



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Fomação de filme polimérico derivado de ácido 3-hidróxifenilacético para a construção de biosensores.

Mestrando: RONALT MARCELINO LEMOS DE OLIVEIRA

Orientador: PROF. DR. JOÃO MARCOS MADURRO

Co-orientadora: PROF. DRA. ANA GRACI BRITO-MADURRO

UBERLÂNDIA

-2009-

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Fomação de filme polimérico derivado de ácido 3-hidróxifenilacético para a construção de biosensores.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química como requisito parcial à obtenção do título de mestre em química.

Mestrando: RONALT MARCELINO LEMOS DE OLIVEIRA

Orientador: PROF. DR. JOÃO MARCOS MADURRO

Co-orientadora: PROF. DRA. ANA GRACI BRITO-MADURRO

Curso: QUÍMICA

Área de concentração: QUÍMICA

UBERLÂNDIA

-2009-

RONALT MARCELINO LEMOS DE OLIVEIRA

Fomação de filme polimérico derivado de
ácido 3-hidróxifenilacético para a
construção de biosensores.

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado
em Química da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito parcial para obtenção
do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

Uberlândia

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- O48f Oliveira, Ronalt Marcelino Lemos de, 1973-
Formação de filme polimérico derivado de ácido 3-hidroxifenilacético para a construção de biosensores / Ronalt Marcelino Lemos de Oliveira. - 2009.
100 f. : il.
- Orientador: João Marcos Madurro.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.
Inclui bibliografia.
1. Polímeros - Teses. 2. Biosensores - Teses. 3. Nanotecnologia - Teses. I. Madurro, João Marcos. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU: 678.7



ALUNO(A): RONALT MARCELINO LEMOS DE OLIVEIRA

NÚMERO DE MATRÍCULA: 86342

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

***“Formação de filme polimérico derivado de ácido 3-
hidroxifenilacético para a construção de biossensores”***

ORIENTADOR:

PROF. DR. JOÃO MARCOS MADURRO

A Dissertação foi **APROVADA** em apresentação pública realizada no Anfiteatro do Bloco 1X, no Campus Santa Mônica, no dia 30 de junho de 2009, às 15:00 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

ASSINATURA:

Prof. Dr. João Marcos Madurro

(IQUFU)

Prof. Dr. Odonório Abrahão Júnior

(Universidade Federal do Triângulo Mineiro)

Prof^a Dra. Silvana Guilardi

(IQUFU)

Uberlândia, 30 de junho de 2009.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ter sido finalizado sem prestar minha homenagem a algumas pessoas, às quais julgo terem contribuído de algum modo, para o êxito alcançado:

- Ao Prof. Dr. João Marcos Madurro, meu orientador, e à Profa. Dra. Ana Graci Brito Madurro, minha co-orientadora, pela orientação, oportunidades, apoio e companheirismo durante a execução deste trabalho.
 - Ao Lucas companheiro de laboratório que durante todo tempo contribuiu para este trabalho me ensinando desde uma simples correção de formatação até a mais difícil arte da escolha.
 - Ao Diego (I'm sorry) pela companhia e amizade e também pela paciência e disponibilidade em ajudar-me nos trabalhos independentemente do dia e da hora com o maior carinho e disposição.
 - Aos amigos e colegas de laboratório: Carla, Leandra, Cláudio, Wallans, Édem, e demais amigos que não são reportados nestas linhas, pela amizade e pelos momentos de descontração e alegria que me fizeram parar e tomar fôlego para seguir adiante.
 - A Marina e também a Mayta, secretárias do Curso de Pós-Graduação em Química, pela paciência, colaboração e grande demonstração de amizade.
 - Aos membros da Banca pela aceitação e valiosas contribuições concedidas para o aprimoramento do trabalho desenvolvido.
 - Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia pelo espaço físico concedido.
 - Carinhosamente agradeço em especial à Sabrina por ter me acompanhado integralmente nessa jornada e além disso por ter sido meu braço direito, esquerdo, corpo e cérebro orientando e ensinando praticamente tudo o que aprendi durante esses anos de trabalho.
 - A minha mãe Dona Hilda por ter me dado apoio integral e com sua fé inabalável ter me “empurrado” ajudando a alcançar esse objetivo.
 - Ao meu irmão Rogério, minha cunhada Milene e meus sobrinhos Felipe e Isabela pelo carinho que tanto me conforta em momentos difíceis.
 - A minha Irma Janaína que mesmo de longe, bem longe, também me apoiou com incentivos e um acompanhamento periódico do andamento do meu trabalho.
 - A Raquel, pois até mesmo sua ausência foi um dos principais motivos para que eu pudesse enfrentar esse desafio e aqui estou.
-

Nomenclatura

Letras Gregas

Ω - ohm - resistência elétrica

λ - comprimento de onda (nm)

μ - micro (10^{-6})

Abreviações

PICs – Polímeros intrinsecamente condutores

SBR- Elastômero de copoli(butadieno/acronitrila)

EIE - Espectroscopia de impedância eletroquímica

MECQ – Microbalança eletroquímica de cristal de quartzo

Poli-3-HFA – Poli(ácido 3-hidroxifenilacético)

EQM – Eletrodos quimicamente modificados

PC- Polímero Condutor

DNA – Ácido desoxirribonucléico

Poli (A)- Poli-adenosina

Poli (T) – Poli-timidina

SUMÁRIO

Letras gregas	
Abreviações	
Índice das figuras	i
Índice das tabelas	iv
Resumo	v
Abstract	vii
Capítulo 1: Introdução	1
1.1 Polímeros	2
1.1.1 Classificação de polímeros	3
1.1.2 Polímeros condutores	7
1.2 Eletrodos modificados	9
1.2.1 Preparação de polímeros para EQM's	11
1.3. Técnicas de caracterização de eletrodos quimicamente modificados (EQM's)	15
1.3.1. Microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (MECQ)	15
1.3.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)	17
1.4 Biosensores	20
1.4.1 Formas de incorporação de biomoléculas	23
1.4.1.1 Adsorção física.	23
1.4.1.2 Aprisionamento.	24
1.4.1.3 Ligação cruzada.	25
1.4.1.4 Ligação Covalente.	25
1.5 Tipos de transdutores	26
1.5.1 Transdutor amperométrico.	26
1.5.2 Transdutor potenciométrico.	
1.5.3 Transdutor condutométrico.	28
1.5.4 Transdutores Térmicos.	28
1.5.5 Transdutor calorimétrico.	28
1.5.6 Transdutores ópticos.	28
1.5.7 Transdutores piezoelétricos	29
1.6. Objetivos do trabalho	30
Capítulo 2: Procedimento experimental	31
2.1 Reagentes e materiais	32

2.2 Soluções utilizadas nos experimentos	32
2.3 Equipamentos	33
2.3.1 Preparação dos eletrodos de trabalho	33
2.3.2 Limpeza dos eletrodos:	34
2.3.3 Potenciostato para análises voltamétricas	36
2.3.3 Potenciostato para análises voltamétricas	37
2.4. Procedimento experimental	37
2.4.1 Limpeza do material utilizado	37
2.4.2 Determinação da qualidade dos eletrodos de trabalho	37
2.4.3 Formação de filme polimérico sobre os eletrodos:	38
2.4.4 Imobilização de biomoléculas sobre o poli-3-HFA	38
Capítulo 3: resultados e discussão	40
3.1 Produção de filmes poliméricos de poli-ácido 3 hidróxifenilacético.	41
3.2 Caracterização eletroquímica dos eletrodos modificados	42
3.3 Estudo da estabilidade do filme polimérico	44
3.4 Estudo de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)	47
3.5 Estudo eletroquímico de microbalança de cristal de quartzo (MECQ).	50
3.6 Caracterização morfológica dos eletrodos modificados	54
3.7 Investigação da imobilização de oligonucleotídeos	56
Capítulo 4: Conclusão	58
Capítulo 5: Referências bibliográficas	60

Índice das figuras

Figura 1: Estruturas <i>cis</i> -polibutadieno (a) e <i>trans</i> -polibutadieno (b).	3
Figura 2. Estrutura de polímeros isotático (a), sindiotático (b) e atático (c).	5
Figura 3: Estrutura dos polímeros condutores intrínsecos (<i>PICs</i>) mais estudados.	8
Figura 4: Dupla camada elétrica formada na superfície do eletrodo como resultado do potencial aplicado. (d_0 a d_1) camada interna compacta e (d_1 a d_2) camada difusa [30].	12
Figura 5: Representação de duas ondas no processo de voltametria cíclica.	14
Figura 6 : Desenho esquemático de um cristal, mostrando o nodo da onda acústica passando pelo centro do disco e a deformação causada pelo cisalhamento	16
Figura 7: Desenho esquemático da vista superior e lateral de um cristal de quartzo com depósitos metálicos em ambos os lados.	16
Figura 8: Diagrama da onda de potencial aplicada em função do tempo para realização das medidas de EIE a potencial constante.	18
Figura 9: Dispersão de frequências de Z_i e Z_r envolvendo uma superfície eletródica.	19
Figura 10: Circuito equivalente da interface eletrodo-solução.	20
Figura 11: Esquema representativo de um biossensor.	21
Figura 12: Incorporação de biomoléculas por adsorção física.	24
Figura 13: Incorporação de biomoléculas por aprisionamento.	24
Figura 14: Incorporação de biomoléculas por ligação cruzada.	25
Figura 15: Incorporação de biomoléculas por ligação covalente.	26
Figura 16: Estrutura do ácido 3-hidroxifenilacético (a) fórmula estrutural (b) modelo de bola e bastão.	30
Figura 17: Eletrodo de disco de grafite: (A) afixado na base de teflon e recoberto com fita isolante de teflon; (B) eletrodos de grafite a granel.	34
Figura 19: Eletrodos utilizados nos experimentos eletroquímicos: (A) eletrodo de prata/cloreto de prata; (B) base metálica recoberta com TEFLON onde os eletrodos são afixados; (C) eletrodo de referência feito de platina; (D) eletrodos de grafite já afixados na base e recobertos com a resina epóxi para evitar o contato da solução	35

com a base metálica.

- Figura 20:** Potenciostato CH Instruments Modelo 420 A. 36
- Figura 21:** (A) Célula eletroquímica de três compartimentos; (B) Célula eletroquímica montada com os eletrodos de trabalho, referência e contra eletrodo. 36
- Figura 22:** Voltametria cíclica de eletrodo de grafite de uma solução de ácido 3-hidroxifenilacético ($2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) em HClO_4 ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$), por 100 sucessivos ciclos de potencial, com velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} . 41
- Figura 23:** Voltamogramas cíclicos de eletrodos de grafite após 100 ciclos em solução de HClO_4 ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$), contendo ácido 3-hidroxifenilacético. (A) solução de $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$ ($5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$), contendo KCl ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$). (B): solução de HClO_4 ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$). (—) Eletrodo de grafite sem modificação; eletrodo de grafite após 100 ciclos de potencial (---), 50 mV.s^{-1} . 43
- Figura 24:** Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com poli-(3-HFA). Estudo realizado em solução HClO_4 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ a uma velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} . (a) 1º ciclo, (b) 25º ciclo, (c) 50º ciclo, (d) 75º ciclo e (e) 100º ciclo. 44
- Figura 25:** Decaimento de carga percentual em função do número de ciclos. 45
- Figura 26:** Diagramas de Nyquist (A) e Bode (B) dos resultados experimentais dos espectros de impedância eletroquímica do eletrodo de grafite modificado com filme de poli(3-HFA), obtidos em solução de HClO_4 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$. $E_{\text{aplicado}} = 0,45 \text{ V}$; Amplitude 5 mV ; Faixa de Freqüência: 10^5 a 10^{-2} Hz . As linhas sólidas representam os resultados de simulação utilizando-se o circuito proposto na Figura 26. 47
- Figura 27:** Circuito equivalente proposto na simulação dos dados experimentais apresentados na Figura 26. Sendo, R_s = resistência ôhmica; R_{ct} = resistência a transferência de carga; Q_{dl} = capacitância da dupla camada elétrica; R_p = resistência do polímero; Q_p = capacitância do polímero e O = impedância transmissiva. 48
- Figura 28:** Perfil freqüência *versus* carga para a eletropolimerização de 3-hidroxifenilacético $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ em meio de H_2SO_4 $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, 20 varreduras, 50 mV.s^{-1} . 51
- Figura 29:** (A) Voltamogramas cíclicos de 3-hidroxifenilacético $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ em meio de H_2SO_4 $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, 20 varreduras, 50 mV.s^{-1} (B) potenciais de pico *versus* o 51

número de ciclos.

Figura 30: (A) Perfil $j \times E$ (—) e $dm \times E$ (- - -) de 3-hidroxi-fenilacético $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, em pH 0,5 com 2 varreduras, 50 mV.s^{-1} . (B) Perfil dm versus número de ciclos, 20 varreduras. 52

Figura 31: perfil $dm \times \Delta Q$ para os primeiros 2 voltamogramas cíclicos de 3-hidroxifenilacético $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ em meio de H_2SO_4 $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, 50 mV.s^{-1} . 53

Figura 32: Microscopias de força atômica do eletrodo de grafite (A_1 , A_2 e A_3) e do eletrodo modificado com poli-(3-HFA) (B_1 , B_2 e B_3). 54

Figura 33: Voltamogramas de pulso diferencial de eletrodos de grafite modificado com poli-3HPA preparadas em pH 0,5 (A) contendo poli (A) antes de hibridação; (B) e após 15 minutos de incubação com a fita complementar poli (T), tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5, amplitude de pulso e pulso $0,05 \text{ V}$ período $0,2 \text{ s}$. 55

Figura 35: Voltamogramas de pulso diferencial de eletrodo de grafite, contendo azul de metileno: (A) modificado com poli-3HFA; (B) modificado com poli-HPA/poli(A) e (C) poli-HPA/poli(A)/poli(T), tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5, amplitude de pulso $0,05 \text{ V}$, período do pulso $0,2 \text{ s}$. 56

Índice das tabelas

Tabela 1: Estruturas macromoleculares de homopolímeros e copolímeros	4
Tabela 2: Classificação para polímeros	7
Tabela 3: Linhas gerais do desenvolvimento dos EMQ's [1]	11
Tabela 4: Valores de carga elétrica, corrente de pico e variação de potencial em função do número de ciclos	45

RESUMO:

Um filme polimérico derivado de ácido 3-hidroxifenilacético poli-3-HFA foi produzido sobre eletrodo de grafite em meio aquoso ácido utilizando voltametria cíclica com a finalidade de formar uma interface para a detecção de biomoléculas para o desenvolvimento de biossensores.

Voltamogramas cíclicos mostram que o processo de eletropolimerização se inicia por volta de +0,9V, com o surgimento de uma onda de oxidação, atingindo um potencial de pico a +1,06V. Essa onda é apontada como sendo a oxidação do monômero estudado em questão para sua forma cátion-radical.

Com um segundo ciclo, há uma queda nos valores de corrente dessa onda e um par de ondas redox surge entre os potenciais +0,3 e +0,7V. Esse par se refere ao processo redox do filme polimérico em crescimento na superfície do eletrodo. Com o aumento do número de varreduras é observado um grande aumento nos valores de corrente destas ondas redox, indicando a formação de materiais na superfície do eletrodo.

Um estudo de estabilidade do material produzido foi feito com a técnica da voltametria cíclica e o material polimérico foi caracterizado utilizando-se algumas técnicas como: microscopia de força atômica (AFM), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (MECQ).

O eletrodo modificado com uma película delgada de Poli-3-HFA foi utilizado para a incorporação de biomoléculas. Na imobilização direta um fragmento de Poli-adenosina -poli(A) – foi incorporado a superfície do eletrodo e uma modificação do sinal eletroquímico do sistema foi observado. Após a hibridização do poli(A) contido na superfície modificada do filme polimérico com uma fita de poli-timidina – Poli(T) observou-se outra alteração no sinal eletroquímico produzido pelo eletrodo indicando materiais diferentes em sua superfície.

Já na imobilização indireta, utilizou-se o azul de metileno como intermediador e assim obteve-se também, diferentes respostas eletroquímicas com o eletrodo modificado com Poli-3-HFA, como com Poli-3-HFA/Poli(A) e Poli-3-HFA/poli(A)/poli(T).

Portanto a superfície de um eletrodo de grafite pode ser modificada com um polímero derivado de ácido 3-HFA e esse filme pode ser utilizado para a incorporação de biomoléculas obtendo-se diferentes respostas eletroquímicas.

ABSTRACT:

A polymer derived from 3-hydroxy phenyl acetic acid, poly-(3-HFA) was produced over a graphite electrode in an aqueous acid media through cyclic voltammetry with the intention to form an interface for biomolecule detection for a biosensor development.

Cyclic voltammograms show that electropolymerization process begins around +0.9V, with the appearance of an oxidation wave reaching a peak potential at +1.06V. This wave is pointed as being the monomer oxidation for its cation-radical form.

With a second cycle there is a current values decrease of this wave and a redox pair waves appears between +0.3 and +0.7V. This pair refers to the redox process of the polymeric film, growing over the electrode surface. As the sweep number increases it is observed a large current values increase of these redox waves, pointing the formation of electroactive material with a low insulating behavior.

The electrical properties of this polymer were determined through electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and the electrochemical quartz crystal microbalance (EQCM).

high frequency and another in low frequency ranges, suggesting the existence of two time constants, which can be confirmed through Bode diagram. This result suggest that the poly-(3-HFA) electrochemical behavior is controlled by kinetic processes in high frequency ranges and by mass transport in low frequency ranges.

The obtained result were simulated by a set of physical resistances and capacitances to fit to the experimental data, seeking the better circuit to represent it, which the first time constant is referred to an electronic transference on the electrode surface between the polymer and the solution and the second refers to mass transport processes in poly-(3-HFA) inner layers.

For the EQCM result, it is observed that the charge/frequency profile present a linear behavior, namely, a rigid film is being deposited over the electrode surface and the Sauerbrey equation is valid for the mass calculus. It is observed that, on the first cycle, the mass values remained constant until around +0.9V, exactly where the electropolymerization process begins. After 1.0V, the monomer, reaching its oxidation potential, begins to form the cation-radical structures which adsorbs on the electrode proved by the mass values increase.

During the reverse potential sweep, there is an additional mass increase due to the part of the monomer oxidation over this range. After this point, a little mass values decrease is observed, however, remaining constant until the end of the cycle.

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1. POLÍMEROS

Quando as moléculas se tornam muito grandes, contendo um número de átomos encadeados superior a uma centena, e podendo atingir valor ilimitado, as propriedades dessas moléculas ganham características próprias, gerais, e são chamadas de *macromoléculas*. Essas características são muito mais dominantes do que aquelas que resultam da natureza química dos átomos ou dos grupamentos funcionais presentes. As propriedades decorrem de interações envolvendo segmentos *intramoleculares* (da mesma molécula) ou *intermoleculares* (entre moléculas vizinhas) [1].

A forma e o comprimento das ramificações presentes na cadeia macromolecular têm papel importante. Ligações de hidrogênio intermoleculares e interações dipolo-dipolo, ao lado das forças de Van der Waals que atuam nessas macromoléculas no estado sólido, criam resistência muito maior do que no caso de moléculas de cadeia curta [1].

Há muita semelhança entre os conceitos de *macromoléculas* e *polímero*. Literalmente, *macromoléculas* são moléculas grandes, de elevado peso molecular, do qual decorre sua complexidade química, podendo ou não ter unidades químicas repetidas. A palavra *polímero* vem do grego (“poli” + “mer”, muitas partes), e foi criada por **Berzelius**, em 1832, para designar compostos de pesos moleculares múltiplos, em contraposição ao termo *isômero*, empregado para compostos de mesma massa molecular, porém de estruturas diferentes como butano e metil-propano [1].

Polímeros são macromoléculas caracterizadas por seu tamanho, estrutura química e interações intramoleculares e intermoleculares. Possuem unidades químicas ligadas por ligações covalentes, as quais se repetem regularmente ao longo da cadeia, denominadas *meros*. O número de meros da cadeia polimérica é denominado *grau de polimerização*, sendo geralmente simbolizado por n ou DP (“*degree of polymerization*”) [1].

Monômeros são compostos químicos suscetíveis de reagir para formar polímeros. A composição centesimal do polímero pode ser quase a mesma dos monômeros, ou levemente diferente, dependendo do tipo de reação que promoveu a interligação dos meros para formar a cadeia polimérica. A reação química que conduz à formação de polímeros é denominada polimerização. Wallace H. Carothers em 1931, indicou que a polimerização é uma reação funcional, capaz de continuar indefinidamente. Karl Ziegler, já em 1928, havia observado que, na polimerização de estireno e de α -metilestireno, iniciada por sódio metálico, o grupo terminal ativo apresentava um tempo de vida indefinido.

A reação de polimerização pode gerar mais de um tipo de configuração macromolecular. Assim, uma molécula de dieno conjugado, como o but-1,3-dieno, pode adicionar outra molécula idêntica de ambas as maneiras, *cis* ou *trans*, formando os polímeros isômeros *cis* ou *trans*, dependendo das condições de polimerização. A figura 1 mostra o *cis* e o *trans*-polibutadieno, que apresentam propriedades físicas e químicas diferentes entre si.

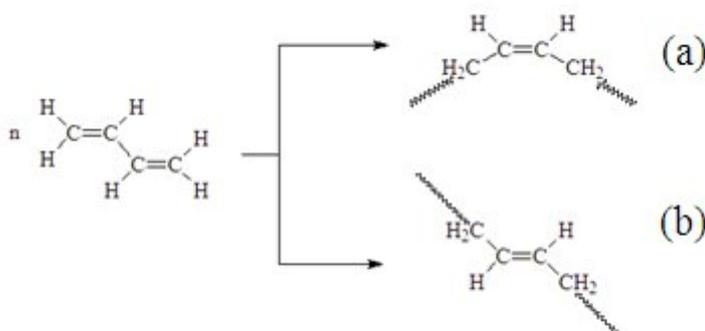


Figura 1: Estruturas *cis*-polibutadieno (a) e *trans*-polibutadieno (b).

1.1.1. CLASSIFICAÇÃO DE POLÍMEROS

As principais classificações de um polímero se baseiam nos aspectos de suas propriedades estruturais, resistência, configuração, quantidade de monômeros como a seguir.

Segundo a origem do polímero, este pode ser distribuído em dois grandes grupos: naturais e sintéticos. Polissacarídeos, poli-hidrocarbonetos, proteínas e ácidos nucleicos, todos constituem exemplos de macromoléculas naturais orgânicas. Nesta lista também estão incluídas amido, algodão, madeira, lã, cabelo, couro, seda, chifre, unha, borracha de seringueira, etc. Poliestireno e náilon são macromoléculas sintéticas orgânicas. Diamante, grafite, sílica e asbesto, são produtos macromoleculares naturais, inorgânicos. Ácido polifosfórico e poli(cloreto de fosfonitrila) são exemplos de macromoléculas sintéticas inorgânicas [1].

Quanto ao número de monômeros envolvidos na formação da cadeia macromolecular, os polímeros podem se classificar em homopolímeros e copolímeros. Quando o polímero tem apenas um tipo de mero, usa-se a expressão *homopolímero*. Em geral, consideram-se como homopolímeros também os produtos que contém pequenas quantidades (abaixo de 5%) de outro

comonômero, o que é comum de ocorrer industrialmente. Quando há mais de um tipo de mero, é designado *copolímero*, e os monômeros que lhe dão origem são denominados *comonômeros*. Por exemplo, o elastômero SBR é um copolímero de butadieno e estireno. O termo copolímero é geral; quando há três ou mais monômeros na reação, pode-se particularizar este número, usando a expressão terpolímero, tetrapolímero, etc.

Quanto à sequência de encadeamento dos monômeros, os copolímeros cujas unidades químicas não seguem qualquer seqüenciação, dispendo-se ao acaso, são chamados *copolímeros aleatórios* ou *randômicos*. No outro extremo, quando há perfeita regularidade de seqüenciação, dispendo-se as unidades químicas de modo alternado, são chamados de *copolímeros alternados*. Quando ao invés de uma unidade química de cada tipo, alternam-se seqüências de unidades químicas iguais, o produto é denominado *copolímero em bloco*. No caso particular desses blocos existirem como ramificações poliméricas, partindo do esqueleto principal da macromolécula, o copolímero é dito *graftizado* ou *enxertado*. A Tabela 1 resume esses conceitos.

Tabela 1: Estruturas macromoleculares de homopolímeros e copolímeros

Cadeias macromoleculares em homopolímeros e copolímeros			
Monômero	Polímero	Representação	
A	HomopolímeroA-A-A-A-A-A.....	
	HomopolímeroB-B-B-B-B-B.....	
B	Alternado	...A-B-A-B-A-B-....	
	Em bloco	...A-A-A-B-B-B-B-A-A-A-....	
	Copolímero	Graftizado	...B-B-A-A-A-A-A-B-B-B-B-B-B-...
A + B	Copolímero	Aleatório	...A-A-B-A-B-B-A-A-B-A-B-A-A-...

Em relação ao método de preparação do polímero, é bastante usual a classificação em polímeros de adição e polímeros de condensação, conforme ocorra uma simples reação de adição, sem subprodutos ou outra reação em que são subtraídos duas pequenas moléculas como HCl, H₂O ou KCl. Além desses, existem ainda outros métodos, menos comuns, para a preparação de polímeros, como ciclização, abertura do anel, etc. Um polímero pode também ser preparado por modificação de outro polímero, através de reações químicas, como hidrólise,

esterificação, acetalização, etc, permitindo a modificação das propriedades iniciais em grau controlável.

conforme a estrutura química da cadeia polimérica, isto é, conforme os grupos funcionais presentes na macromolécula, os polímeros podem ser arbitrariamente distribuídos em inúmeros grupos, como poli-hidrocarbonetos, poliaminas, poliésteres, poliéteres, poliacetais, poliuretanos, etc. Os poli-hidrocarbonetos podem ter cadeia saturada ou insaturada, substituídos ou não por átomos (cloro, flúor, etc) ou grupos pendentos, como alquilas, carboxilatos, etc.

Quanto à configuração dos átomos da cadeia polimérica, se o monômero é um dieno conjugado, na poliadição podem surgir sequências com a configuração *cis* ou *trans*, em analogia ao isomerismo *cis-trans* encontrado em moléculas orgânicas. É particularmente importante nas borrachas sintéticas, pois a geometria dos segmentos que respondem pelas características elastoméricas depende das condições reacionais.

Segundo a taticidade da cadeia polimérica, os polímeros podem se apresentar isotáticos, sindiotáticos ou atáticos como mostrado na figura 2. Centros quirais podem surgir na cadeia macromolecular, em analogia ao isomerismo óptico encontrado em moléculas, quando o monômero apresenta dupla ligação olefínica, não possui plano de simetria, e ainda for submetido a condições reacionais adequadas, especialmente com catalisadores especiais.

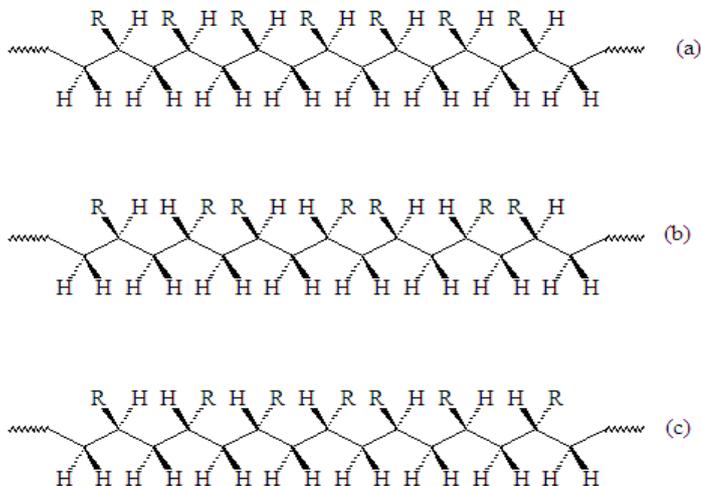


Figura 2. Estrutura de polímeros isotático (a), sindiotático (b) e atático (c).

Por meio de características de fusibilidade e/ou solubilidade, que obrigam a escolha de processamento tecnológico adequado, os polímeros podem ser agrupados em termoplásticos e termorrígidos. Os polímeros termoplásticos fundem por aquecimento e solidificam por resfriamento, em um processo reversível. Os polímeros lineares ou ramificados pertencem a esse grupo. Esses polímeros também podem ser dissolvidos em solventes adequados. Os polímeros termorrígidos, por aquecimento ou outra forma de tratamento, assumem estrutura reticulada, com ligações cruzadas, tornando-se infusíveis.

Conforme a estrutura reticulada, o polímero termorrígido pode ser denominado termorrígido químico ou termorrígido físico. O termorrígido químico, é totalmente insolúvel em quaisquer solventes enquanto que o termorrígido físico, pode ser solúvel em solventes adequados, muito polares, capazes de impedir a formação das ligações de hidrogênio entre as cadeias dos polímeros. O grau de interação/interligação dessas cadeias afeta a processabilidade, que tem grande importância tecnológica.

De acordo com o comportamento mecânico dos polímeros, os materiais macromoleculares podem ser divididos em três grandes grupos: borrachas, plásticos e fibras. As faixas que demarcam, embora muito fluidamente, os limites do módulo elástico, diferenciando borrachas, plásticos e fibras, são: 10 a 10^2 , 10^3 a 10^4 , 10^5 a 10^6 psi ($1 \text{ psi} = 0,07 \text{ Kg.cm}^{-2} = 7 \times 10^3 \text{ Pa}$), respectivamente.

Além dessa delimitação pelo módulo elástico, algumas outras características são típicas de cada um desses materiais. Assim, borracha, ou elastômero, é um material macromolecular que exibe elasticidade em longa faixa, à temperatura ambiente. Plástico (do grego, “adequado à moldagem”), é um material macromolecular que, embora sólido no estado final, em algum estágio do seu processamento pode tornar-se fluido e moldável, por ação isolada ou conjunta de calor e pressão. Fibra é um termo geral que designa um corpo flexível, cilíndrico, com pequena seção transversal, com elevada razão entre o comprimento e o diâmetro (superior a 100). No caso de polímeros, engloba macromoléculas lineares, orientáveis longitudinalmente, com estreita faixa de extensibilidade, parcialmente reversível (como os plásticos), resistindo a variações de temperatura de -50 a $+150^\circ\text{C}$, sem alteração substancial das propriedades mecânicas; em alguns casos são infusíveis [1].

A tabela 2 mostra uma síntese para a classificação de polímeros citada.

Tabela 2: Classificação para polímeros

Classificação de polímeros	
Critério	Classe de polímero
Origem do polímero	<ul style="list-style-type: none"> • Natural • Sintético
Número de monômeros	<ul style="list-style-type: none"> • Homopolímero • Copolímero
Método de preparação do polímero	<ul style="list-style-type: none"> • Polímero de adição • Polímero de condensação • Modificação de outro polímero
Estrutura química da cadeia polimérica	<ul style="list-style-type: none"> • Poli-hidrocarboneto • Poliamida • Poliéster
Encadeamento da cadeia polimérica	<ul style="list-style-type: none"> • Sequência cabeça-cauda • Sequência cabeça-cabeça, cauda-cauda
Configuração dos átomos na cadeia polimérica	<ul style="list-style-type: none"> • Sequência cis • Sequência trans
Taticidade da cadeia polimérica	<ul style="list-style-type: none"> • Isotático • Sindiotático • Atático
Fusibilidade e/ou solubilidade do polímero	<ul style="list-style-type: none"> • Termoplástico • Termorrígido
Comportamento mecânico do polímero	<ul style="list-style-type: none"> • Borracha ou elastômero • Plástico • Fibra

1.1.2. POLÍMEROS CONDUTORES

Grandes ou médias extensões de elétrons- π conjugados tornam polímeros orgânicos condutores (PCs) e que por sua vez apresentam propriedades incomuns para esses tipos de materiais como condutividade elétrica, baixo potencial de ionização associado com alta afinidade eletrônica e baixa energia de transmissão óptica. Esses “metais sintéticos”, assim denominados devido a suas propriedades incomuns, são policonjugados com propriedades eletrônicas, magnéticas, condutoras e ópticas similares as dos metais e ainda mantém as propriedades convencionais de polímeros orgânicos comuns.

A faixa de condutividade eletrônica intrínseca dos PCs (cerca de 10^{-14} a 10^2 S.cm⁻¹) ocorre devido à grande extensão de conjugação do estado dopado [2]. PCs foram descobertos a cerca de 3 décadas e suas propriedades têm atraído a atenção de inúmeros pesquisadores no mundo, pois

despertam considerável interesse para várias aplicações [3].

Polímeros como polipirrol, polianilina, poliacetileno e politiofeno têm sido utilizados em grande escala, pois suas eletropolimerizações permitem a formação de filmes poliméricos com interessantes propriedades [2,4,5]. Eles apresentam alta condutividade e estabilidade tanto no ar quanto em soluções aquosas. A passagem de carga durante a eletropolimerização controla de forma bastante eficaz a espessura do filme e a quantidade de biomoléculas imobilizadas durante a análise.

A figura 3 mostra a estrutura desses quatro polímeros intrinsecamente condutores.

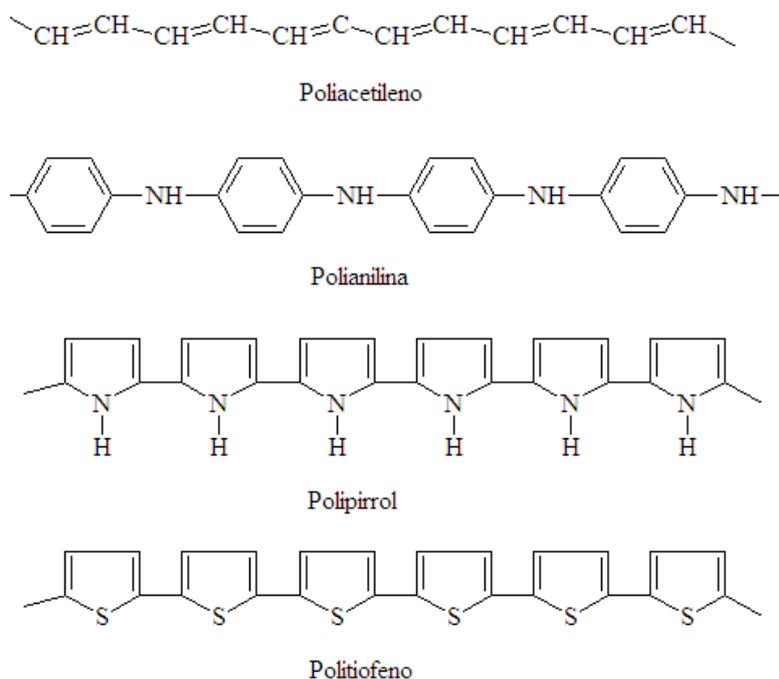


Figura 3: Estrutura dos polímeros condutores intrínsecos (PICs) mais estudados.

Estudos indicam que monômeros aromáticos contendo grupos diretamente ligados ao oxigênio apresentam facilidade para polimerização, além de elevada reprodutibilidade e resistência mecânica para os filmes poliméricos obtidos, permitindo maior estabilidade do eletrodo modificado [6,7].

Polímeros orgânicos derivados de polifenóis ou poli(o-fenilenodiamino) [8,9], dependendo da metodologia de preparação, podem apresentar alta resistividade. São preparados por eletropolimerização e seu crescimento é limitado formando um filme bem mais delgado (10 – 100 nm de espessura) que os formados por polímeros condutores. Por serem delgados, apresentam uma

resposta mais rápida já que o substrato e o analito difundem-se mais rapidamente em sua extensão [10].

No geral são permeseletivos e evitam que espécies interferentes ou contaminantes atinjam a superfície do eletrodo comportando-se como espécies de altíssima seletividade e sensibilidade além da rapidez nas leituras [11].

Para aplicações em sensores, polímeros funcionalizados com grupamentos hidroxila, carboxila, amino, aldeídos ou grupos succinimidil carbonato favorecem a formação de ligações covalentes com biomoléculas [12].

Vários estudos eletroquímicos comprovam que aminofenóis têm se mostrado compostos promissores pois apresentam dois grupos substituintes do anel aromático que são química e eletroquimicamente ativos ($-NH_2$ e $-OH$) e assim podem apresentar comportamento semelhante ao da anilina e também ao do fenol [13,14].

1.2. ELETRODOS MODIFICADOS

A superfície de eletrodos de grafite, ou de outros materiais condutores, pode ser recoberta com algum tipo de polímero intrinsecamente condutor ou até mesmo não condutor com uma finalidade específica de alterar a condutividade elétrica de sua superfície para um objetivo específico.

Polímeros intrinsecamente condutores têm sido muito utilizados em várias pesquisas envolvendo vários campos da ciência, com o objetivo de desenvolver projetos aplicados na produção de células solares, baterias, aparelhos eletrocromáticos, sensores, aparelhos eletrônicos moleculares, biossensores e eletrodos quimicamente modificados (EQM) [15,16].

Murray e colaboradores introduziram o conceito de eletrodo quimicamente modificado em 1975. A modificação dessa superfície visa controlar a natureza físico-química da interface entre o eletrodo e a solução para alterar a sua reatividade e seletividade, ampliando o desenvolvimento de eletrodos para vários fins e aplicações [17].

Dentre as principais vantagens dos EQM's destacam-se as interações seletivas e pré-concentração de um analito na camada modificadora, transferência de elétrons lenta na eletrocatalise de reações redox sobre a base do eletrodo, permissividade com o uso de membranas para selecionar interferentes eletroativos, detecção eletroquímica de analitos

iônicos não redox, incorporação de biomoléculas, particularmente enzimas, no desenvolvimento de biossensores, incorporação de monocamadas em grupamentos pré-definidos em eletrodos auto arranjados [18], bem como a incorporação de bicamadas lipídicas e monocamadas fosfolipídicas [19], explorando a permeabilidade destas membranas biológicas. Em termos analíticos, a sensibilidade ou seletividade de uma determinação deve aumentar com a utilização de um EQM para que seu emprego seja justificado [17].

A área de contato do eletrodo com a solução que contém o analito influencia diretamente nas informações obtidas com o uso de técnicas analíticas, as quais devem apresentar bom sinal e considerável reprodutibilidade [20].

Um EQM consiste de duas partes, isto é, o eletrodo base e uma camada formada pelo modificador químico. A forma de preparação de um eletrodo quimicamente modificado é determinada pelas características analíticas desejadas na utilização final desse eletrodo. Os diversos estudos realizados com esses dispositivos, buscando otimizar suas performances, levaram a uma grande evolução destes sensores [22], a qual está resumida na tabela 3:

O material escolhido do eletrodo base para incorporar o polímero em sua superfície modificando-a, é um aspecto importantíssimo para a preparação de um EQM, pois deve apresentar características eletroquímicas adequadas e também ser propício para a imobilização de, por exemplo, catalisadores ou biomoléculas. Existem eletrodos de ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme, fibras de carbono, pasta de carbono, carbono grafite, carbono reticulado, material plástico condutor e até vidros condutores [21].

Outra importância da escolha do material para confecção do eletrodo é que as respostas obtidas são de reações redox que ocorrem na superfície do eletrodo onde a solução que contém o analito entra em contato. Isso porque o analito de interesse pode interagir com a superfície do eletrodo resultando numa transferência eletrônica. Porém, se não ocorrer essa transferência ou a superfície do eletrodo não fornecer condições ideais para que essa transferência eletrônica ocorra, pode acontecer de essa transferência ser muito lenta ou até mesmo que ela ocorra em valores fora do potencial do eletrodo. Essa superfície pode ser modificada com um polímero condutor ou não condutor a fim de melhorar a resposta final onde a solução que contém o analito irá entrar em contato diretamente com esse polímero modificante [20].

Tabela 3: Linhas gerais do desenvolvimento dos EMQ's [1].

METAS	AÇÃO
Imobilização de grupos funcionais	Melhora a seletividade e a sensibilidade
Incorporação de catalisadores inorgânicos (ftalocianinas metálicas)	Maior sensibilidade
Incorporação de catalisadores biológicos (imobilização de glicose oxidase) (biossensores)	Melhora a sensibilidade
Utilização de filmes poliméricos (polipirrol)	Estabilidade, sensibilidade
Aparecimento da denominação “eletrodo quimicamente modificado” (EQM)	Definição da terminologia
Microeletrodos modificados, na década de 80	Aplicações <i>in vivo</i>
Matrizes inorgânicas (eletrodos de sílica modificada), década de 80	Maior estabilidade
Uso de membranas biológicas (membranas em fosfolipídeos) Miller e Milazzo, em 1981	Melhora a estabilidade e o tempo de vida
Incorporação de aditivos (PEI e BSA)	Maior sensibilidade e seletividade

A escolha do material para o eletrodo base, cuja superfície sofrerá modificação é um aspecto muito importante na preparação de um EQM. Este substrato deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser apropriado para o método de imobilização selecionado.

Dessa forma, a utilização de EQM's é uma área em franca expansão, principalmente no aspecto do desenvolvimento de novos materiais e novos métodos de modificação de superfícies de eletrodos, como na utilização de cerâmicas [23], filmes de metal-hexacianoferrato [24] e macromoléculas, tais como DNA [25] o que visa ampliar e potencializar as aplicações desses dispositivos que, em muitos casos, já estão disponíveis no mercado, como os sensores eletroquímicos para o monitoramento de glicose [26].

1.2.1. PREPARAÇÃO DE POLÍMEROS PARA EQM'S

Uma das áreas mais promissoras para a fabricação de polímeros é a modificação da superfície de eletrodos com polímeros que possuam propriedades intrínsecas condutoras ou que contêm moléculas eletroativas [27]. A tecnologia eletroquímica tem recebido grande atenção,

tanto devido à simplicidade quanto à vantagem de se obter um polímero condutor sendo simultaneamente dopado [28]. Filmes poliméricos podem ser depositados diretamente sobre uma superfície condutora e a espessura do filme pode ser facilmente controlada, o que é de grande importância quando a superfície de revestimento está em estudo [29].

A carga elétrica dentro da célula pode ser conduzida por três processos distintos nas várias partes da célula eletroquímica:

- a) Nos eletrodos e no condutor metálico externo, os elétrons atuam como transportadores de carga.
- b) Nas soluções, o fluxo de elétrons envolve a migração de cátions e de ânions.
- c) Nas superfícies dos eletrodos, onde ocorrem as reações redox.

Esse conjunto fornece um mecanismo pelo qual a condução iônica da solução é acoplada a condução eletrônica do eletrodo para gerar o circuito elétrico para o fluxo de cargas [30].

As medidas eletroquímicas envolvem sistemas heterogêneos, pois o eletrodo pode doar ou receber elétrons das espécies que estão na solução, numa posição imediatamente adjacente ao eletrodo; por isso, essa camada de eletrólitos pode ter uma composição diferente do restante da solução. A figura 4 mostra esse conjunto de cargas na interface eletrodo/solução e também na solução adjacente, imediatamente próxima da superfície do eletrodo. A esse conjunto de cargas elétricas denomina-se dupla camada elétrica



Figura 4: Dupla camada elétrica formada na superfície do eletrodo como resultado do potencial aplicado. (d_0 a d_1) camada interna compacta e (d_1 a d_2) camada difusa [30].

São dois os tipos de processo que podem conduzir corrente através de uma interface eletrodo/solução. 1) O processo faradaico, onde a transferência de elétrons ocorre via reação de oxidação em um eletrodo e redução no outro. Denomina-se faradaico pois esse processo adequa-se a lei de Faraday onde a quantidade de produto produzido por essas reações redox simultâneas depende diretamente da corrente que passa pelo circuito durante o processo reacional [30]. 2) O processo capacitivo, que ocorre em um intervalo de potencial exatamente em locais onde os processos faradaicos são impedidos em um ou em ambos os eletrodos por razões termodinâmicas e cinéticas. A chamada corrente capacitiva interfere nas medidas forçando a transferência de elétrons do potenciostato para o eletrodo de trabalho, fazendo com que o potencial desse eletrodo fique mais negativo, atraindo os cátions da solução para sua superfície, gerando um fluxo de cargas responsável por uma corrente capacitiva não originada de processos redox denominada corrente não-faradaica.

A corrente faradaica requer a transferência contínua de espécies reativas da solução para a superfície do eletrodo e uma consequência dessa migração de cargas são mecanismos de transferência de massa que podem ser classificados de três formas diferentes [31]:

- a) Convecção: que envolve movimento da solução que passa pela superfície do eletrodo como resultado de agitação do sistema.
- b) Migração: que envolve o movimento dos íons por atração eletrostática desses com os eletrodos de cargas opostas.
- c) Difusão: que envolve o movimento das espécies causando um gradiente de concentração.

Processos de geração de corrente através da aplicação de um potencial que ocorre na interface eletrodo-solução são fundamentos das técnicas eletroquímicas citadas no tópico 1.2.2.

1.2.2. TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS PARA A FORMAÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS.

A síntese polimérica de polímeros condutores pode ocorrer através de técnicas eletroquímicas e esses métodos têm se tornado preferenciais pois são simples e apresentam boa reprodutibilidade. A polimerização eletroquímica geralmente utiliza os seguintes métodos [31,32]:

- a) Galvanostático, corrente constante.

- b) Potenciostático, potencial constante.
- c) Voltamétrico, variação cíclica do potencial.

Os melhores filmes são obtidos quando se utiliza um sistema com três eletrodos na solução do monômero e eletrólito apropriado [33,34,35]. Desta forma, a contaminação do filme devido à oxidação e redução de espécies do mesmo eletrodo é diminuída e o eletrodo de trabalho é protegido contra sobrecargas de corrente. A solução contendo o eletrólito deve solubilizar o monômero, mas não o polímero formado.

Em eletroquímica utiliza-se muito o método voltamétrico, que é um conjunto de técnicas nas quais se observa uma relação entre o potencial e a corrente durante o processo eletroquímico. Nesse método, aplica-se um sinal de excitação de potencial variável sobre os eletrodos de uma célula eletroquímica. Esse método baseia-se numa resposta característica de corrente em função da variação do potencial aplicado, representada por uma curva denominada voltamograma [36].

Na voltametria cíclica, o potencial elétrico aplicado no eletrodo de trabalho corresponde a uma onda triangular como mostra na figura 5.

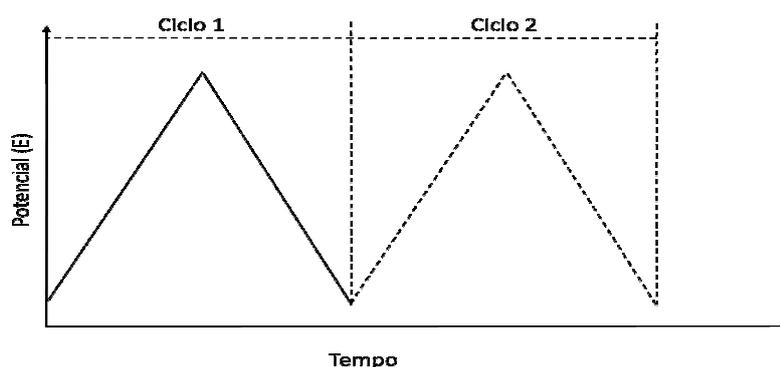


Figura 5: Representação de duas ondas no processo de voltametria cíclica.

Nessa técnica, o potencial é repetido ciclicamente com inversões periódicas, aumentando, primeiramente, de forma linear até seu valor máximo e então decrescendo linearmente com o mesmo valor numérico de inclinação até seu valor original. A repetição desse processo ocorre de acordo com o comando que se dá ao software que executa a quantidade de ciclos que se deseja. Na técnica de voltametria cíclica, realiza-se a varredura de potencial direto e inverso de vários ciclos sucessivos, observando-se os picos anódico e catódico da espécie eletroativa. Se, por algum motivo, houver adsorção de espécies eletroativas no eletrodo, os picos de oxidação e redução irão crescer a cada varredura, até que haja saturação dessa espécie na superfície do eletrodo. Esse crescimento irá

ocorrer no mesmo potencial se a reação for reversível, isto é, se a quantidade de cargas envolvidas nas varreduras catódicas e anódicas forem semelhantes [30,36].

No processo de eletropolimerização, a espessura do filme pode ser controlada pela variação de potencial ou corrente aplicada *versus* tempo ou então através da variação do número e/ou velocidade de varredura de potencial. Os ânodos mais utilizados são de cromo, níquel, paládio, titânio, platina, placa de vidro revestido com índio-óxido de estanho, grafite ou carbono vítreo [37].

Técnicas de pulso diferencial melhoraram consideravelmente a distinção entre as correntes capacitiva e faradaica. Nesse caso, a instrumentação foi desenvolvida de tal modo que as medidas de corrente e aplicações de potencial assim como de pulsos de potencial fossem realizados em intervalos de tempos pequenos [38].

1.3. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS (EQM).

Os filmes poliméricos produzidos para a formação de EQM's, podem ser caracterizados por várias técnicas entre as quais podemos citar a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), a microscopia de força atômica (AFM) e a microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (MECQ).

1.3.1. MICROBALANÇA ELETROQUÍMICA DE CRISTAL DE QUARTZO (MECQ)

O princípio de operação da MECQ está relacionado com o efeito piezoelétrico. Este efeito se deve à propriedade de certos materiais gerarem um campo elétrico quando são submetidos a deformações ou pressões externas. Quando a polaridade da perturbação mecânica varia, varia também a polaridade do campo elétrico gerado. Este fenômeno é denominado efeito piezoelétrico direto e os cristais que exibem este efeito são chamados cristais piezoelétricos. Também é possível aplicar um campo elétrico sobre o material piezoelétrico provocando uma deformação, e estas variações mecânicas no cristal podem seguir as variações de direção da mesma maneira que a perturbação elétrica. Neste caso, observa-se a ocorrência do efeito piezoelétrico reverso. Quando a perturbação elétrica tem as características adequadas (amplitude e frequência), as quais são determinadas pela geometria e propriedades do cristal, este oscilará mecanicamente em um modo ressonante [39]. Estas condições significam que um cristal piezoelétrico pode oscilar em seu modo de cisalhamento (propagação da onda

perpendicularmente ao campo elétrico) devido ao efeito piezoelétrico reverso. A Figura 6 mostra um desenho esquemático do deslocamento cisalhante dos planos do cristal quando se aplica um campo elétrico perpendicular à superfície do mesmo.

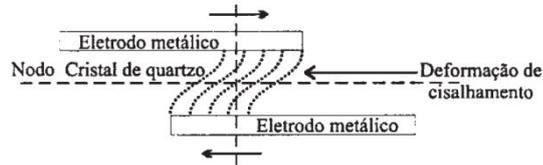


Figura 6 : Desenho esquemático de um cristal, mostrando o nodo da onda acústica passando pelo centro do disco e a deformação causada pelo cisalhamento

No caso da MECQ, o campo elétrico é aplicado sobre eletrodos de depósitos metálicos feitos sobre ambas as faces do disco. Na Figura 7 está ilustrada uma visão superior e lateral de um cristal de quartzo com depósitos de um metal (ouro, por exemplo) para aplicação do campo elétrico.

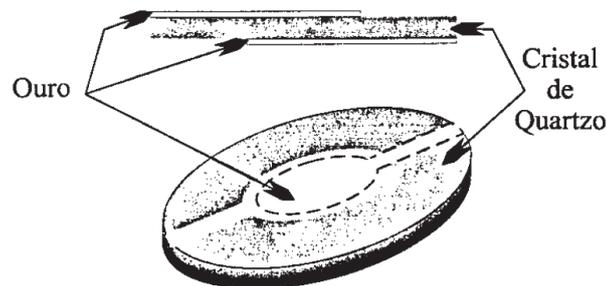


Figura 7: Desenho esquemático da vista superior e lateral de um cristal de quartzo com depósitos metálicos em ambos os lados.

Com uma excitação de 1 V e utilizando frequências entre 5 e 15 MHz, com um dos eletrodos conectado a terra, se cria uma onda de cisalhamento do cristal com um deslocamento físico paralelo ao plano da superfície e perpendicular ao campo elétrico aplicado. A frequência da onda acústica está relacionada com a espessura do cristal, de acordo com a equação [39].

$$= \frac{1}{2} \quad = \frac{1}{2} \quad (1)$$

onde v é a velocidade de propagação da onda acústica no quartzo (3340 m s^{-1}), t_c é a espessura do disco, μ_c é o módulo de cisalhamento ($2,95 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$) e ρ_c é a densidade do quartzo ($2,65 \text{ g cm}^{-3}$).

Os cristais de quartzo, podem ser obtidos comercialmente com diferentes tratamentos superficiais. Os mais comuns são os polidos mecanicamente e são opticamente rugosos. As superfícies com estas características incrementam a aderência do metal sobre o cristal, mas podem causar problemas na determinação das variações de frequência quando o cristal é transferido do ar a um líquido. Superfícies com outras características são obtidas com polimento químico. Tal tratamento produz superfícies com polimentos de qualidade óptica conhecidos como polimentos de sobretom harmônico, e estes cristais têm uma boa estabilidade em frequências altas, que correspondem aos harmônicos ímpares.

As frequências fundamentais mais utilizadas estão entre 5 e 10 MHz porque os cristais têm espessuras que facilitam o manuseio e o arranjo experimental. Como a sensibilidade de detecção depende da frequência de ressonância, a sensibilidade é maior para frequências maiores; o compromisso entre a facilidade de manuseio e a sensibilidade indica que, para a maioria dos casos, excelentes resultados são obtidos com cristais cuja frequência característica está entre 5 e 10 MHz [39].

1.3.2. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA (EIE)

Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) é uma poderosa técnica para a caracterização de sistemas eletroquímicos. Tem ampla aplicação na área de caracterização dos materiais sendo utilizada rotineiramente na caracterização de coberturas, pilhas, células combustíveis, fenômenos de corrosão, dentre outras. Também tem sido extensivamente utilizada como ferramenta para estudar mecanismos em eletrodeposição, eletrodissolução, passividade e à estudos de corrosão, difusão de íons através membranas, estudos de interface de semi-condutores e biossensores.

EIE fornece informações importantes relativas às características eletroquímicas de um sistema, como capacitância da dupla camada, resistência de transferência de carga, impedância de difusão e resistência da solução. Também consiste num método eficiente para avaliar a

velocidade de transferência eletrônica no eletrodo quando na presença de espécies redox em solução.

Aplicada em sistemas eletroquímicos, a resposta são circuitos elétricos equivalentes que forneçam respostas iguais às fornecidas pelos processos físico-químicos do sistema em análise. A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica é uma ferramenta que poderá prever a maneira como o revestimento dos eletrodos se comportará com o tempo, em relação ao processo corrosivo ou outro.

A técnica tem como base a aplicação de um potencial ou corrente alternada, sendo uma delas a variável controlada, medindo-se a intensidade e diferença de fase da outra variável. Neste trabalho utilizou-se a impedância eletroquímica em potencial constante, onde a perturbação do sistema é feita mediante a aplicação de um potencial contínuo (potencial central aplicado) sobre a qual é superimposta uma variação senoidal de potencial com pequena amplitude (Figura 8). Este método de aplicação de potencial possibilita que o sistema seja perturbado empregando poucos milivolts, de forma a tornar possível a investigação de fenômenos eletroquímicos próximos ao estado de equilíbrio. Além disto, é possível perturbar o sistema usando diferentes valores de frequência, pois a onda de potencial é senoidal. Na EIS surge uma corrente de natureza senoidal como resultado da aplicação de um potencial senoidal ao sistema. Mediante um monitoramento das relações entre o potencial aplicado e a corrente são obtidas a impedância do sistema e o ângulo de fase (defasagem da corrente em relação ao potencial aplicado) [20].

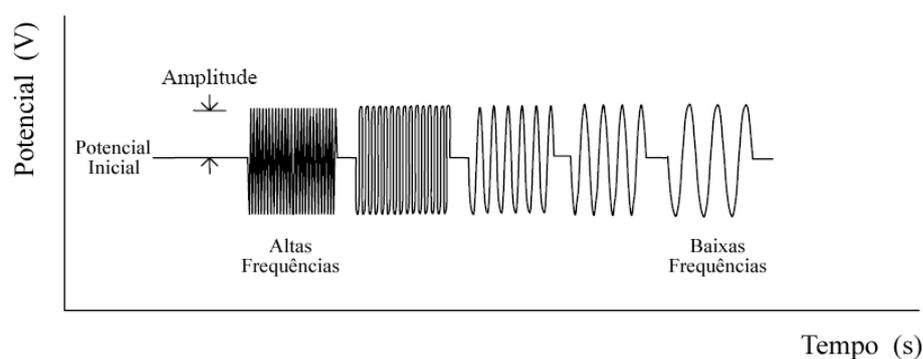


Figura 8: Diagrama da onda de potencial aplicada em função do tempo para realização das medidas de EIS a potencial constante.

As medidas são realizadas variando-se os valores de altas frequências para baixas frequências. Desta forma, diferentes processos físicos e químicos possam ser separados por suas constantes de tempo. A corrente e o potencial são amostrados e analisados para se obter a impedância imaginária e real. Após o experimento, os resultados de impedância podem ser apresentados em diversas formas. Neste contexto, o denominado diagrama de Nyquist que representa graficamente Z'' (componente imaginária da impedância) vs Z' (componente real da impedância), como também o diagrama de Bode, onde ϕ (ângulo de fase) vs $\log \omega$ (ω - frequência), são os comumente mais utilizados e se tornam de grande importância para a interpretação de dados provenientes da EIS, pois as informações obtidas a partir destes gráficos podem ser complementares.

Dentre as técnicas eletroquímicas, o grupo mais comumente utilizado em estudos sobre a dupla camada elétrica (DCE) é aquele que envolve a aplicação de um sinal alternado e a análise da resposta do sistema a essa perturbação. A aplicação dessa técnica a eletrodos gotejantes de mercúrio foi realizada pela primeira vez por Grahame [40] na década de quarenta e, a partir daí, teve sua utilização generalizada aos estudos de adsorção de íons [41,42] e moléculas orgânicas [43,44]. A aplicação da técnica de EIE a estudos da DCE em eletrodos de mercúrio, cujo circuito equivalente é uma resistência em série com um capacitor (circuito RC), consiste basicamente em analisar a dependência da componente imaginária da impedância do sistema (Z_i) em função da correspondente componente real (Z_r). O gráfico resultante para este caso é uma reta vertical, paralela ao eixo imaginário, com intersecção no eixo real no valor da resistência da solução (R_s) [44].

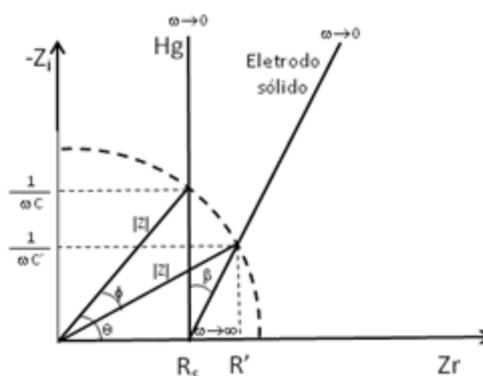


Figura 9: Dispersão de frequências de Z_i e Z_r envolvendo uma superfície eletródica.

Em interfaces envolvendo uma superfície eletródica sólida a dependência de Z_i com Z_r apresenta uma dispersão de frequências, causada pela distribuição não-uniforme da densidade de corrente, que pode ser representada como na figura 8 [44]:

Esta não-uniformidade da corrente na superfície do eletrodo tem sido atribuída a rugosidade e heterogeneidade da superfície do eletrodo sólido [45] resultando em um diagrama de impedância linear com intersecção no eixo de Z_r com um ângulo menor que 90° [46,47]. Conseqüentemente, um circuito RC simples não fornece uma descrição adequada da resposta a.c. e assim, é introduzido ao circuito eletrônico um elemento de fase constante (EFC), sendo o circuito equivalente da interface eletrodo-solução descrito como na figura 9:

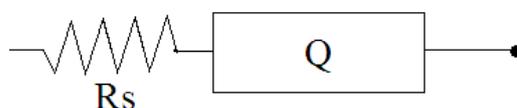


Figura 10: Circuito equivalente da interface eletrodo-solução.

Alguns métodos alternativos para determinação da capacidade da DCE tem sido apresentados. Clavilier [48], na década de sessenta, propôs um método de medida que consistia em impor uma tensão simoidal de alguns milivolts e amplitude constante entre a extremidade do eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho. Uma tensão variando linearmente com o tempo (sinal triangular) é então aplicada ao eletrodo de trabalho e a resposta é registrada em um osciloscópio. A velocidade de um ciclo de potencial contínuo é de 50 s e a frequência do sinal senoidal de 170 Hz. Este método foi muito empregado para estudos qualitativos do comportamento de curvas de capacidade diferencial de interface ouro/solução aquosa puramente iônica [49,50].

1.4. BIOSSENSORES

O desenvolvimento de biossensores tem relatos do século passado onde o primeiro biossensor, conhecido como eletrodo enzimático, é creditado a Clark e Lions em 1962 [51], onde a enzima glicose oxidase foi acoplada a um eletrodo para a medida de concentração de O_2 numa solução de análise. A reação de consumo de oxigênio O_2 é proporcional a concentração do

substrato. Essa variação na concentração de gás oxigênio O_2 é reconhecida pelo eletrodo que determina a quantidade de glicose na solução de análise [52].

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo que emprega um elemento de reconhecimento acoplado a um transdutor (figura 10), que é responsável pela interação entre o analito de interesse e o eletrodo. Esse contato indireto gera um sinal elétrico que se torna mensurável [54-55]. Os materiais bioativos utilizados na recepção podem ser dos mais variados tipos, tais como: ácidos nucleicos [27], organelas, tecido animal ou vegetal, microrganismos, lectina, células [51], enzimas, antígenos ou anticorpos [29].

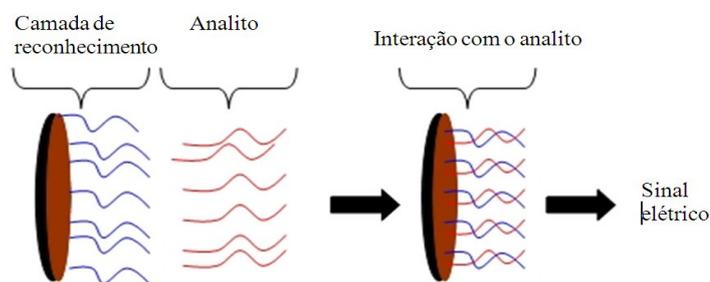


Figura 11: Esquema representativo de um biossensor.

Os transdutores podem ser classificados como: eletroquímicos, térmicos, ópticos e de detecção de massa, sendo que estas classificações são dadas de acordo com os tipos de transdutores utilizados [17,51,56]. Um biossensor também pode ser classificado como catalítico, por exemplo, quando uma enzima catalisa a reação, ou de afinidade, quando há reconhecimento de um elemento como fragmentos de DNA [52].

A especificidade bioquímica do material biológico ativo de um biossensor define sua função. Fatores como estocagem, estabilidade ambiental e operacional e o analito a ser detectado definem a escolha desse material [42].

Outro tipo de biossensor são os enzimáticos, que combinam seletividade e sensibilidade de uma enzima com um transdutor. A imobilização e estabilização das enzimas sobre a superfície do polímero, formado sobre o eletrodo, são etapas fundamentais no desenvolvimento desse tipo de sensor, visando melhorar a estabilidade química desses materiais responsáveis pelo reconhecimento [17,58,59].

Outro tipo de biossensor, chamado de imunossensor, baseia-se em uma reação imunológica

específica, onde um anticorpo ou um antígeno é imobilizado na superfície do transdutor [28,60].

Também existem biossensores que detectam a presença de antígenos (substâncias de baixa massa molecular, que podem se ligar a sítios específicos de combinação de anticorpos formando um complexo antígeno-anticorpo). Quando se faz o ensaio imunológico, o sítio combinatório do anticorpo interage especificamente com regiões mais superficiais do antígeno, chamadas determinantes antigênicos. A interação entre antígenos e anticorpos, é gerenciada por uma constante de equilíbrio que determina a afinidade entre as espécies envolvidas, em função das concentrações do complexo formado e também das concentrações do antígeno e do anticorpo no meio. As interações intermoleculares, do tipo Van der Waals ou ligações de hidrogênio, são as responsáveis por garantir a especificidade entre anticorpo e antígeno [53,61].

Existe também outro tipo de biossensor microbiológico que consiste de um transdutor em conjunto com uma célula imobilizada [58]. Os microorganismos têm grandes vantagens como componentes biológicos para a construção de biossensores por isso, empregar células microbiológicas como biocatalisadores tem grande vantagem comparando-se com células livres e também com enzimas imobilizadas. Componentes biológicos como esses estão sempre presentes pois metabolizam uma grande parte de compostos químicos e se adaptam muito bem em condições adversas [59].

Micróbios são também susceptíveis a alterações genéticas através da técnica do DNA recombinante que produz microorganismos com atividades enzimáticas alteradas e prestam-se como fonte para enzimas intracelulares [58,62]. A utilização de microorganismos evita as etapas de purificação e preserva a enzima em seu ambiente natural, protegendo-a da inativação por agentes tóxicos externos, tais como metais pesados [58,62].

A utilização de células é limitada pela baixa especificidade quando comparado com os biossensores contendo a enzima pura, e pelo maior tempo de resposta. No entanto, quando a célula é permeabilizada, a maioria dos cofatores de baixo peso molecular sai da célula, minimizando reações não desejadas [63,7]. No caso da enzima de interesse estar localizada no periplasma, as células podem ser empregadas sem permeabilização [64].

Biossensores baseados em DNA utilizam oligonucleotídeos, produtos de PCR ou DNA imobilizados na superfície e conectados a um transdutor. Esse biossensor detecta genes específicos e também genes mutantes associados a doenças humanas hereditárias [65].

Pode-se detectar eletroquimicamente DNA de duas maneiras: oxidando diretamente bases

de DNA ou gerando uma resposta eletroquímica através de uma enzima, ou qualquer outro marcador redox por uma reação específica com o alvo do DNA [66].

O mapeamento recente do genoma humano, como também de vários outros organismos superiores, possibilitou o desenvolvimento de novas técnicas para a detecção de DNA e de seus polimorfismos. Os métodos desenvolvidos até agora baseam-se na imobilização de oligodesoxinucleotídeos (ODN) em uma superfície sólida composta de metal, óxidos, carbono vítreo, ou algum tipo de polímero [67, 68]. Segmentos desconhecidos de DNA são analisados colocando em contato esses segmentos com sondas de sequência conhecida de DNA que se ligarão completamente à sequência contida no fragmento a ser analisado [69].

A especificidade excepcional, proveniente da habilidade de duplicação das moléculas de DNA complementares em se duplicar ou hibridizar pelo pareamento de bases, oferece uma maneira prática de detectar sequências marcadas de DNA contidos em uma amostra.

Novas tecnologias de biossensores têm sido intensivamente investigadas devido a sua promissora rapidez e baixo custo dos testes envolvendo DNA. Essas tecnologias baseiam-se na imobilização de um filamento de DNA em diferentes transdutores físico-químicos que convertem o evento da hibridização num sinal elétrico ou óptico. Aplicações para essa tecnologia incluem identificação de patógenos, monitoramento de expressão de genes e diagnóstico de desordens genéticas [64].

1.4.1. FORMAS DE INCORPORAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

Vários métodos de imobilização de biomoléculas têm sido usados para o desenvolvimento de um biossensor. As técnicas mais comumente usadas para imobilização e desenvolvimento de sensores específicos são: imobilização física (adsorção física e aprisionamento), ou imobilização química (ligação cruzada e ligação covalente) [62].

1.4.1.1 Adsorção física.

Essa é a técnica que retém a biomolécula que se deseja imobilizar nas proximidades da superfície do transdutor, usando para isto membranas, tais como: sílica gel, celulose, polímeros, etc (figura 11).

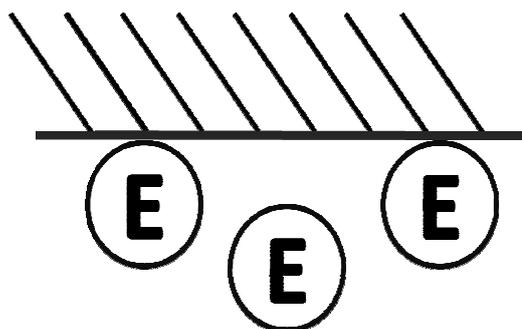


Figura 12: Incorporação de biomoléculas por adsorção física.

As forças de ligação são principalmente devidas a pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals e formação de sítios complexos de transferência de elétrons [59]. As vantagens desta técnica são: a ausência de modificação da biomolécula, baixo custo e possibilidade de regeneração da matriz. Entretanto, as forças de ligação são susceptíveis a mudança de pH, temperatura e força iônica do meio [70,60].

1.4.1.2. Aprisionamento.

Esse método envolve a aplicação de um potencial apropriado no eletrodo de trabalho, imerso em uma solução aquosa contendo moléculas do material biológico de interesse e do monômero. O material biológico presente nas vizinhanças da superfície do eletrodo é então incorporado durante o crescimento do polímero. Na adição, o “aprisionamento” ocorre sem reação química que possa afetar a atividade do material como mostrado na figura 12:

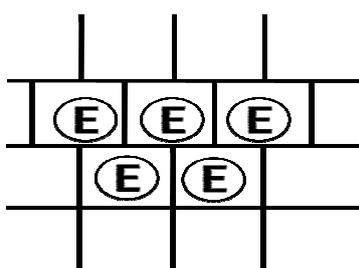


Figura 13: incorporação de biomoléculas por aprisionamento.

A vantagem da polimerização eletroquímica é que o filme pode ser preparado facilmente em um rápido procedimento. Neste método é possível controlar a espessura da camada

polimérica baseado na medida de carga elétrica durante a polimerização eletroquímica. A maior vantagem deste método sobre os outros convencionais é a possibilidade de eletrogerar um polímero cobrindo parte da superfície de um eletrodo de geometria complexa, apresentando um baixo custo, se comparado com outras técnicas. Como desvantagem, esta técnica apresenta uma alta barreira de difusão [57,72].

1.4.1.3. Ligação cruzada.

Nessa técnica usa-se um reagente bifuncional, como glutaraldeído, ou multi-funcional, como hexametileno di-isocianato, para imobilização da molécula em vários tipos de suportes sólidos como na figura 13 [73]. Ao usar esta técnica é necessário que haja preocupação com a acessibilidade ao componente bioativo. A vantagem de seu uso é que a perda da atividade do componente biológico é mínima, e o custo envolvido é relativamente moderado [61,55].

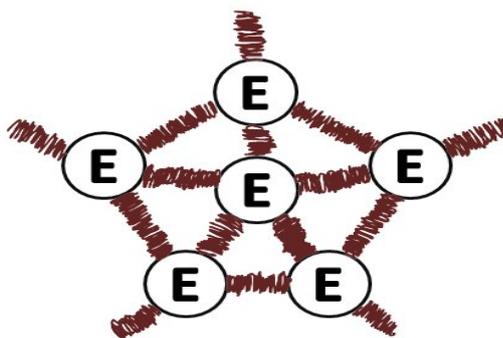


Figura 14: incorporação de biomoléculas por ligação cruzada.

1.4.1.4. Ligação Covalente.

Essa técnica é efetuada através da ligação entre grupos funcionais da molécula biológica de interesse, e uma matriz de suporte (figura 13) [6]. Como matriz de suporte é comum usar filmes poliméricos, os quais podem ser eletropolimerizados sob condições (solvente orgânico, altos valores de potenciais para o processo de polimerização) que normalmente causariam danos às biomoléculas.

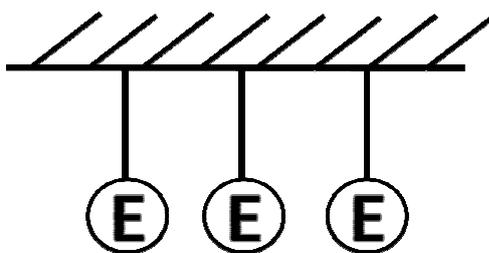


Figura 15: incorporação de biomoléculas por ligação covalente.

Além disso, a ligação covalente entre a biomolécula e o polímero funcionalizado pode ser feita em solução tampão aquosa contendo aditivos e estabilizadores, a qual preserva a atividade catalítica e/ou as propriedades de reconhecimento das biomoléculas [71]. Esta técnica apresenta como vantagem a baixa resistência difusional, ao passo que a desvantagem vem do fato de que a matriz de suporte não é regenerável [5,74].

1.5.1 TIPOS DE TRANSDUTORES

O transdutor pode ser classificado como eletroquímico (potenciométrico, amperométrico ou condutimétrico), térmico (calorimétrico), óptico (medida de luminescência, fluorescência, elipsometria, etc.), detector de massa (relaciona a oscilação da frequência de cristais piezelétricos com variações na massa) [17,51,75].

1.5.1.1. Transdutor amperométrico.

Emprega a medida de intensidade de corrente de uma célula eletroquímica a um potencial fixo, sendo a corrente gerada por reação redox na superfície sensível, proporcional à concentração do analito [76]. No biossensor enzimático, a enzima adequada, imobilizada na superfície do eletrodo, catalisa a reação dos substratos, e o monitoramento da corrente elétrica gerada poderá ser efetuado, devido à formação dos produtos ou consumo de reagente. Outras vezes, modifica-se a superfície do eletrodo com substância apropriada, denominada mediador, que oxidará um dos produtos e então monitora-se a corrente elétrica devida à re-oxidação eletroquímica do mediador na superfície do eletrodo. O mediador, evidentemente, deve ser seletivo e diminuir o valor do potencial a ser aplicado reduzindo a participação de eventuais

interferentes da reação [51].

Durante algum tempo uma das principais preocupações na construção de biossensores amperométricos centralizou-se na velocidade de transferência de elétrons do sítio ativo da enzima para a superfície do eletrodo [78, 79]. Isto é evidenciado quando se observam as transformações através das quais os biossensores têm passado, na procura de uma maior seletividade e eficiência na transferência de elétrons. Os biossensores de primeira geração, baseados na eletroatividade do substrato ou produto da reação enzimática, apresentavam problemas de interferências em virtude da necessidade de aplicação de potenciais muito altos [80, 81]. Na tentativa de diminuir estes potenciais, surgiram os biossensores de segunda geração, onde o emprego de mediadores de elétrons tinha como função o transporte de elétrons entre a enzima e o eletrodo [81]. Entretanto, esta configuração pode apresentar problemas de interferências, uma vez que, este arranjo pode facilitar também a transferência de elétrons proveniente de reações redox paralelas à reação entre a enzima e o substrato. Com o intuito de superar estes problemas, uma nova categoria de biossensores chamada de terceira geração tem sido proposta [82, 83]. Esta proposta é baseada na transferência direta de elétrons entre enzima e eletrodo na ausência de mediadores, sendo esta uma característica que a torna bastante vantajosa, já que promove uma maior seletividade, à medida que eles operam em potenciais mais próximos ao da própria enzima, diminuindo, como consequência, as reações interferentes, assim como dispensando o uso de outros reagentes na seqüência das reações enzimáticas. Segundo Kubota [62] uma transferência de elétrons eficiente é conseguida através da diminuição ou remoção da camada protetora de proteínas ao redor do sítio ativo da enzima, sem perder a seletividade e ao mesmo tempo aumentando a sensibilidade oferecida pelos biossensores construídos desta forma.

1.5.1.2. Transdutor potenciométrico.

Neste tipo de transdutor o potencial é gerado pela diferença de potencial entre um eletrodo de referência e o eletrodo indicador (biossensor), o qual varia com a atividade (ou concentração) da espécie que está sendo analisada [81]. O dispositivo potenciométrico mede o potencial do eletrodo indicador sobre condições de equilíbrio onde não há ao longo da interface eletrodo/solução eletrólise e nem transporte de carga. A diferença de potencial entre o eletrodo indicador e o eletrodo de referência é relacionada à concentração do analito de

acordo com a equação de Nernst ou de Donnan [59]. Este tipo de transdutor raramente é usado em biossensores com enzimas imobilizadas em polímeros eletrodepositados [5].

1.5.1.3. Transdutor condutométrico.

Os transdutores condutométricos são empregados quando o biorreconhecimento do substrato pela enzima produz mudanças na condutividade elétrica da solução, devido ao consumo ou produção de espécies iônicas. As principais vantagens dos biossensores condutométricos são: simplicidade de operação e o baixo custo dos detectores. Como principais desvantagens, encontram-se a baixa sensibilidade e a dependência da condutividade com a temperatura [84].

1.5.1.4. Transdutores Térmicos.

Os transdutores térmicos, cujas respostas dependem do efeito de aquecimento da radiação, são utilizados para a detecção de todos os comprimentos de onda no infravermelho, exceto os menores. Com esses dispositivos, a radiação é absorvida por um pequeno corpo negro e o aumento de temperatura resultante é medido. O problema de se medir radiação infravermelha por meios térmicos é complicado pelo ruído térmico do ambiente. Por esse motivo, os transdutores térmicos são encapsulados sob vácuo e cuidadosamente isolados de radiação térmica emitida por outros objetos próximos [85].

1.5.1.5. Transdutor calorimétrico.

Biossensores calorimétricos são usados quando a reação envolve importante conversão de entalpia. O calor leva a um aumento de temperatura proporcional a qual pode ser relacionada com a concentração do analito [44]. Para detecção, o sinal térmico gerado pela reação redox foi medido como oposto para a medida de sinal eletroquímico [23].

1.5.1.6. Transdutores ópticos.

Biossensores ópticos são baseados em medidas de absorção ou emissão de luz como consequência de uma reação bioquímica. Neste tipo de biossensor, ondas de luz são guiadas

por meio de fibras ópticas para um detector adequado [86].

Durante as duas últimas décadas houve um avanço significativo no desenvolvimento de sensores e biossensores ópticos para determinações de espécies de interesse químico e biológico. O primeiro sensor com transdução químico-óptico foi baseado na medida de mudanças no espectro de absorção e foi desenvolvido para determinações de CO₂ e O₂. Desde então, uma variedade de sistemas ópticos de detecção estão sendo utilizados em sensores e biossensores, incluindo, entre outros, elipsometria, espectroscopia (luminescência, fosforescência, fluorescência, Raman), interferometria (interferometria de luz branca, interferometria modal) e, finalmente, a ressonância de plasma de superfície. Nestes sensores, a quantificação da espécie de interesse é realizada por medidas do índice de refração, quantidade de luz absorvida, propriedades fluorescentes das moléculas analisadas ou um meio de transdução químico-óptica [87].

1.5.1.7. Transdutor piezoelétrico

Dispositivo piezoelétrico requer um cristal oscilante para alternar a frequência (MHz). A oscilação mecânica do cristal varia de acordo com a mudança de massa. Os cristais são recobertos com biomoléculas exibindo alta seletividade frente a substância a ser determinada. A principal desvantagem destes dispositivos depende da adsorção não seletiva [5].

Nos últimos anos um intenso esforço de investigação foi realizado no campo da análise eletroquímica procurando modelos de biossensores eletroquímicos capazes de proporcionar melhores características analíticas em termos de sensibilidade, seletividade, confiabilidade, facilidade de fabricação e utilização e baixo custo [56, 57, 66].

Atualmente, a detecção de seqüências específicas de DNA tornou-se um importante campo de investigação devido a sua aplicação no diagnóstico de doenças, rastreamento de drogas e proteção do meio ambiente [88,89].

Existe um crescente interesse na aplicação de biossensores para a detecção de DNA nos últimos anos devido à sua interessante condução elétrica e propriedades únicas das suas estruturas tridimensionais. O DNA imobilizado na superfície de um eletrodo não só fornece um microambiente biocompatível para biomolécula, mas também gera grandes aumentos na cobertura de biomoléculas na superfície do eletrodo [90].

Polímeros condutores mostram condutividade iônica e eletrônica, e, portanto, atuam como transdutores de íons e elétrons. Por esta razão, polímeros condutores apresentam a possibilidade de construção de sensores eletroquímicos de baixo custo, de fácil manuseio e grande capacidade de miniaturização e automação [63].

1.2. OBJETIVOS DO TRABALHO

O objetivo principal desse trabalho visa recobrir a superfície do eletrodo com uma camada modificadora de um eletrodo de grafite pela eletropolimerização de ácido 3-hidroxifenilacético (Figura 15), utilizando a técnica da voltametria cíclica. A caracterização do material eletrodepositado sobre a superfície do eletrodo também foi feita utilizando vários métodos diferentes e que se complementaram para a comprovar a existência do polímero derivado de ácido 3-hidroxifenilacético na superfície do eletrodo.

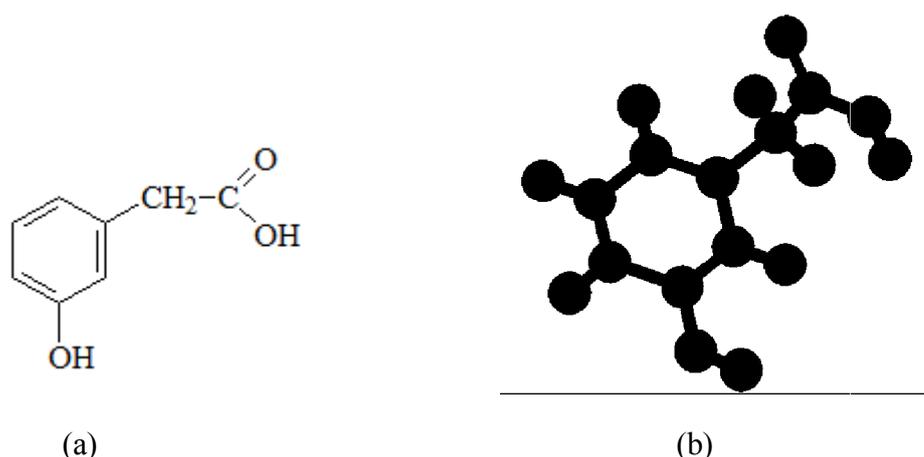


Figura 16: Estrutura do ácido 3-hidroxifenilacético (a) fórmula estrutural (b) modelo de bola e bastão.

Para a produção de eletrodos quimicamente modificados (EQM's) selecionou-se o ácido 3-hidroxifenilacético, que forma um polímero condutor e com um grupo funcional disponível (carboxila) para interagir de forma melhor com alguma molécula de reconhecimento. Essa biomolécula pode reagir na superfície do eletrodo através de um processo redox, onde as respostas de corrente e de potenciais obtidas pelo transdutor, são suficientes para identificar o analito de interesse em uma solução de análise através da incorporação dessa biomolécula.

CAPÍTULO 2: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Para a produção de eletrodos quimicamente modificados (EQM's) selecionou-se o ácido 3-hidroxifenilacético, que forma um polímero condutor e com um grupo funcional disponível (carboxila) para interagir de forma melhor com alguma molécula de reconhecimento. Essa biomolécula (analito alvo) pode reagir na superfície do eletrodo através de um processo redox, onde as respostas de corrente e de potenciais obtidas pelo transdutor, são suficientes para identificar esse analito de interesse em uma solução de análise através da incorporação dessa biomolécula.

2.1 – REAGENTES E MATERIAIS

Água desionizada ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, Milli-Q_{plus}); ácido 3-hidroxifenilacético, $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$, Acros Organics, 989%. M.M.=152,15; ácido fosfórico, H_3PO_4 , Reagen, 85%, $d=1,83$, M.M.=98; ácido perclórico, HClO_4 , Reagen, 70%, $d=1,66$, M.M.=100,46; ácido nítrico, HNO_3 , Cinética, 65%, $d=1,5$, M.M.=63,01; cloreto de potássio, KCl , Vetec, 99,5%, M.M.=74,55; ferricianeto de potássio, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, Reagen, 99,99%, M.M.=329,25; acetato de sódio, $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Pró Análise, 99%, M.M.=136; hidróxido de sódio, NaOH , Vetec, 98%, M.M.=40; oligonucleotídeos Invitrogen Life technology, 99,999%; gás nitrogênio ultrapuro; grafite em bastão, Alfa Aesar, 99,9995%, bastão com diâmetro=6mm; alumina Buehler, $0,3\mu\text{m}$; adesivo epóxi 24 horas da marca Araldite; fita veda rosca de teflon, (politetrafluoretileno); lixa d'água para metais.

2.2. SOLUÇÕES UTILIZADAS NOS EXPERIMENTOS

Todas as soluções estoque foram preparadas com água desionizada ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, Milli-Q_{plus}). Já as soluções de monômeros e eletrólitos foram mantidas sob borbulhamento com $\text{N}_{2(\text{g})}$ durante quarenta minutos para retirar o gás oxigênio residual dissolvido no sistema.

Para toda a parte experimental do trabalho utilizou-se as seguintes soluções:

- I. Suspensão de alumina $0,3 \mu\text{m}$ em água deionizada.
- II. Solução de ferricianeto de potássio/ferrocianeto de potássio 5 mmol.L^{-1} : a solução foi preparada a partir de 0,823 g de ferricianeto de potássio, 1,056 g de ferrocianeto de potássio e 5,055 g de nitrato de potássio. Os reagentes foram transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 500,0 mL e completado o volume.
- III. Solução monomérica $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$: a solução foi preparada a partir de 0,132 g de ácido 3-hidroxifenilacético e o volume foi ajustado para 50,0 mL com solução de ácido perclórico $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$.
- IV. Solução de ácido perclórico $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$: transferiu-se 15,1 mL de ácido perclórico, para

um balão volumétrico de 500,0 mL e completou-se o volume com água desionizada homogeneizando o sistema.

V. Solução estoque de cloreto de potássio 1 mol.L^{-1} : transferiu-se 7,460 g para um balão volumétrico de 100,0 mL e o volume foi completado com água deionizada.

VI. As sondas de oligonucleótidos de poli-adenina, poli (A) e de alvo, poli-timina, poli (T), foram sintetizados pela Invitrogen Life Technologies com as seguintes sequências: poli (A) 5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAA-3', poli (T) 5'-TTTTTTTTTTTTTTTT-3'.

VII. As soluções de estoque das sondas ($6,4 \times 10^{-2} \text{ mmol.L}^{-1}$) de poli(A) e do alvo oligonucleotídeos ($6,4 \times 10^{-2} \text{ mmol.L}^{-1}$) e de poli(T) foram preparados em água e armazenadas a -20°C até utilizar nos experimentos.

VIII. Solução tampão com os componentes ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical, E.U.A. (ACS pureza) e preparada em pH 4,7.

IX. As soluções dos monômeros de ácido 3-hidroxifenilacético, foram preparadas em solução $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de HClO_4 .

Todos os reagentes foram utilizados como recebidos. Os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ \text{C}$).

2.3. EQUIPAMENTOS

Toda a vidraria e demais recipientes onde as soluções eram introduzidas para análise, polimerização ou até mesmo estoque foram lavadas com água desionizada em abundância e também imersas em ácido nítrico de pureza analítica, por 24 horas e novamente o equipamento foi submetido a outra lavagem com água como anteriormente.

2.3.1 Preparação dos eletrodos de trabalho

Foram utilizadas diferentes metodologias para a preparação dos sistemas onde os experimentos foram realizados. Sempre foi imprescindível a preparação de vários eletrodos de trabalho diferentes para que os resultados pudessem ter reprodutibilidade.

Os eletrodos de grafite foram preparados utilizando-se um disco de grafite com 6 mm de diâmetro e aproximadamente 2 mm de altura que foi colado (com uma cola de prata) em base de latão revestida com teflon, para que o contato elétrico fosse estabelecido. Após duas horas verificou-se a condutividade deste eletrodo com auxílio de um multímetro. A seguir, o espaço da

base entre grafite e teflon foi preenchido com a resina epóxi da marca Araldite 24 h para que não houvesse contato direto da solução condutora com a base metálica do eletrodo.

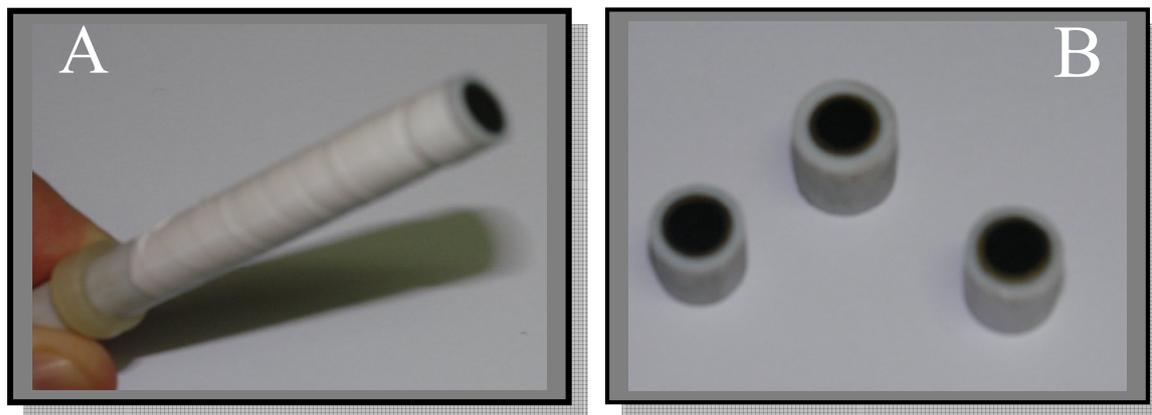


Figura 17: Eletrodo de disco de grafite: (A) afixado na base de teflon e recoberto com fita isolante de teflon; (B) eletrodos de grafite a granel.

Para a preparação do eletrodo de referência de prata/cloreto de prata, uma placa de prata, 0,2 mm x 2 cm x 2mm, foi previamente limpa com esponja de aço e água desionizada, em abundância. Para aumentar a área superficial desta placa, foram feitos riscos com uma lâmina de estilete e, a seguir, lavou-se com água deionizada. O contato elétrico foi feito usando um fio de cobre. O eletrodo de prata foi transferido para um recipiente contendo solução de cloreto de potássio 0,1 mol.L⁻¹. Um eletrodo de placa de platina foi utilizado como eletrodo de trabalho, e prata como eletrodo auxiliar. O recobrimento do eletrodo de prata foi feito por processo galvanostático, sob uma corrente de 0,5 mA por 1 hora e trinta minutos, sob agitação. O eletrodo de prata/cloreto de prata apresenta-se na Figura 18. A base para o eletrodo de trabalho foi confeccionado em teflon (politetrafluoretileno), com uma barra interna de latão para condução de corrente elétrica, onde o eletrodo de trabalho era parafusado diretamente na base metálica do eletrodo com a solução condutora e envolvido com a fita de teflon. O eletrodo de referência de platina apresenta uma placa desse metal, que é a parte do eletrodo que entra em contato direto com a solução da cela eletroquímica com uma área de aproximadamente 2cm², conectado a um fio de cobre que fecha o circuito em sua parte externa.

A figura 18 mostra os equipamentos citados.

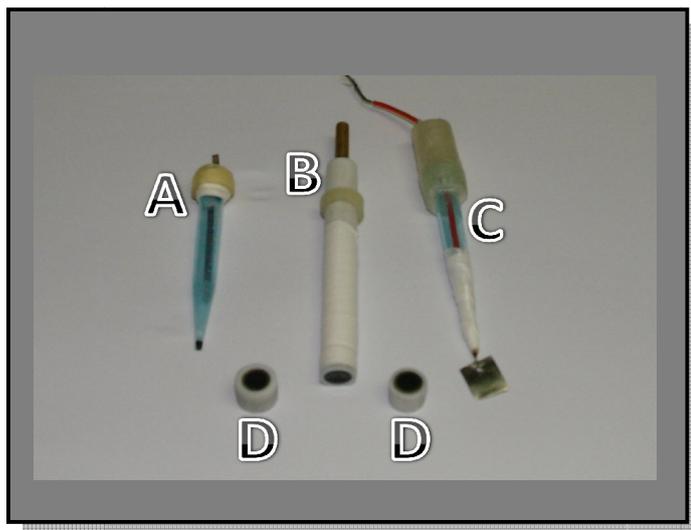


Figura 18: Eletrodos utilizados nos experimentos eletroquímicos: (A) eletrodo de prata/cloreto de prata; (B) base metálica recoberta com TEFLON onde os eletrodos são afixados; (C) eletrodo de referência feito de platina; (D) eletrodos de grafite já afixados na base e recobertos com a resina epóxi para evitar o contato da solução com a base metálica.

2.3.2 - Limpeza dos eletrodos:

Para polir os eletrodos de grafite, utilizou-se uma politriz (Arotec modelo AROPOL 2V 0,610433) com água em abundância, ilustrada na Figura 19.



Figura 19: Politriz (Arotec modelo AROPOL 2V 0610433) utilizada para polimento dos eletrodos com alumina.

2.3.3 – Potenciostato para análises voltamétricas

Para os experimentos de formação dos filmes foi utilizado o equipamento Potenciostato CH Instruments Modelo 420 A e 760 A, apresentado na Figura 20.

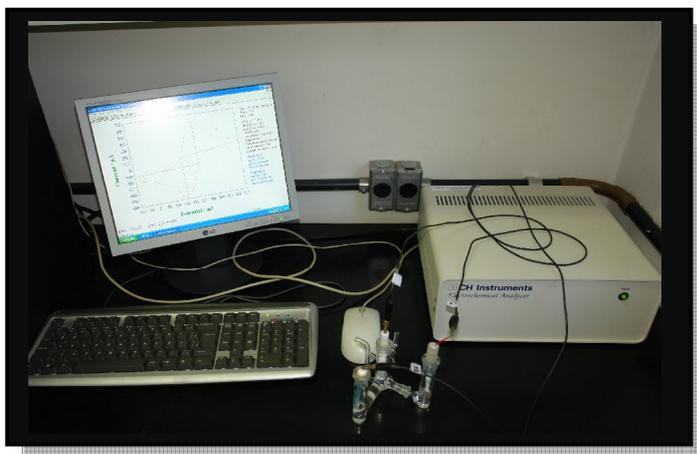


Figura 20: Potenciostato CH Instruments Modelo 420 A.

As análises de impedância foram conduzidas em um potenciostato/galvanostato marca AUTOLAB, modelo PGSTAT20. Essas medidas foram conduzidas em solução de $K_3Fe(CN)_6$ / $K_4Fe(CN)_6$ / KNO_3 .

Os experimentos eletroquímicos foram conduzidos em células de três compartimentos (Figura 21 A) utilizando-se eletrodo de prata/cloreto de prata como eletrodo de referência e eletrodo de platina como contra-eletrodo como mostrado na Figura 21 B.

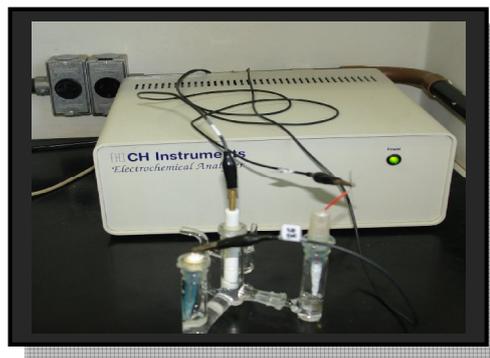


Figura 21: (A) Célula eletroquímica de três compartimentos; (B) Célula eletroquímica montada com os eletrodos de trabalho, referência e contra eletrodo.

2.3.3 - Microscopia de força atômica (AFM)

Para estudos de microscopia de força atômica utilizou-se o microscópio de força atômica (Nanoscope IIIa, Digital Instruments) no modo de força atômica de posse do instituto de química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR).

2.4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.4.1. Limpeza do material utilizado

O eletrodo auxiliar de platina foi flambado para retirada de traços de algum material orgânico que porventura pudesse estar presente em sua superfície bem como microorganismos que poderiam interferir nos resultados obtidos.

O eletrodo de trabalho de grafite foi polido manualmente com lixa d'água. Para seu acabamento foi feito o polimento no feltro da politriz com alumina, de granulometria 3,0 μm , depois colocado em um aparelho de ultrassom, mergulhado em grande quantidade de água desionizada, por cerca de 10 minutos para retirada de resíduos sólidos de alumina e depois foram secos em gás nitrogênio ultrapuro.

2.4.2. Determinação da qualidade dos eletrodos de trabalho

Para o teste da superfície destes eletrodos foram feitos voltamogramas cíclicos em solução padrão contendo o par redox $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol.L^{-1} contendo KNO_3 0,1 mol.L^{-1} , na faixa de potencial de $-0,1$ até $+0,7$ V e velocidade de varredura 50 mV.s^{-1} . A qualidade do eletrodo de trabalho foi analisada pela diferença entre os picos do par redox.

Em seguida o eletrodo foi lavado com água desionizada e transferido para uma solução de ácido perclórico 0,5 mol.L^{-1} , de $-0,2$ até $+0,7$ V, também com a velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} . Esse voltamograma foi utilizado como linha de base para as leituras verificando assim a formação do filme polimérico de ácido poli(3-hidroxifenilacético).

2.4.3. Formação de filme polimérico sobre os eletrodos:

A solução monomérica de ácido 3-hidróxifenilacético, previamente preparada em ácido perclórico $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, foi transferida para a célula eletroquímica e deaerada com gás nitrogênio (N_2) ultra-puro. Os eletrodos de trabalho, referência e contra-eletródo foram levados aos seus respectivos compartimentos.

Mantendo-se o pH da solução monomérica constante ($\text{pH}=0,5$), foram feitas 100 varreduras sucessivas de potencial variando entre $-0,7$ até $+1,2 \text{ V}$ com velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} .

Após as eletropolimerizações, os eletrodos quimicamente modificados foram lavados com água desionizada em abundância e secos com nitrogênio analítico. Estas superfícies eletródicas modificadas foram submetidas a testes eletroquímicos em solução do par redox $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol.L^{-1} , para verificar tanto a formação de filme como o caráter do filme formado. Após o teste na solução do par redox o eletrodo foi lavado e conduzido para uma célula contendo ácido perclórico $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, para verificação da existência de filme na superfície do eletrodo.

Os eletrodos modificados foram armazenados em um dessecador para trabalhos posteriores de imobilização de biomoléculas.

2.4.4 - Imobilização de biomoléculas sobre o poli-3-HFA:

A imobilização de biomoléculas foi realizada através da aplicação de $15 \mu\text{L}$ da solução-mãe de $6,1 \times 10^{-2} \text{ mmol.L}^{-1}$ de uma sonda de poli (A) à superfície do eletrodo modificado, e secas à temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) por 15 min. Em seguida, o eletrodo foi imerso por 6 s em tampão acetato. Em seguida, foram realizadas voltametrias de pulso diferencial, utilizando o mesmo tampão ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH } 4,5$) como eletrólito.

Após a imobilização da sonda, foram aplicados $15 \mu\text{L}$ de poli (T) ($6,1 \times 10^{-1} \text{ mmol L}^{-1}$) sobre a superfície do eletrodo modificado. Os ensaios de hibridação foram realizados a 42°C durante 15 minutos. Em seguida, o eletrodo foi lavado por imersão em tampão acetato durante 6s. Os resultados são apresentados na Figura 33 mostrando o voltamograma de pulso diferencial registrados em tampão acetato como o eletrólito.

Foram realizados ensaios utilizando azul de metileno como indicador de hibridação. Para os eletrodos utilizando este indicador, foram adicionados á superfície do eletrodo, 15 μL de solução aquosa, contendo azul de metileno ($5,0 \times 10^{-1} \mu\text{mol. L}^{-1}$) e NaCl ($2,0 \times 10^{-1} \text{mmol L}^{-1}$). Uma última etapa foi realizada com a lavagem por imersão em tampão acetato durante 6s após 15 minutos de reação com azul de metileno, à temperatura ambiente.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. PRODUÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS DE POLI ÁCIDO 3-HIDROXIFENILACÉTICO.

Foram feitas as voltametrias cíclicas iniciais para verificar as condições do eletrodo de trabalho, em solução aquosa contendo o par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. Somente foram escolhidos eletrodos que estiveram dentro dos parâmetros de seleção para reprodutibilidade dos experimentos. Para que os eletrodos estivessem dentro desse padrão, a diferença de potencial entre os picos de oxidação e de redução não poderia ultrapassar 100 mV.

Foram feitas 100 varreduras de potencial sobre o eletrodo de grafite polido, com velocidade de varredura de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, com potencial redox variando entre -0,7 V e 1,2 V.

A figura 22 mostra as varreduras de potencial de eletrodos de grafite para o monômero de ácido 3-hidroxifenilacético em solução de ácido perclórico (pH=0,5).

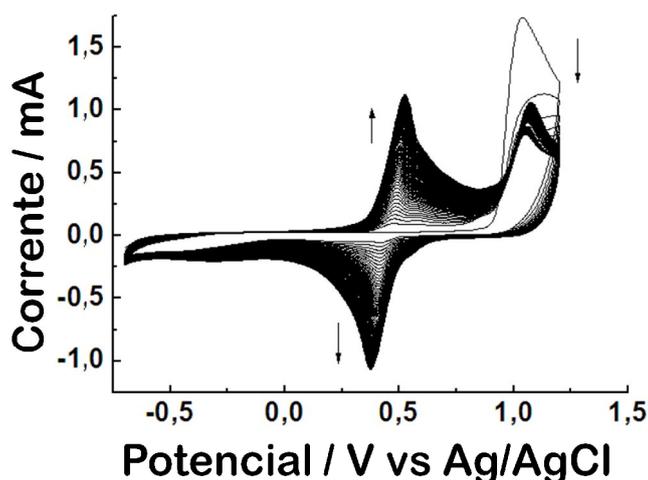


Figura 22: Voltametria cíclica de eletrodo de grafite de uma solução de ácido 3-hidroxifenilacético ($2,5 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em HClO_4 ($0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), por 100 sucessivos ciclos de potencial, com velocidade de varredura de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

No primeiro ciclo, observa-se a formação de um pico de oxidação crescente em 1,10V, referente à oxidação do ácido 3-hidroxifenilacético. No retorno da voltametria cíclica, observa-se a formação de um pico de redução em 0,35 V e outro pico de oxidação em 0,55 V. Com a sequência das varreduras, os valores de corrente do pico de oxidação do monômero diminuem,

indicando consumo do mesmo para a formação de cátions radicais, como resultado da oxidação do grupo hidroxila ligado diretamente ao anel aromático. Esses cátions radicais produzem oligômeros que podem se depositar sobre o eletrodo.

Os valores dos picos de oxi-redução formados posteriormente a esta oxidação aumentam, indicando formação de um material que apresenta atividade eletroquímica. Analisando os voltamogramas, é possível afirmar que ocorre a formação de um material eletroativo, porém não é possível confirmar que o material eletroativo que se forma por meio dessa oxidação está se depositando na superfície do eletrodo. Para confirmar esta deposição e conseqüente modificação do eletrodo de grafite, outros estudos foram feitos para caracterização do eletrodo modificado.

3.2. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS ELETRODOS MODIFICADOS

Após 100 ciclos, os eletrodos foram transferidos para uma célula contendo uma solução do par redox ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) (Figura 23 A) e para uma célula que contém a solução de HClO_4 (figura 23 B).

Na Figura 23 A, foi observado um aumento na resposta de corrente bem como um aumento da área relacionada com os picos de redução e de oxidação, sugerindo formação de um filme polimérico com maior área superficial, provavelmente devido a uma maior rugosidade da camada de poli-3-HFA eletrodepositada, sobre a superfície do eletrodo de grafite. Este aumento de área ocasiona um conseqüente aumento da transferência eletrônica do par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$.

O pico de oxidação em torno de 0,3V pode ser atribuído a transferências eletrônicas do par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. O pico de oxidação em torno de 0,5 V pode ser atribuído à transferência de elétrons envolvendo a malha polimérica de poli-3HFA, presente na superfície do eletrodo.

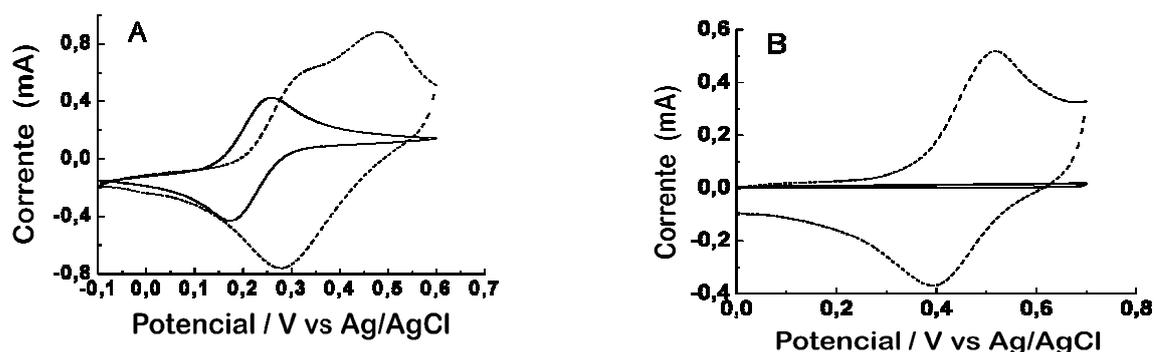


Figura 23: Voltamogramas cíclicos de eletrodos de grafite após 100 ciclos em solução de HClO_4 ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$), contendo ácido 3-hidroxifenilacético. (A) solução de $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$ ($5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$), contendo KCl ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$). (B): solução de HClO_4 ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$). (—) Eletrodo de grafite sem modificação; eletrodo de grafite após 100 ciclos de potencial (---), 50 mV.s^{-1} .

Observou-se também que a área desses dois picos é maior, quando comparada a resposta do eletrodo de grafite sem modificação, indicando uma maior carga elétrica envolvida nos processos redox que ocorreram no eletrodo modificado. O aumento dessa área aponta para a

formação de um eletrodo modificado por um caráter condutor do filme polimérico derivado de ácido 3-hidroxifenilacético depositado na superfície do eletrodo.

Já o pico de redução, que ocorre por volta de 0,3 V, provavelmente deve relacionar-se com a redução do par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ sobreposto com o pico de redução do filme polimérico, pois é a região onde ocorre a redução dos dois sistemas eletroquímicos.

A figura 23 B mostra que o eletrodo de grafite não apresenta ondas de oxi-redução, mas após o tratamento eletroquímico, o eletrodo modificado apresenta ondas redox bem definidas em 0,35 V (redução), e 0,55V (oxidação), concordando com os valores de pico redox do voltamograma que representa a formação do filme (figura 22). Isto reforça a hipótese de deposição de um material polimérico condutor na superfície desse eletrodo, modificando sua superfície.

3.3. ESTUDO DA ESTABILIDADE DO FILME POLIMÉRICO

Para se conhecer a estabilidade eletroquímica do poli(3-HFA) foi realizado um experimento em solução de HClO_4 $0,5\text{mol.L}^{-1}$ por 100 varreduras de potencial sucessivas de 0,0 a 0,9 V (Figura 24).

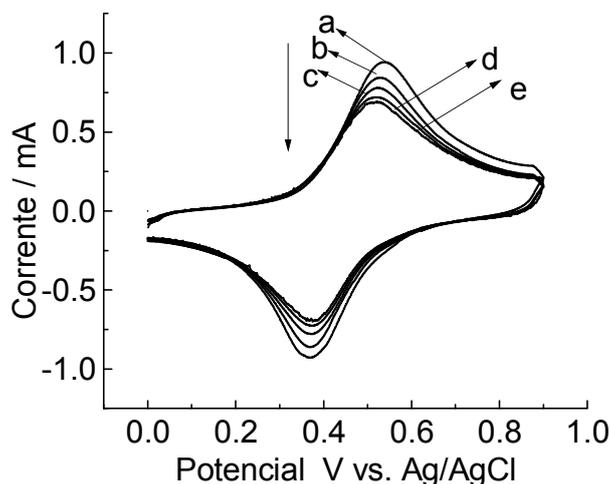


Figura 24: Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com poli(3-HFA). Estudo realizado em solução HClO_4 $0,5\text{ mol.L}^{-1}$ a uma velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} . (a) 1º ciclo, (b) 25º ciclo, (c) 50º ciclo, (d) 75º ciclo e (e) 100º ciclo.

A Figura 24 mostra uma diminuição dos valores de corrente de pico e de carga elétrica, em função do aumento do número de varreduras de potencial, mostrando que com o aumento da quantidade de ciclos houve uma pequena queda em relação ao transporte de carga elétrica e esses valores estão representados na Tabela 4.

Percebeu-se que a relação entre as cargas envolvidas na redução e na oxidação de cada ciclo mantém uma proporção próxima à unidade, pois a carga elétrica envolvida na redução é praticamente a mesma envolvida na oxidação, porém o valor de carga de oxidação é levemente maior que a carga correspondente de redução de cada varredura de potencial. Isso porque ao variar o potencial em valores de oxidação ocorre a perda de uma quantidade muito pequena de massa de polímero e quando o potencial é varrido para redução, no mesmo ciclo, a massa depositada na superfície do eletrodo é ligeiramente menor o que permite o transporte de carga também ligeiramente menor.

Tabela 4: Valores de carga elétrica, corrente de pico e variação de potencial em função do número de ciclos.

Ciclo	Carga de oxidação x 10 ⁻⁶	Carga de redução x 10 ⁻⁶	Corrente de pico anódico x 10 ⁻⁴	Corrente de pico catódico x 10 ⁻⁴	Varição de ΔE
1	4,42054	4,37246	9,42351	-9,27625	0,169
25	4,06294	4,0092	8,43335	-8,60690	0,159
50	3,80954	3,74592	7,79163	-7,78241	0,151
75	3,62214	3,55328	7,19343	-7,25578	0,146
100	3,48172	3,40684	6,93100	-6,99300	0,145

Há uma queda na capacidade de transporte de carga elétrica em torno de 22%, essa perda pode ser explicada por dois fatores: houve uma perda de massa do polímero depositado no eletrodo comprometendo o transporte de carga elétrica, ou houve efeito de desdopagem da malha polimérica (saída do contra-íon da cadeia polimérica) diminuindo assim a condutividade extrínseca do material. O decaimento no transporte de carga elétrica após os 100 ciclos de varredura pode ser visualizado na figura 25.

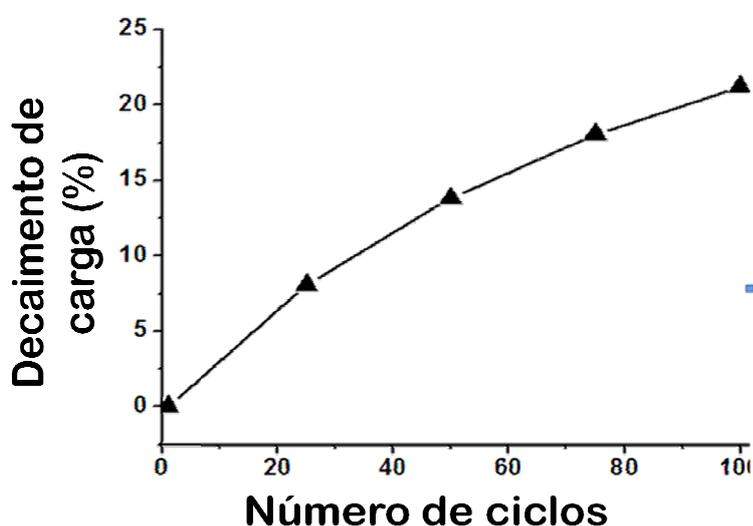


Figura 25: Decaimento de carga percentual em função do número de ciclos.

Observou-se que após 100 ciclos, o polímero ainda apresenta 78% de sua carga, indicando boa estabilidade eletroquímica deste material se comparado com outros da literatura onde há relatos de polímeros de outros monômeros, por exemplo polipirrol, que chegam a perder aproximadamente 80% de sua capacidade de transporte de carga

3.4. ESTUDO DE ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA (EIE)

A caracterização e investigação das propriedades elétricas dos filmes de poli(3-HFA), eletropolimerizados sobre os eletrodos de grafite, foi conduzida por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) em solução de HClO_4 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ em faixa de frequência de 100 kHz a 10 mHz, com amplitude 5 mV.

A Figura 26 apresenta os espectros de impedância eletroquímica, conhecidos como diagramas do plano complexo (Nyquist – Figura 26 A) e de Bode (Figura 26 B), do eletrodo de grafite modificado com filme de poli(3-HFA), obtidos em potencial de 0.45 V. Nesta região de potencial, a corrente é faradáica devido a eletroquímica do filme (Figura 23 B)

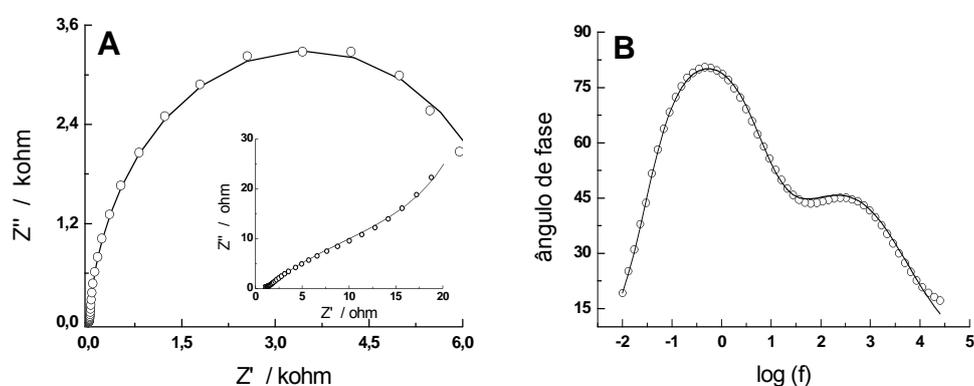


Figura 26: Diagramas de Nyquist (A) e Bode (B) dos resultados experimentais dos espectros de impedância eletroquímica do eletrodo de grafite modificado com filme de poli(3-HFA), obtidos em solução de HClO_4 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$. $E_{\text{aplicado}} = 0,45 \text{ V}$; Amplitude 5 mV; Faixa de Frequência: 10^5 a 10^{-2} Hz . As linhas sólidas representam os resultados de simulação utilizando-se o circuito proposto na Figura 26.

Pode ser observado um discreto semicírculo em região de alta frequência (Figura 26A; ampliação), seguido de outro semicírculo bem definido, na região de baixas frequências, como fica evidente pelas duas constantes de tempo observadas no diagrama de Bode (Figura 26B).

A obtenção de informações a partir dos dados de impedância eletroquímica pode ser conduzida mediante a utilização de diferentes modelos de medida, como circuitos equivalentes

ou modelos matemáticos. A aplicação de circuitos equivalentes tem como fundamento as similaridades entre o comportamento da célula eletroquímica e um circuito elétrico de resistores, capacitores e indutores. Deste modo, um circuito equivalente, para simulação dos resultados experimentais, constituído de combinações em série e paralelo de resistências e capacitâncias foi proposto para análise dos resultados. O melhor circuito equivalente, utilizado para os eletrodos de grafite modificados com poli(3-HFA) pode ser observado na Figura 27.

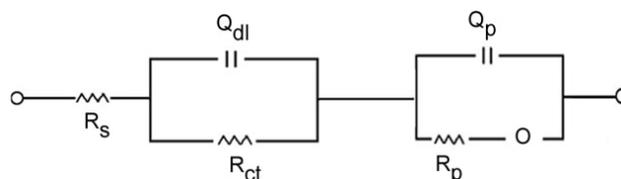


Figura 27: Circuito equivalente proposto na simulação dos dados experimentais apresentados na Figura 26. Sendo, R_s = resistência ôhmica; R_{ct} = resistência a transferência de carga; Q_{dl} = capacitância da dupla camada elétrica; R_p = resistência do polímero; Q_p = capacitância do polímero e O = impedância transmissiva.

O circuito apresentou excelente valor de chi-quadrado (χ^2), um parâmetro estatístico, na ordem de 10^{-3} , apoiando um baixo erro estatístico na simulação dos dados experimentais. A necessidade do uso de dois circuitos sugere a formação de um filme polimérico altamente rugoso/poroso, fazendo com que o primeiro conjunto $[(R_{ct}O)Q_{dl}]$ descreve a região superficial externa do filme enquanto que o segundo $[(R_pO)Q_p]$ descreve a resposta da região superficial mais interna. Os parâmetros representados entre “parênteses” são aplicados aos elementos em paralelo e entre “colchetes” aos parâmetros descritos em série.

Dos parâmetros, obtidos pela simulação, observa-se que a resistência ôhmica total à solução R_s , é de $1,1 \Omega$. Este valor indica a deposição de um material, que apresenta comportamento pouco resistivo, o que está de acordo com o comportamento apresentado nos voltamogramas de formação do poli(3-HFA) (Figura 22). Possíveis explicações para este resultado podem ser: formação de um filme muito condutor, formação de “cristalitos poliméricos localizados” na superfície ou pouco material polimérico formado.

O valor da resistência de transferência de carga, R_{ct} , obtido foi de $26,43 \Omega$. O valor de R_p (966Ω) quando comparado ao valor de R_{ct} , é muito mais elevado, sugerindo que a contribuição ao processo eletródico da região interna é muito menor.

Valores de capacitância fornecem informações a respeito das interações solução/polímero e polímero/grafite. Valores na ordem de 27,8 μF e 0,60 mF foram obtidos para Q_{dl} e Q_p , respectivamente. Estes valores sugerem maior facilidade na transferência eletrônica na interface solução/polímero, quando comparado com a interface polímero/grafite.

Quando os valores de Q_p e Q_{dl} são comparados observa-se maior valor na capacitância do polímero, sugerindo que a área interna eletroquimicamente ativa é muito maior, ou seja, existe um maior número de grupos superficiais oxidáveis/reduzíveis.

3.5 ESTUDO ELETROQUÍMICO DE MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO.

O perfil linear entre a frequência e a carga nos mostra se é possível utilizar a equação de Sauerbrey para medidas de massa:

$$\Delta f = -\frac{2}{A} \frac{\Delta m}{\rho_c} \quad (1)$$

Onde:

Δf = variação de frequência;

f_0 = frequência fundamental do cristal de quartzo;

Δm = variação de massa;

A = área geométrica do eletrodo de ouro piezoeletricamente ativa;

μ_c = modo de cisalhamento do cristal de quartzo;

ρ_c = densidade do cristal de quartzo;

Esse fato se deve à carga estar relacionada à quantidade de material depositado, que pode ser utilizada como uma medida indireta da espessura do filme. Durante o depósito, a variação linear da carga com a diminuição de frequência, indica que essa última pode ser relacionada com a massa depositada e a equação de Sauerbrey é válida para o cálculo de massa, através da alteração de frequência em cada experimento.

A relação entre frequência e carga pode ser vista na equação abaixo:

$$\Delta Q = -F \frac{\Delta f}{MM \cdot C_f} \quad (2) \quad \text{onde} \quad C_f = \frac{-2f_0^2}{A\sqrt{\mu\rho}}$$

Onde F é a constante de Faraday, MM é a massa molar do monômero e C_f é a constante de sensibilidade derivada da equação de Sauerbrey.

Esta relação entre a frequência e a carga, para a eletropolimerização de ácido 3-hidroxifenilacético, está representada na Figura 28.

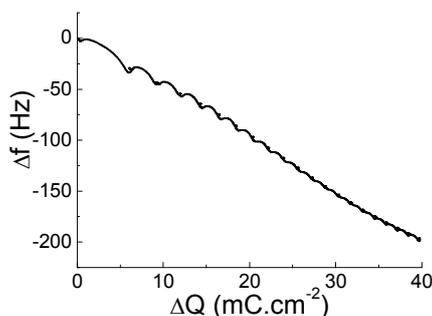


Figura 28: Perfil frequência *versus* carga para a eletropolimerização de 3-hidroxifenilacético $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ em meio de H_2SO_4 $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, 20 varreduras, 50 mV.s^{-1} .

O perfil entre carga e frequência apresenta-se linear com um $R = 0,9988$. Ou seja, um filme com características rígidas está sendo depositado na superfície do eletrodo e a equação de Sauerbrey é válida para o cálculo de massa. Os voltamogramas cíclicos podem ser observados na Figura 29.

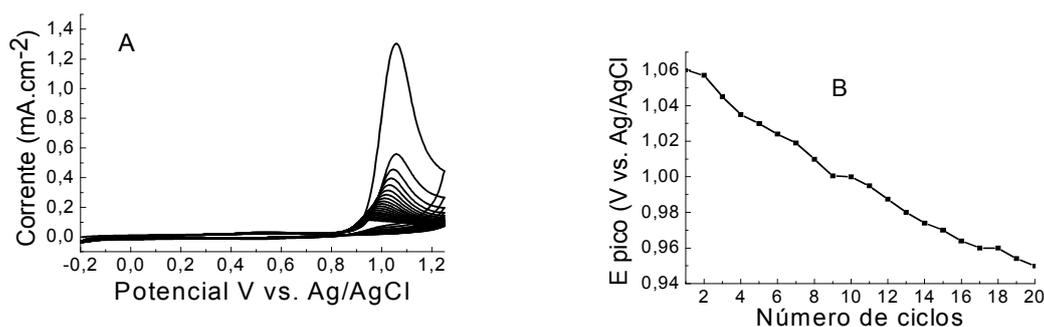


Figura 29: (A) Voltamogramas cíclicos de 3-hidroxifenilacético $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ em meio de H_2SO_4 $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, 20 varreduras, 50 mV.s^{-1} (B) potenciais de pico *versus* o número de ciclos.

Pode-se observar, a partir do gráfico da Figura 29 A, que o processo de eletropolimerização se inicia por volta de $+0,9 \text{ V}$, com o surgimento de uma onda de oxidação, atingindo um potencial de pico a $+1,06 \text{ V}$. Essa onda é apontada como sendo a oxidação do monômero estudado em questão para sua forma cátion-radical. Com um segundo ciclo, há uma queda nos valores de corrente dessa onda. Isso indica a cobertura do eletrodo com um material polimérico, pois os valores de corrente são diretamente proporcionais à quantidade de espécie eletroativa próxima à superfície. Como a superfície está sendo recoberta por um material, sobram menos sítios ativos para uma nova oxidação, diminuindo, assim, os valores de corrente. Esta

diminuição de corrente também indica a diminuição da concentração das espécies eletroativas, próximas a superfície do eletrodo. Um par de ondas redox surge entre os potenciais +0,3 e +0,7 V. Esse par se refere ao processo redox do filme polimérico em crescimento na superfície do eletrodo. Isso é confirmado pelo aumento nos valores de corrente à medida que se aumenta o número de varreduras. Pode-se observar pelo gráfico 29 B que os potenciais de oxidação diminuem com o número de ciclos, de forma praticamente linear ($R = 0,9928$). Essa diminuição no potencial refere-se a uma maior facilidade (embora em menor quantidade) de material sendo oxidado na superfície à medida que o número de ciclos aumenta. Este resultado indica que o filme formado está facilitando a formação de novas camadas de material, provavelmente por meio de interações de Wan der Waals, as quais estão se sobrepondo em sua própria estrutura.

Os primeiros 2 voltamogramas cíclicos, juntamente com o gráfico de massa *versus* potencial são mostrados na figura 30 A. Os valores de massa, ao fim de cada ciclo, podem ser vistos na figura 30 B.

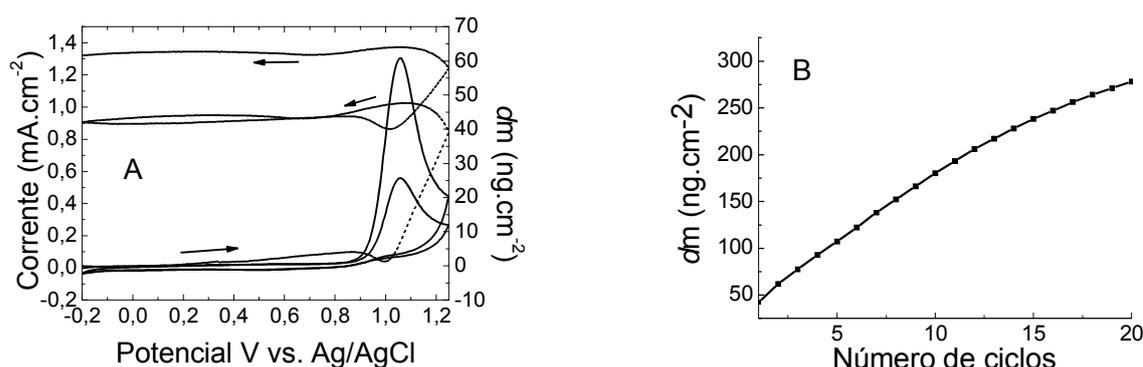


Figura 30: (A) Perfil $j \times E$ (—) e $dm \times E$ (- - -) de 3-hidroxifenilacético $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, em pH 0,5 com 2 varreduras, 50 mV.s^{-1} . (B) Perfil dm *versus* número de ciclos, 20 varreduras.

O gráfico 30 A mostra que, no primeiro ciclo, os valores de massa se mantêm constantes até aproximadamente +0,90V, exatamente onde se inicia o processo de eletropolimerização. A partir desse potencial até +1V há uma pequena queda nos valores de massa. Isso se deve provavelmente a expulsão de solvente ou íons que podem estar na superfície. A partir desse potencial (+1V), começa a se formar os cátion-radicaís, oriundos da oxidação do monômero, e iniciando a formação de oligômeros, que são adsorvidos no eletrodo, como mostrado pelo

aumento dos valores de massa.

Durante o potencial reverso, até +1V, observa-se um ligeiro aumento de massa. Em seguida observa-se uma pequena queda nestes valores, mantendo-se constante até o fim do ciclo. Nos outros ciclos o mesmo processo se repete, com variações na grandeza de massa. Isso pode ser visto na Figura 30 B, onde observa-se um perfil linear no início do experimento, mas com uma quebra da linearidade ao final, indicando uma menor quantidade de material sendo formado devido à cobertura da superfície do eletrodo.

O perfil massa *versus* carga para os dois primeiros voltamogramas cíclicos pode ser visto na Figura 31.

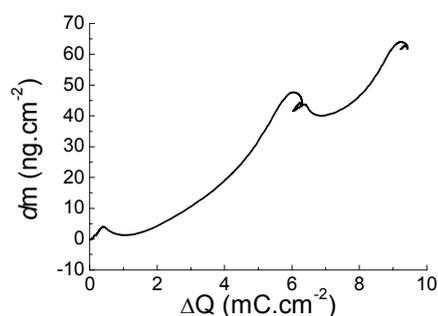


Figura 31: perfil $dm \times \Delta Q$ para os primeiros 2 voltamogramas cíclicos de 3-hidroxifenilacético $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ em meio de $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, 50 mV.s^{-1} .

A figura 31 mostra que o aumento de massa está relacionado diretamente ao aumento de carga desde o princípio do experimento. A partir de um valor de carga de 2 mC.cm^{-2} , ocorre o depósito em maior escala até um valor de 6 mC.cm^{-2} . Desse ponto até aproximadamente 7 mC.cm^{-2} há uma queda nos valores de massa devido redução que a mesma sofre no final de cada ciclo.

3.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ELETRODOS MODIFICADOS

A Figura 32 mostra as micrografias da superfície do eletrodo de grafite e do eletrodo após ter sido modificado com o polímero derivado do ácido 3-hidroxifenilacético analisado através de Microscopia de Força Atômica (AFM).

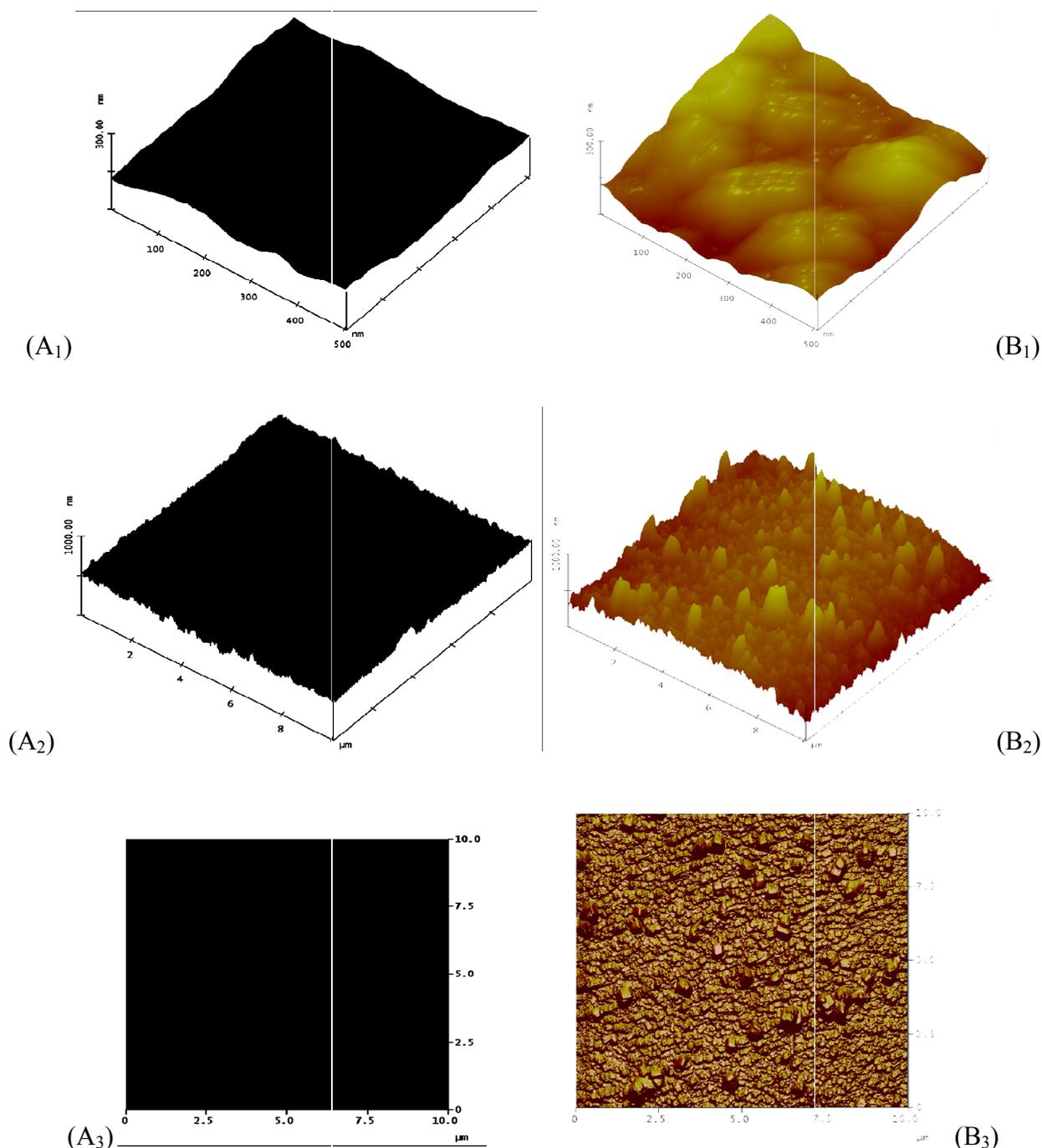


Figura 32: Microscopias de força atômica do eletrodo de grafite (A₁, A₂ e A₃) e do eletrodo modificado com poli(3-HFA) (B₁, B₂ e B₃).

Na Figura 32 A₁, observa-se que a superfície de grafite sem modificação apresenta maior quantidade de cavidades que foram recobertas por um material com aspecto globular e alinhado (figura 32 B₁). Na Figura 32 B₂ (maior ampliação) podem ser observados glóbulos menores agregados, com diâmetro próximo a 100 nm, que conferem à superfície do eletrodo maior rugosidade, quando comparada ao grafite sem modificação. Isto pode ser verificado na comparação com a Figura 32 A₂, onde o grafite não está recoberto com a camada polimérica. Na Figura 32 B₃, observa-se uma vista frontal do grafite antes de receber a camada polimérica de poli-(3-HFA) (rugosidade de 496 nm). Na Figura 32 A₃, observa-se o acúmulo do material polimérico aumentando a rugosidade da superfície, com valor calculado de 822 nm, o que concorda com os resultados obtidos nos estudos da caracterização eletroquímica dos eletrodos modificados (Figura 23), pois se a superfície é mais rugosa uma maior área superficial será oferecida ao contato com as moléculas de monômero na solução para que ocorra a reação, tendo como efeito direto maiores valores de corrente e de carga.

3.7 INVESTIGAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

A Figura 33 apresenta os voltamogramas, referentes aos estudos de imobilização de oligonucleotídeos sobre os eletrodos modificados.

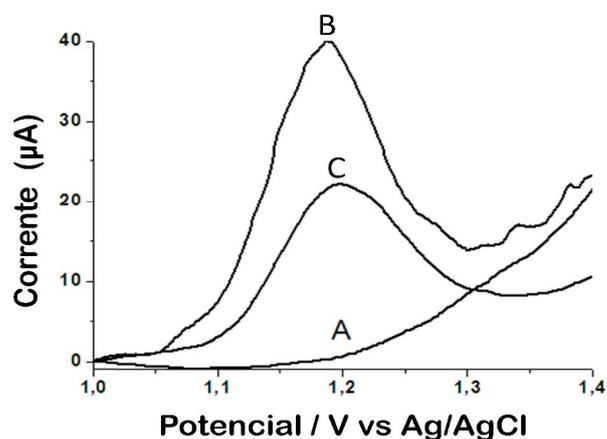


Figura 33: Voltamogramas de pulso diferencial de eletrodos de grafite modificados com: (A) poli-(3-HFA) preparadas em pH 0,5; (B) contendo poli-(A) antes de hibridização e (C) após 15 minutos de incubação com a fita complementar poli (T), tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5, amplitude de pulso e pulso $0,05\text{V}$ período $0,2\text{s}$.

O resultado dessa hibridização pode ser identificado pela diminuição da corrente de pico de oxidação no voltamograma da Figura 33 C e 33 B.

O decréscimo na corrente de pico da adenosina monofosfato, após 15 minutos de incubação em tampão de acetato, de acordo com a literatura [9,12 e 15], está relacionada com a hibridização de oligonucleotídeos. Nessas condições ligações de hidrogênio se formam entre as seqüências complementares, ocorrendo a formação de duplex, dificultando a oxidação das bases, tendo como consequência a diminuição do pico de corrente de oxidação da adenosina, após a hibridização.

Outra razão para o maior valor de corrente de oxidação para poli (A) é que ela apresenta melhor proximidade da superfície do eletrodo e um maior grau de adsorção devido à maior flexibilidade conformacional, facilitando a transferência eletrônica entre as bases e nitrogenadas e o eletrodo.

A Figura 35 mostra voltamogramas de pulso diferencial registrados em tampão acetato como o eletrólito contendo azul de metileno acumulado ao longo de superfícies.

O azul de Metileno utilizado como um indicador interage de forma diferente com a simples fita e com a dupla fita. A reação é evidenciada por uma diminuição da redução do valor de corrente $-157\mu\text{A}$ (simples fita) para $-99\mu\text{A}$ (dupla fita).

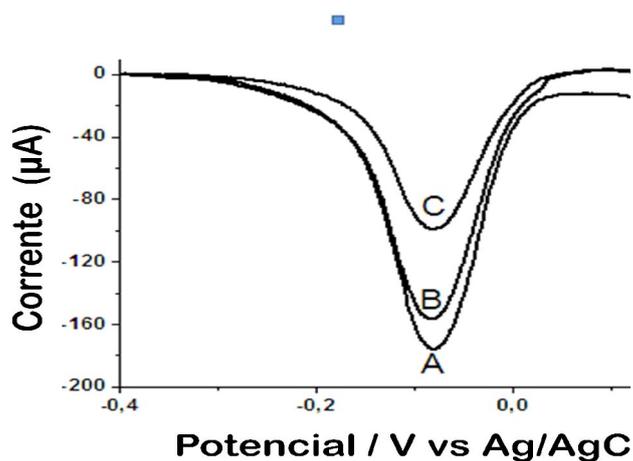


Figura 34: Voltamogramas de pulso diferencial de eletrodo de grafite, contendo azul de metileno: (A) modificado com poli-(3-HFA); (B) modificado com poli-HPA/poli(A) e (C) poli-HPA/poli(A)/poli(T), tampão acetato $0,1\text{mol L}^{-1}$, pH 4,5, amplitude de pulso $0,05\text{V}$, período do pulso $0,2\text{s}$.

CAPÍTULO 4: CONCLUSÃO

Foi possível modificar a superfície de eletrodos de grafite com poli-3HPA através de uma eletropolimerização potenciodinâmica.

O eletrodo modificado foi caracterizado através de técnicas eletroquímicas como EIE e MECQ, e análise morfológica através de AFM.

O eletrodo de grafite modificado com poli-3HPA se mostrou eficiente como matriz para imobilização de oligonucleotídeos.

O eletrodo de grafite foi utilizado para detecção da hibridação de oligonucleotídeos, a qual foi realizada por metodologia direta, com o acompanhamento do pico de oxidação da adenosina, bem como por metodologia indireta, utilizando o azul de metileno como indicador eletroquímico.

Tanto na detecção direta quanto na indireta, a hibridação de poli(A) com poli(T) produziu diminuição da resposta de corrente.

A combinação de eletrodos de grafite com poli(3-HPA) mostrou ser uma estratégia de interessante para imobilização de sondas de DNA, bem como apresenta potencial também para imobilização de outros elementos de reconhecimento biológico.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mano, Eloisa Biasotto; Mendes, Luis Claudio; Introdução a polímeros.- 2. Ed. Ver. E ampl.- São Paulo : Edgard Blucher, 2004.
2. Vidal, J. C.; Garcia-Ruiz, E.; Castillo, J. R.; *Microchim. Acta* 2003, 143, 93.
3. Palmisano, F.; Zambonin, P. G.; Centonze, D. F.; *J. Anal. Chem.* 2000, 366, 586.
4. Cosnier, S.; *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 377, 507.
5. Gerard, M.; Chaubey, A. Malhorta, B. D.; *Biosens. Bioelectron.* 2002, 17, 345.
6. Sharma, S. K.; Sehgal, N.; Kumar, A.; *Curr. App. Phys.*, 2003, 3, 307.
7. Lei, Y.; Chen, W.; Mulchandani, A.; *Anal. Chim. Acta.*, 2006, 568, 200.
8. Lowry J. P.; McAteer, K.; El Atrash, S. S.; Duuff, A.; O'Neill, R. D.; *Anal. Chem.* 1994, 66, 1754.
9. Palmisano, F.; Guerrieri, A.; Quinto, M.; Zambonin, P. G.; *Anal. Chem.* 1995, 61, 1005.
10. Rodriguez-Nieto, F. J.; Tucceri, R. I.; *J. Electroanal. Chem.* 1996, 416, 1.
11. Yuqing, M.; Jianrong, C.; Xiaohua, W.; *Trends in Biotechnology* 2004, 22, 227.
12. Disponível em <http://www.reeis.usda.gov/web/crisprojectpages/207185.html> acessado em novembro de 2008.
13. Yang, H.; Bard, A. J.; *J. Electroanal. Chem.* 1992, 339, 423.
14. Gattrell, M.; Kirk, D. W.; *J. Electrochem. Soc.* 1992, 139, 2736.
15. Galli, A.; Souza, D.; Garbellini, G. S.; Coutinho, C.F.B.; Mazo, L.H.; Avaca, L. A.; Machado, S.A.S. *Quím. Nova*, v.29, n.1, p. 105-112,2006
16. Santhanam, K.S.V. *Pure appl. Chem.*, v.70, n.6, p. 1259-1262,1998
17. Pereira, A. C.; Santos, A. S.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova*, 2002, 25, 1012.
18. Finot, M. O.; McDermott, M. T.; *Electroanal. Chem.* 2000, 488, 125.
19. Nelson, A.; *Langmuir* 1996, 12, 2058.
20. Galli, A.; Souza, D.; Garbellini, G. S.; Coutinho, C. F. B.; Mazo, L. H.; Avaca, L.A.; Machado, S. A. S.; *Quim. Nova*, 2006, 29, 105.
21. Sotiropoulou, S.; Gavalas, V.; Vamvakaki, V.; Chaniotakis, N. A.; *Biosens. and Bioelectron.* 2003, 18, 211.
22. Kubota L.T.; Pereira A.C.; Santos A.S.; *Quím. Nova*, vol. 25, n.6, 1012-1021,2002.
23. Macha, S. S.; Fitch, A.; *Mikrochim. Acta* 1998, 128,1.
24. Mattos, I. L.; Gorton,L.; *Quim. Nova* 2001, 24,200.
25. La-Scalea, M. A.; Serrano, S. H. P.; Gutz, I. G. R.; *Quim. Nova* 1999, 22, 417.
26. Wilkins, E.; Atanasov, P.; *Med Eng. Phys.* 1996, 18,273.

-
27. Zanardi, C.; Scanu, R.; Pigani, L.; Pilo, M. I.; Sanna, G.; Seeber, R.; Spano, N.; Terzi, F.; Zucca, A.; *Synth. Met.*, 2006, 156, 984.
 28. Vieira, S. N.; Ferreira, L. F.; Franco, D. L.; Afonso, A. S.; Gonçalves, R. A.; Madurro, A. G. B.; Madurro, J. M.; *Macromol. Symp.*, 2006, 245, 236.
 29. Pang, Y.; Li, X.; Ding, H.; Shi, G.; Jin, L.; *Electrochim. Acta*, 2007, 52, 6172.
 30. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J., Saunders College Publishing. Orlando, Flórida, EUA, 1966.
 31. Harris, D. C.. 5^a. Ed., Rio de Janeiro: LTC, 2001.
 32. Cecil, T. C.; Osher, S. J.; Qian, J. L.; *J. Comp. Phys.*, v. 213, n.2, p. 458-473, 2006.
 33. Tran, L. D. et al. *Synth. Met.*, v.139, p. 251-262, 2003.
 34. Bard, A. J.; Faulkner L. R. in ,2nd. Ed. John Wiley & Sons, Inc. USA, 2000.
 35. Heeger, A. J.; *Synth. Met.*, v.125, p. 23-42, 2002.
 36. Cantane, D. A.; Frollini, E.;, Universidade de São Paulo – Instituto de química de São Carlos – Programa de Educação Tutorial, São Carlos, 2004.
 37. Francisco, R. H. P.;. Revista Eletrônica de Ciências do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, n.4, Fev. 2002.
 38. <http://www.chemkeys.com>, acessado em agosto de 2008.
 39. Varela, H.; Malta, M.; Torresi, R. M.;. Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, 2000.
 40. Grahame, D. C.; *Chem. Ver.* (1947), 41, 441.
 41. Lawrence, J.; parsons, R.; Payne, R.; *J. Electroanal. Chem*, 1968, 16, 193.
 42. Gonzales, E.R.; Motheo, A. J.; *Eletrochim. Acta*, 1989, 34, 641.
 43. Parsons, R.; *Proc. Soc.*, 1961, A261,79.
 44. Fawcet, W. R.; Champagne, G. Y.; Motheo, A. J.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1990,86,4037.
 45. Motheo, A. J.; Machado S. A.; Van Kampen, M. H.; Santos, Jr. J. R.; *J Bras. Chem. Soc.*, 1993,4.
 46. Armstrong, R.D.; Dickinson, T.; Willis, P. M.; *J. Electroanal Chem.*, 1974, 53, 389.
 47. Brug, G. J.; Van den Eeden, A. L. G.; Sluyters-Rech-back, M.; Sluyters, J. H.; *J. Electroanal.Chem.*, 1984,176,275.
 48. Clavilier, J.; *C. R. Acad. Sc. Paris*, 1966, 263, 191.
 49. Hamelin, A.; Vitanov, T.; Sevastyanov, E.; Popov, A.; *J. Electroanal. Chem.*, 1983,
-

- 145,225.
50. Strbac, S.; Adzic, R. R.; Hamelin, A.; *J. Eletroanal. Chem.* 1988,249,291.
51. Riccardi, C. S.; Costa, P. I.; Yamanaka, H.; *Quim. Nova*, 2002, 25, 316.4
52. D’Orazio P.; *Clinica Chimica Acta*; 2003, 334, 41.
53. Mozaz, S. R; Marco, M. P.; Alda, M. J. L.; Barceló, D.; *Pure Appl. Chem.*, 2004, 76, 723.
54. Pancrazio, J.J.; Whelan, J.P.; Borkholder, D.A.; Ma, W.; Stenger, D.A.; *Ann. Biomed. Eng.*, 1999, 27, 697.
55. Gil, E. S.; Kubota, L. T.; Yamamoto, Y. I.; *Quim. Nova*, 1999, 22, 874.
56. Álvarez-Romero, G. A. A.; Garfias-García, E.; Ramírez-Silva, M. T.; Galán-Vidal, C.; Romero-Romo, M.; Palomar-Pardavé, M.; *Appl. Surf. Sci.*, 2006, 252, 5783.
57. Madurro, A. G. B.; Ferreira, L. F.; Vieira, S. N.; Ariza, R. G.; Goulart Filho, L. R.; Madurro, J. M.; *J. Mater. Sci.*, 2007, 42, 3238.
58. Brito-Madurro, A.G.; Ferreira, L.F.; Vieira, S.N.; Ariza, R.G.; Filho, L.R.G.; Madurro, J.M.; *J. Mater. Sci*, 2007, DOI 10.1007/s10853-006-0235-0. 2007.01.15
59. Calvoa, E.J.; Danilowicz, C.; *J. Braz. Chem. Soc.*, 1997, 8, 563.
60. Lupa, P.B.; Sokoll, L.J.; Chan, D.W.; *Clin. Chim. Acta*, 2001, 1-26.
61. Ferreira, A. A. P.; Colli, W.; Costa, P. I.; Yamanaka, H.; *Biosens. Bioelectron.* 2005, 21, 175.
62. Sotomayor, M. D. P. T.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova*, 2002, 25, 123.
63. D’Souza, S. F.; *Biosens. Bioelectron.*, 2001,16,337.
64. Whitaker, J. R.; *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, Marcel Dekker; New York, 1972.
65. Dixon, M.; Webb, E. C.; *Enzymes*, Academic Press; New York, 1979.
66. Marrazza, G.; Tombelli, S.; Mascini, M.; Manzoni, A.; *Clin. Chim. Acta*, 2001,307, 241.
67. Lehninger, A. L.; *Princípios de Bioquímica*, Sarvier; São Paulo, 1986, pp. 154.
68. Gava, A. J.; *Princípios de Tecnologia de Alimentos*; Nobel; São Paulo, 1988, pp. 95.
69. Bobbio, F. O.; Bobbio, P. A.; *Introdução à Química de Alimentos*, Varela; São Paulo, 1989, pp. 109.
70. Fatibello-Filho, O.; Vieira, I. C.; *Quim. Nova*, 2002, 25, 455.
71. Cosnier, S.; *Biosens. Bioelectron.*, 1999, 14, 443.
72. Setford, S. J.; *Trends Anal. Chem.*, 2000, 19, 330.

-
73. Tarley, C. R. T.; Sotomayor, M. D. P. T.; Kubota, L. T.; *Quím. Nova*; 2005, 28, 1087.
 74. Bartlett, P. N.; Birkin, P. R.; Ziegler, Ch.; Gopel, W.; Zerbi, G.; *Synth. Met.*, 1993, 61, 15.
 75. Scouten, W. H.; Luong, J. H. T.; Brow, R. S.; *Tibtech* 1995, 13, 178.
 76. Wilson, G. S. Em *Biosensors: Fundamentals and applications*; Turner A.P.F.,
 77. Karube, I.; Wilson, G. S., eds.; Oxford: Oxford University Press, 1987, p. 65.
 78. Belini, A.; Fatibello, O. F.; Clemente, E.; *Braz. J. Food Technol.*, 2001, 4, 75.
 79. Okawa, Y.; Nagano, M.; Hirota, S.; Kobayashi, H.; Ohno, T.; Watanabe, M; *Biosens. Bioelectron.*, 1999, 14, 229.
 80. Gorton, L.; Lindgren, A.; Larsson, T.; Munteanu, F.D.; Ruzgas, T.; Gazaryan, I.; *Anal. Chim. Acta*, 1999, 400, 91.
 81. Lu, X. B. ; Zhang, Q.; Zhang, L.; Li, J. H.; *Electrochem. Commun.*, 2006, 5, 874.
 82. Tian, Y.; Mao, L.; Okajima, T.; Ohsaka, T.; *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 21, 557.
 83. Qi, H; Zhang, C; Li, X.; *Sens. Actuat. B-Chem.*, 2006, 114,. 364.
 84. Alcântara, M. M.; Tese de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, 2004.
 85. http://www.ufpa.br/ccen/quimica/site%20trabalhos%20alunos_arquivos/Apresentacao%20infravermelho.pdf]
 86. Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.; *Fundamentals of Analytical Chemistry*; Saunder College Publishing; Orlando, Flórida, EUA, 1996.
 87. Brecht, A.; Gauglitz, G.; *Biosens. Bioelectron.* 1995, 10 , 923.
 88. Mazzara, G.; Chianella, L.; Mascini, M.; *Biosens. Bioelectron.*, 1994, 14, 43.
 89. Tran L.D.; Piro B.; Pham M.C.; Ledoan T.; Angiari C.; Dao L.H.; Teston F.;*Synthetic Met.*, 2003, 139, 251.
 90. Murphy, L.; *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, 10, 177.
 91. Flavio Santos Damos, Renata Kelly Mendes e Lauro Tatsuo Kubota -, *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 6, 970-979, 2004).

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](#)