7, Apr 7, p.801-802. 1994.
19. Mulvaney, P. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. *Langmuir*, v.12, n.3, Feb 7, p.788-800. 1996.
20. Salerno, M., J. R. Krenn, et al. Plasmon polaritons in metal nanostructures: the optoelectronic route to nanotechnology. *Opto-Electronics Review*, v.10, n.3, Sep, p.217-224. 2002.
21. Rosi, N. L. e C. A. Mirkin. Nanostructures in biodiagnostics. *Chemical Reviews*, v.105, n.4, Apr, p.1547-1562. 2005.
22. Chen, M. S. e D. W. Goodman. The structure of catalytically active gold on titania. *Science*, v.306, n.5694, Oct 8, p.252-255. 2004.
23. Biswas, P. C., Y. Nodasaka, et al. Electrooxidation of Co and Methanol on Graphite-Based Platinum-Electrodes Combined with Oxide-Supported Ultrafine Gold Particles. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v.381, n.1-2, Jan 24, p.167-177. 1995.
24. Ozin, G. A. *Nanochemistry - Synthesis in Diminishing Dimensions*. *Advanced Materials*, v.4, n.10, Oct, p.612-649. 1992.
25. Rao, C. N. R., Muller, A.; Cheetham, A. K. *The chemistry of nanomaterials*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. vol1 2004. p. 17.
26. Boulova, M. e G. Lucazeau. Crystallite nanosize effect on the structural transitions of WO₃ studied by Raman spectroscopy. *Journal of Solid State Chemistry*, v.167, n.2, Sep, p.425-434. 2002.

27. Niklasson, G. A., J. Klasson, et al. Polaron absorption in tungsten oxide nanoparticle aggregates. *Electrochimica Acta*, v.46, n.13-14, Apr 2, p.1967-1971. 2001.
28. Pui, D. Y. H., D. R. Chen, et al. Nanometer particles: A new frontier for multidisciplinary research. *Journal of Aerosol Science*, v.29, n.5-6, Jun-Jul, p.Vii-Vii. 1998.
29. Watzke, H. J. e J. H. Fendler. Quantum Size Effects of Insitu Generated Colloidal Cds Particles in Dioctadecyldimethylammonium Chloride Surfactant Vesicles. *Journal of Physical Chemistry*, v.91, n.4, Feb 12, p.854-861. 1987.
30. Gedanken, A. Using sonochemistry for the fabrication of nanomaterials. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.11, n.2, Apr, p.47-55. 2004.
31. Suslick, K. S., T. W. Hyeon, et al. Nanostructured materials generated by high-intensity ultrasound: Sonochemical synthesis and catalytic studies. *Chemistry of Materials*, v.8, n.8, Aug, p.2172-2179. 1996.
32. Yamada, M., M. Arai, et al. Synthesis and isolation of cobalt hexacyanoferrate/chromate metal coordination nanopolymers stabilized by alkylamino ligand with metal elemental control. *Journal of the American Chemical Society*, v.126, n.31, Aug 11, p.9482-9483. 2004.
33. Zhang, D., K. Zhang, et al. Multilayer assembly of Prussian blue nanoclusters and enzyme-immobilized poly(toluidine blue) films and its application in glucose biosensor construction. *Langmuir*, v.20, n.17, Aug 17, p.7303-7307. 2004.
34. Vaucher, S., J. Fielden, et al. Molecule-based magnetic nanoparticles: Synthesis of cobalt hexacyanoferrate, cobalt pentacyanonitrosylferrate, and chromium hexacyanochromate coordination polymers in water-in-oil microemulsions. *Nano Letters*, v.2, n.3, Mar, p.225-229. 2002.
35. Moulik, S. P., G. C. De, et al. Dispersed molecular aggregates. 1. Synthesis and characterization of nanoparticles of $\text{Cu}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ in $\text{H}_2\text{O}/\text{AOT}/n\text{-heptane}$ water-in-oil microemulsion media. *Langmuir*, v.15, n.24, Nov 23, p.8361-8367. 1999.
36. Crowell, J. E. Chemical methods of thin film deposition: Chemical vapor deposition, atomic layer deposition, and related technologies. *Journal of Vacuum Science & Technology A*, v.21, n.5, Sep-Oct, p.S88-S95. 2003.
37. Nesheva, D., A. Petrova, et al. Thin film semiconductor nanomaterials and nanostructures prepared by physical vapour deposition: An atomic force microscopy study. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, v. 68 n. 5, May, p. 5-6. 2007.

38. Zhang, L. H. e S. J. Dong. Electrogenenerated chemiluminescence sensing platform using Ru(bpy)(3)(2+) doped silica nanoparticles and carbon nanotubes. *Electrochemistry Communications*, v.8, n.10, Oct, p.1687-1691. 2006.
39. Hamaker HC. Formation of deposition by electrophoresis. *Transactions of the Faraday Society*, v. 35, p. 279–83. 1940.
40. Decher, G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science*, v.277, n.5330, Aug 29, p.1232-1237. 1997.
41. De Tacconi, N. R., K. Rajeshwar, et al. Metal hexacyanoferrates: Electrosynthesis, in situ characterization, and applications. *Chemistry of Materials*, v.15, n.16, Aug 12, p.3046-3062. 2003.
42. Turner, A.P.F.; Karube, I.; Wilson, G.S.; *Biosensors, Fundamentals and Applications*, Oxford:Oxford University Press, 1987.
43. Thevenot, D. R., K. Toth, et al. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification - (Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, v.71, n.12, Dec, p.2333-2348. 1999.
44. Wilkins, E. e P. Atanasov. Glucose monitoring: State of the art and future possibilities. *Medical Engineering & Physics*, v.18, n.4, Jun, p.273-288. 1996.
- 45 Clark, L. C. e C. Lyons. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.102, n.1, p.29-&. 1962.
46. Cass, A. E. G., G. Davis, et al. Ferrocene-Mediated Enzyme Electrode for Amperometric Determination of Glucose. *Analytical Chemistry*, v.56, n.4, p.667-671. 1984..
47. Murray, R. W., A. G. Ewing, et al. Chemically Modified Electrodes - Molecular Design for Electroanalysis. *Analytical Chemistry*, v.59, n.5, Mar 1, p.A379-&. 1987.
48. Schmidtke, D. W., A. C. Freeland, et al. Measurement and modeling of the transient difference between blood and subcutaneous glucose concentrations in the rat after injection of insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.95, n.1, Jan 6, p.294-299. 1998.
49. Xu, Y. J., C. Y. Lu, et al. Preparation of urea sensors with a series piezoelectric crystal device. *Analytical Letters*, v.29, n.7, p.1069-1080. 1996.
50. Vadgama, P. e P. W. Crump. Biosensors - Recent Trends - a Review. *Analyst*, v.117, n.11, Nov, p.1657-1670. 1992.

51. Choi, M. M. F. Progress in enzyme-based biosensors using optical transducers. *Microchimica Acta*, v.148, n.3-4, Dec, p.107-132. 2004.
52. Thevenot, D. R., K. Toth, et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors & Bioelectronics*, v.16, n.1-2, Jan, p.121-131. 2001.
53. Turner, A. P. F. e J. C. Pickup. Diabetes-Mellitus - Biosensors for Research and Management. *Biosensors*, v.1, n.1, p.85-115. 1985.
54. Watson, L. D., P. Maynard, et al. A Microelectronic Conductimetric Biosensor. *Biosensors*, v.3, n.2, p.101-115. 1987.
55. Alegret, S. e E. Martinezfabregas. Biosensors Based on Conducting Filled Polymer All-Solid-State Pvc Matrix Membrane Electrodes. *Biosensors*, v.4, n.5, p.287-297. 1989.
56. Walcerz, I., R. Koncki, et al. Enzyme Biosensors for Urea Determination Based on an Ionophore Free Ph Membrane-Electrode. *Analytica Chimica Acta*, v.315, n.3, Nov 10, p.289-296. 1995.
57. Updike, S. J. e G. P. Hicks. Enzyme Electrode. *Nature*, v.214, n.5092, p.986-&. 1967.
58. Chaubey, A. e B. D. Malhotra. Mediated biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*, v.17, n.6-7, Jun, p.441-456. 2002.
59. Itaya, K.; Shoji, N.; Uchida, I. Catalysis of the reduction of molecular oxygen to water at Prussian blue modified electrodes. *Journal of the American Chemical Society*, v. 106, June, p. 3423 – 3429. 1984.
60. Karyakin, A. A., E. E. Karyakina, et al. Prussian-Blue-based amperometric biosensors in flow-injection analysis. *Talanta*, v.43, n.9, Sep, p.1597-1606. 1996.
61. Karyakin, A. A., E.E. Karyakina, L. Gorton On the mechanism of H₂O₂ reduction at Prussian Blue modified electrodes. *Electrochemistry Communications*, v.1, n.2, Feb, p.78-82. 1999.
62. Cenas, N. K. e J. J. Kulys. Biocatalytic Oxidation of Glucose on the Conductive Charge-Transfer Complexes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, v.8, n.1, p.103-113. 1981.
63. Eddowes, M. S.; Hill, H. A. O.; Vosaki, K. The electrochemistry of cytochrome c. Investigation of the mechanism of the 4,4'-bipyridyl surface modified gold electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 116, p. 527-537. 1980.

64. Ye, L. Hammerle, M. Olsthoorn, et al. High Current Density "Wired" Quinoprotein Glucose Dehydrogenase Electrode. *Analytical Chemistry*, v. 65, Feb., p. 238 – 241. 1993.
65. Bartlett, P. N., P. R. Birkin, et al. A study on the direct electrochemical communication between horseradish peroxidase and a poly(aniline) modified electrode. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions*, v.92, n.17, Sep 7, p.3123-3130. 1996.
66. K. Itaya, I. Uchida, V. D. Neff. Electrochemistry of polynuclear transition metal cyanides: Prussian blue and its analogues. *Accounts of chemical Research*, v. 19, n. 06, June, p. 162 – 168. 1986.
67. Sinha, S., B. D. Humphrey, et al. Reaction of Nickel Electrode Surfaces with Anionic Metal Cyanide Complexes - Formation of Precipitated Surfaces. *Inorganic Chemistry*, v.23, n.2, p.203-212. 1984.
68. Siperko, L. M. e T. Kuwana. Electrochemical and Spectroscopic Studies of Metal Hexacyanometalate Films.1. Cupric Hexacyanoferrate. *Journal of the Electrochemical Society*, v.130, n.2, p.396-402. 1983.
69. Bharathi, S., M. Nogami, et al. Layer by layer self-assembly of thin films of metal hexacyanoferrate multilayers. *Langmuir*, v.17, n.24, Nov 27, p.7468-7471..
70. Zhou, D. M., H. X. Ju, et al. Catalytic oxidation of dopamine at a microdisk platinum electrode modified by electrodeposition of nickel hexacyanoferrate and Nafion(R). *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v.408, n.1-2, May 30, p.219-223. 1996.
71. Cai, C. X., H. X. Ju, et al. Catalytic-Oxidation of Reduced Nicotinamide Adenine-Dinucleotide at a Microband Gold Electrode Modified with Nickel Hexacyanoferrate. *Analytica Chimica Acta*, v.310, n.1, Jun 25, p.145-151. 1995.
72. Shankaran, D. R. e S. S. Narayanan. Studies on copper hexacyanoferrate modified electrode and its application for the determination of cysteine. *Bulletin of Electrochemistry*, v.14, n.8-9, Aug-Sep, p.267-270. 1998.
73. Narayanan, S. S. e F. Scholz. A comparative study of the electrocatalytic activities of some metal hexacyanoferrates for the oxidation of hydrazine. *Electroanalysis*, v.11, n.7, Jun, p.465-469. 1999.
74. Teixeira, M. F. S., A. Segnini, et al. Determination of vitamin B-6 (pyridoxine) in pharmaceutical preparations by cyclic voltammetry at a copper(II) hexacyanoferrate(III) modified carbon paste electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.14, n.2, Mar-Apr, p.316-321. 2003.

75. Zamponi, S., M. Berrettoni, et al. Influence of experimental conditions on electrochemical behavior of Prussian blue type nickel hexacyanoferrate film. *Electrochimica Acta*, v.48, n.28, Dec 15, p.4261-4269. 2003.
76. Fiorito, P. A. e S. I. C. De Torresi. Hybrid nickel hexacyanoferrate/polypyrrole composite as mediator for hydrogen peroxide detection and its application in oxidase-based biosensors. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v.581, n.1, Jul 15, p.31-37. 2005.
77. Karyakin, A. A. Prussian Blue and its analogues: Electrochemistry and analytical applications. *Electroanalysis*, v.13, n.10, Jul, p.813-819. 2001.
78. Fiorito, P. A., V. R. Goncales, et al. Synthesis, characterization and immobilization of Prussian blue nanoparticles. A potential tool for biosensing devices. *Chemical Communications*, n.3, p.366-368. 2005.
79. Delongchamp, D. M. e P. T. Hammond. Multiple-color electrochromism from layer-by-layer-assembled polyaniline/Prussian Blue nanocomposite thin films. *Chemistry of Materials*, v.16, n.23, Nov 16, p.4799-4805. 2004b.
80. Somani, P. R. e S. Radhakrishnan. Electrochromic materials and devices: present and future. *Materials Chemistry and Physics*, v.77, n.1, Jan 2, p.117-133. 2003.
81. Oliveira, S. C., Torresi, M. R. Et al. Uma Visão das tendências e perspectivas em eletrocromismo: A busca de novos materiais e desenhos mais Simples. *Química Nova*, v. 23, n. 01, May, p. 79 – 87. 2000.
82. Skoog, D. A. *Principles of instrumental analysis*. 3. ed. Philadelphia: Saunders College Pub. 1985. p. 276 – 280.
83. Deb, S. K. Novel electrophotographic system. *Applied Optics Supply*, v. 3, n. 10, p. 192 – 195. 1969.
84. Burke, L. D. e D. P. Whelan. Behavior of Ruthenium Anodes in Base. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v.103, n.2, p.179-187. 1979.
85. Burke, L. D. e O. J. Murphy. Electrochromic Behavior of Oxide-Films Grown on Cobalt and Manganese in Base. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v.109, n.1-3, p.373-377. 1980.
86. Hyodo, K. Electrochromism of Conducting Polymers. *Electrochimica Acta*, v.39, n.2, Feb, p.265-272. 1994.
87. Diaz, A. F., J. I. Castillo, et al. Electrochemistry of Conducting Polypyrrole Films. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v.129, n.1-2, p.115-132. 1981.

88. Kobayashi, T., H. Yoneyama, et al. Electrochemical Reactions Concerned with Electrochromism of Polyaniline Film-Coated Electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v.177, n.1-2, p.281-291. 1984.
89. Ellis, D., M. Eckhoff, et al. Electrochromism in the Mixed-Valence Hexacyanides.1. Voltammetric and Spectral Studies of the Oxidation and Reduction of Thin-Films of Prussian Blue. *Journal of Physical Chemistry*, v.85, n.9, p.1225-1231. 1981.
90. Delongchamp, D. M. e P. T. Hammond. High-contrast electrochromism and controllable dissolution of assembled Prussian blue/polymer nanocomposites. *Advanced Functional Materials*, v.14, n.3, Mar, p.224-232. 2004a.
91. Cummins, D., G. Boschloo, et al. Ultrafast electrochromic windows based on redox-chromophore modified nanostructured semiconducting and conducting films. *Journal of Physical Chemistry B*, v.104, n.48, Dec 7, p.11449-11459. 2000.
92. Ferreira, F. F., T. G. S. Cruz, et al. Lithium insertion and electrochromism in polycrystalline molybdenum oxide films. *Solid State Ionics*, v.136, Nov, p.357-363. 2000.
93. Vidotti, M., C. Van Greco, et al. Sonochemically synthesized Ni(OH)₂ and Co(OH)₂ nanoparticles and their application in electrochromic electrodes. *Electrochemistry Communications*, v.8, n.4, Apr, p.554-560. 2006.
94. Jeevanandam, P., Y. Kolytyn, et al. Synthesis of alpha-cobalt(II) hydroxide using ultrasound radiation. *Journal of Materials Chemistry*, v.10, n.2, Feb, p.511-514. 2000.
95. Huguenin, F., V. Zucolotto, et al. Layer-by-layer hybrid films incorporating WO₃, TiO₂, and chitosan. *Chemistry of Materials*, v.17, n.26, Dec 27, p.6739-6745. 2005.
96. Nogueira, A. F., S. H. Toma, et al. A highly efficient redox chromophore for simultaneous application in a photoelectrochemical dye sensitized solar cell and electrochromic devices. *New Journal of Chemistry*, v.29, n.2, p.320-324. 2005.
97. Loos-Neskovic, C., S. Ayrault, et al. Structure of copper-potassium hexacyanoferrate (II) and sorption mechanisms of cesium. *Journal of Solid State Chemistry*, v.177, n.6, Jun, p.1817-1828. 2004.
98. Makowski, O., J. Stroka, et al. Electrochemical identity of copper hexacyanoferrate in the solid-state: evidence for the presence and redox activity of both iron and copper ionic sites. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v.532, n.1-2, Sep 6, p.157-164. 2002.
99. Chen, S. M. e C. M. Chan. Preparation, characterization, and electrocatalytic properties of copper hexacyanoferrate film and bilayer film modified electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v.543, n.2, Feb 27, p.161-173. 2003.

100. P.J. Kulesza, M.A. Malik *Interfacial electrochemistry*, in: A. Wieckowski (Ed.), *Solid-State Voltammetry*, Marcel Dekker, Nova York, 1999.
101. De Tacconi, N. R., K. Rajeshwar, et al. Preparation, photoelectrochemical characterization, and photoelectrochromic behavior of metal hexacyanoferrate-titanium dioxide composite films. *Electrochimica Acta*, v.45, n.20, p.3403-3411. 2000.
102. Siperko, L. M. e T. Kuwana. *Electrochemical and Spectroscopic Studies of Metal Hexacyanometalate Films.3. Equilibrium and Kinetic-Studies of Cupric Hexacyanoferrate*. *Electrochimica Acta*, v.32, n.5, May, p.765-771. 1987.
103. Jayalakshmi, M. e F. Scholz. Performance characteristics of zinc hexacyanoferrate/Prussian blue and copper hexacyanoferrate/Prussian blue solid state secondary cells. *Journal of Power Sources*, v.91, n.2, Dec, p.217-223. 2000.
104. Mortimer, R. J. e J. R. Reynolds. In situ colorimetric and composite coloration efficiency measurements for electrochromic Prussian blue. *Journal of Materials Chemistry*, v.15, n.22, p.2226-2233. 2005.
105. Suslick, K. S., S. B. Choe, et al. Sonochemical Synthesis of Amorphous Iron. *Nature*, v.353, n.6343, Oct 3, p.414-416. 1991.
106. Suslick, K. S. e G. J. Price. Applications of ultrasound to materials chemistry. *Annual Review of Materials Science*, v.29, p.295-326. 1999.
107. Suslick, K. S., D. A. Hammerton, et al. The Sonochemical Hot-Spot. *Journal of the American Chemical Society*, v.108, n.18, Sep 3, p.5641-5642. 1986.
108. Zhu, J. J., Y. Kolytyn, et al. General sonochemical method for the preparation of nanophasic selenides: Synthesis of ZnSe nanoparticles. *Chemistry of Materials*, v.12, n.1, Jan, p.73-78. 2000.
109. Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of inorganic and coordination compounds*. 4. ed. Nova York: Jhon & Willey, 1986.
110. Didenko, Y. T. e K. S. Suslick. The energy efficiency of formation of photons, radicals and ions during single-bubble cavitation. *Nature*, v.418, n.6896, Jul 25, p.394-397. 2002.
111. Chapman, K. W., P. J. Chupas, et al. Compositional dependence of negative thermal expansion in the Prussian blue analogues (M^{IV})-Pt-II(CN)₆ (M = Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd). *Journal of the American Chemical Society*, v.128, n.21, May 31, p.7009-7014. 2006.
112. Ritala, M. ; Leskela, M. *Atomic layer deposition*. In: Nalwa, H. S. (Ed). *Handbook of thin films materials*. Nova York: Academic Press. 2002, v.1, p. 103-159.

113. Goldstein, L., F. Glas, et al. Growth by Molecular-Beam Epitaxy and Characterization of InAs/GaAs Strained-Layer Superlattices. *Applied Physics Letters*, v.47, n.10, p.1099-1101. 1985.
114. Lvov, Y., F. Essler, et al. Combination of Polycation Polyanion Self-Assembly and Langmuir-Blodgett Transfer for the Construction of Superlattice Films. *Journal of Physical Chemistry*, v.97, n.51, Dec 23, p.13773-13777. 1993.
115. Lvov, Y., G. Decher, et al. Assembly, Structural Characterization, and Thermal-Behavior of Layer-by-Layer Deposited Ultrathin Films of Poly(Vinyl Sulfate) and Poly(Allylamine). *Langmuir*, v.9, n.2, Feb, p.481-486. 1993.
116. Lvov, Y.; Decher, G.; Sukhorukov G. Assembly of thin films by means of successive deposition of alternate layers of DNA and poly(allylamine). *Macromolecules*, v. 26, n. 20, p. 5396 – 5399. 1993.
117. Decher, G., B. Lehr, et al. New Nanocomposite Films for Biosensors - Layer-by-Layer Adsorbed Films of Polyelectrolytes, Proteins or DNA. *Biosensors & Bioelectronics*, v.9, n.9-10, p.677-684. 1994.
118. Lvov, Y., H. Haas, et al. Successive Deposition of Alternate Layers of Polyelectrolytes and a Charged Virus. *Langmuir*, v.10, n.11, Nov, p.4232-4236. 1994.
119. Lvov, Y., K. Ariga, et al. Layer-by-Layer Architectures of Concanavalin a by Means of Electrostatic and Biospecific Interactions. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, n.22, Nov 21, p.2313-2314. 1995.
120. Onda, M., Y. Lvov, et al. Sequential actions of glucose oxidase and peroxidase in molecular films assembled by layer-by-layer alternate adsorption. *Biotechnology and Bioengineering*, v.51, n.2, Jul 20, p.163-167. 1996.
121. Hodak, J.; Etchenique, R., et al. Layer-by-Layer Self-Assembly of Glucose Oxidase with a Poly(allylamine)ferrocene Redox Mediator. *Langmuir*, v. 13, n. 10, p. 2708-2716. 1997.
122. Laurent, D.; Schelenoff, J. B. Multilayer Assemblies of Redox Polyelectrolytes. *Langmuir*, v. 13, p. 1552-1557. 1997.
123. Lvov, Y., K. Ariga, et al. Formation of ultrathin multilayer and hydrated gel from montmorillonite and linear polycations. *Langmuir*, v.12, n.12, Jun 12, p.3038-3044. 1996.
124. Lvov Y. *Protein Architecture*. Nova york: Marcel Dekker, 2000; cap. 6; p. 125.
125. Calvo, E. J., F. Battaglini, et al. Layer-by-layer electrostatic deposition of biomolecules on surfaces for molecular recognition, redox mediation and signal generation. *Faraday Discussions*, n.116, p.47-65. 2000.

- 126 Hamaker HC. Formation of deposition by electrophoresis. Transactions of the Faraday Society, v. 35, p. 279–83. 1940.
127. Sarkar, P. e P. S. Nicholson. Electrophoretic deposition (EPD): Mechanisms, kinetics, and application to ceramics. Journal of the American Ceramic Society, v.79, n.8, Aug, p.1987-2002. 1996.
128. Besra, L. e M. Liu. A review on fundamentals and applications of electrophoretic deposition (EPD). Progress in Materials Science, v.52, n.1, Jan, p.1-61. 2007.
129. Shankaran, D. R.; Narayanan, S. S. Journal of Analytical chemistry, v. 364, p. 686–689. 1999.
- 130 Decher, G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. Science, v.277, n.5330, Aug 29, p.1232-1237. 1997.
131. Malta, M., E. R. Gonzalez, et al. Electrochemical and chromogenic relaxation processes in polyaniline films. Polymer, v.43, n.22, Oct, p.5895-5901. 2002.
132. Basu, R. N., C. A. Randall, et al. Fabrication of dense zirconia electrolyte films for tubular solid oxide fuel cells by electrophoretic deposition. Journal of the American Ceramic Society, v.84, n.1, Jan, p.33-40. 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)