# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS GRUPO DE POLÍMEROS BERNHARD GROSS

Eletrossíntese e caracterização de filmes de polipirrol-2-ácido carboxílico para uso em biossensores amperométricos construídos em eletrodos miniaturizados

## Mauricio Foschini

Eletrossíntese e caracterização de filmes de polipirrol-2-ácido carboxílico para uso em biossensores amperométricos construídos em eletrodos miniaturizados

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada Orientador: Profa. Dra. Débora Gonçalves.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

#### Foschini, Mauricio

Eletrossíntese e caracterização de filmes de polipirrol-2-ácido carboxílico para uso em biossensores amperométricos construídos em eletrodos miniaturizados./Mauricio Foschini; orientadora Debora Gonçalves - edição revisada - São Carlos, 2009.

134 p.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Física - Área de concentração: Física Aplicada ) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Polipirrol-2-ácido carboxilico. 2. Mecanismo de eletropolimerização. 3. Tirosinase. .4. Imobilização enzimática. 5. Biossensor amperometrico I. Título.





Caixa Postal 369 13560-970 São Carlos, SP Av. Trabalhador São-carlense, 400 13566-590 - São Carlos, SP

> Fone/Fax: (16) 3373, 9777 www.ifsc.usp.br svposgrad@ifsc.usp.br

# FOLHA DE APROVAÇÃO

Mauricio Foschini

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Física Aplicada.

Aprovado em: 05/06/2009

Comissão Julgadora

Profa. Dra. Debora Gonçalves

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Profa. Dra. Yara Galvão Gobato

Instituição: UFSCar

Assinatura

Prof. Dr. Rodrigo Fernando Bianchi

Instituição: UFOP

Assinatura

Prof. Dr. Gerson Luiz Mantovani

Instituição: UFABC

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Mulato

Instituição: FFCLRP/USP

Assinatura

Dedico esta tese aos meus pais

Leonardo e Marly pelo apoio e compreensão
e principalmente à minha esposa Milene que
em todos os momentos foi ótima companheira
dando apoio, incentivo e forças para
conclusão deste trabalho.

### **AGRADECIMENTOS**

Para a realização deste trabalho foi de fundamental importância o apoio da CNPq, CAPES e de algumas pessoas. Agradeço:

- ✓ A Profa. Débora Gonçalves pela orientação e confiança que depositou no meu trabalho. No início desse projeto, o tema proposto pela Profa. Débora era um novo tema implantado ao grupo de polímeros Bernhard Gross. Hoje, 4 anos depois, vejo a difusão deste objetivo em novos projetos, se tornando o foco de outros professores e alunos do grupo de polímeros. Gostaria também de expressar meus agradecimentos a minha *co-orientadora* no projeto de doutorado sanduíche Dra. Nicole Jaffrezic-Renault que assim como a Profa. Débora teve um papel importantíssimo no desenvolvimento de etapas desse trabalho.
- ✓ Ao Prof. Ronaldo C. Faria pelas valiosas discussões científicas que muito contribuíram para a compreensão desse trabalho e para à minha formação profissional.
- ✓ Ao Prof. Orlando Fatibello Filho pela colaboração no inicio deste projeto e pelas valiosas discussões científicas.
- ✓ Aos Profs. Didier Leonard e François Bessueille pelas valiosas colaborações dadas a esse trabalho em discussões durante meu período no Laboratoire Sciences Analytiques UMR CNRS, Lion, França.
- ✓ Aos Profs. Paulo Barbeitas Miranda e Valtencir Zucolotto pelas discussões informais, porém valiosas para a realização desse trabalho.
- ✓ A Dra. Debora T. Balogh pela ajuda no laboratório e pelas discussões científicas que muito somaram à minha formação profissional.
- ✓ Aos amigos Bertho, Níbio, Ademir e Rosângela pelo apoio técnico e pelo ótimo convívio no grupo de polímeros.
- ✓ Aos professores do Grupo de Polímeros: Guilherme, Osvaldo (Chú), Roberto e Mariângela pelo ótimo convívio e principalmente pelo exemplo de garra, determinação e paixão pelo grupo de polímeros.
- ✓ Aos amigos do Grupo de Polímeros: Rodrigo (Pagliai), Adriana Pavinato, Felippe, Vananeia, Marcela, Washington, André e Andrey pelo excelente ambiente de trabalho. Em especial, meus agradecimentos à Juliana, Elaine, Marcelo, Edivaldo, Adriana (V8) e Heurison pelas inúmeras discussões que fortaleceram a minha formação profissional.
- ✓ Aos amigos que fiz nesta jornada: Cristina Nordi, Cristina Camilo, Luciano, David, Vicente, Marletta, Lucas, Rodrigo Bianchi, Silmar e Irina.
- ✓ Aos amigos Nelson, Romeu e Paula pela intensa amizade.
- ✓ Aos meus pais, Leonardo e Marly pelo exemplo de perseverança, amor e companheirismo, essenciais para minha formação pessoal e profissional.

✓ Principalmente a minha esposa e companheira Milene, que nos momentos de dificuldade permaneceu forte ao meu lado e felizes e inesquecíveis compartilhando as felicidades e as conquistas desejando sempre que crescêssemos juntos tanto na vida profissional quanto na pessoal.

### **RESUMO**

Neste trabalho, apresentamos a eletrossíntese de um novo polímero condutor derivado do polipirrol (PPI) funcionalizado com um grupo carboxílico, o polipirrol-2ácido carboxílico (PPI-2-COOH), e o seu uso como transdutor amperométrico em biossensores pelo uso da polifenol oxidase (PFO). São apresentadas todas as etapas de síntese e de caracterização dos filmes poliméricos em microeletrodos e o preparo e a resposta dos biossensores montados para a detecção de um composto fenólico. Nossos estudos sobre eletrossíntese, respostas eletroquímicas dos filmes, juntamente com resultados de microgravimetria e modelagem molecular de dímeros e trímeros derivados de PI-2-COOH, permitiram com que pudéssemos sugerir pela primeira vez um mecanismo de eletropolimerização deste monômero em meio não aquoso. Na caracterização dos filmes por espectroscopia in situ no UV-visível e infravermelho próximo foram observadas duas bandas idênticas às transições  $\pi \rightarrow \pi^*$ características dos filmes de PPI no seu estado neutro e de maior dopagem, confirmando a possibilidade de haver duas conformações na cadeia do PPI-2-COOH. Com a modelagem molecular de um oligômero formado a partir da oxidação do PI-2-COOH, verificamos que para cada 4 anéis heterocíclicos acoplados entre si na posição 4-5, um par de anéis se encontrava em um plano diferente do segundo par de anéis, mantendo este padrão em toda a extensão da cadeia polimérica. A resposta redox dos filmes nos permitiu observar a preferência do polímero pela entrada de cátions em sua estrutura. Nos espectros de FTIR também comprovamos a presença do grupo carboxílico na estrutura do polímero, o que permitiu uma imobilização enzimática por ligação covalente. A confecção de microeletrodos destinados para a análise por injeção em fluxo (FIA) nos possibilitou uma economia de reagentes, praticidade e boa reprodutibilidade das medidas. Os biossensores amperométricos obtidos pela imobilização covalente da PFO sobre filmes de PPI-2-COOH apresentaram um pH ótimo de funcionamento em 9,4 e um potencial ótimo de trabalho em +70 mV *vs* Ag/QRE. Finalizamos nosso trabalho obtendo as respostas amperométricas dos biossensores para a detecção de um composto fenólico, pirocatecol, com uma linearidade entre as concentrações de 5x10<sup>-4</sup> até 2,5x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup>.

Palavras-chave: 1. Polipirrol-2-ácido carboxílico. 2. Mecanismo de eletropolimerização. 3. Tirosinase. 4. Imobilização enzimática. 5. Biossensor amperométrico.

### **ABSTRACT**

In this work, we present the electrochemical synthesis of a new conducting polymer derived of polypyrrole (PPI) functionalized by carboxylic group, the polypyrrole-2carboxylic acid, and its application as amperometric transducer in biosensor by use of polyphenol oxidase (PFO). All the steps of syntheses and characterization of the polymer film in microelectrodes and response of the biosensor build for detection of phenolic compost. Our study about electrosyntheses, electrochemical response of the films (PPI-2-COOH) together with microgravimetry result and the molecular modeling of dimer and trimer derived from PI-2-COOH allowed one to suggest, for the first time, the mechanism of electropolymerization of this monomer in nonaqueous medium. When the technique of in-situ ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS in-situ) was observed two bands, identical to the transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  which are characteristics of the PPI films on their neutral state and of bigger doping, confirming the possibility that there may be two conformations in the PPI-2-COOH chain. With the molecular modeling of an oligomer formed by PI-2-COOH oxidation, we verified that for each four heterocyclic ring coupled together in the position 4-5, there's a pair of rings, maintaining this pattern in all the extension of the polymeric chain. The redox response through the electrochemical measurement we could observe in FTIR the polymer preference for the cations adsorption. On the FTIR measurements, we could also observe the presence of the carboxylic group in the polymers structure, which is needed for the enzymatic immobilization by covalent binding. The fabrication of the microelectrode destined to flow injection analysis (FIA), made possible not only to save a lot of reagents, but also demonstrated praticity in the experimental set up and good reproducibility of results. Hence, the obtaining of amperometric biosensor by covalent binding of PFO on the PPI-2-COOH film, presented good pH in 9.4 and

great work potential in +70 mV vs Ag/AgCl. We finish the work with the amperometric response of the biosensor in the detection of pyrocatechol, forming a straight line between the concentrations of  $5x10^{-4}$  to  $2.5x10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>.

keywords: 1. Polypyrrole-2-carboxylic acid. 2. Mechanism of electropolymerization. 3. Tyrosinase. 4 Enzymatic immobilization. 5. Amperometric biosensor.

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Busca feita no endereço eletrônico www.sciencedirect.com com a palavra chave de busca "biosensor"
Figura 2.	TSM - ressonância de cisalhamento de espessura (usado na QCM), FPW - ressonância de onda acústica laminar, SAW - ressonância de onda acústica de superfície, SH-APM - ressonância de cisalhamento no plano horizontal <sup>23</sup>
Figura 3.	Diagrama esquemático do corte AT do cristal de quartzo, com uma fatia de cristal cortado em 35º 15' em relação ao eixo óptico
Figura 4.	Diagrama esquemático da lâmina de cristal de quartzo e simulação do aumento infinitesimal na espessura do quartzo em uma superfície <sup>26</sup>
Figura 5.	Diagrama esquemático da interface quartzo-líquido com a amplitude de oscilação do cristal de quartzo e decaimento da amplitude em função da distancia do quartzo
Figura 6.	Curva de números de artigos publicados por ano entre os períodos de 1970 até novembro de 2008. Os valores obtidos foram através da busca no endereço eletrônico "www.sciencedirect.com" com termo de busca "electrochemical"
Figura 7.	Exemplo de potencial aplicado pela técnica de cronoamperometria e um tipo de a resposta de corrente obtido
Figura 8.	Exemplo de potencial aplicado pela técnica de voltametria cíclica e um tipo de a resposta de corrente obtido
Figura 9.	Célula eletroquímica com compartimento de 3 eletrodos e entrada de N <sub>2</sub>
Figura 10.	Célula eletroquímica para medidas de Uv-vis <i>in</i> situ com faces de vidro planas e paralelas
Figura 11.	Célula eletroquímica para uso em medidas de EQCM com entrada de dois eletrodos e atmosfera de N <sub>2</sub> e um suporte do cristal de quartzo com esquema de conexão ao potenciostato/galvanostato junto à QCM200
Figura 12.	Célula eletroquímica fabricada para as medidas em FIA com microeletrodos
Figura 13.	Esquema de um espectrofotômetro de FTIR
Figura 14.	Dupla ligação característica do etileno ( $C_2H_4$ ), onde as ligações $\sigma$ são representado por linhas e o orbital atômico pz dos átomos de C sobrepondo em forma de ligação molecular do orbital $\pi_7$

Figura 15.	Poliacetileno: (a) dimerização da cadeia polimérica; (b) estrutura de banda antes e após a dimerização.	.50
Figura 16.	Processo de absorção e emissão entre os estados eletrônicos de uma molécula orgânica S <sub>0</sub> e S <sub>1</sub> com esquema básico do principio de Franck-Condon com transições verticais <sup>43</sup>	.52
Figura 17.	Representação esquemática da estrutura do PPI neutro e com formação de polaron e de bipolaron após dopagem do <i>tipo-p</i>	.53
Figura 18.	Evolução da estrutura de banda de energia pó PPI com a variação de dopagem: (a) formação de polaron com baixo nível de dopagem; (b) formação de bipolaron com médio nível de dopagem; (c) formação de bandas de bipolaron com alto nível de dopagem <sup>46</sup>	.54
Figura 19.	Esquema básico da montagem experimental para medidas de UV-VÍS in-situ.	.56
Figura 20.	Dímeros formados de PI-2-COOH nas posições 5,4 e 4,5	.59
Figura 21.	Desenho das máscaras dos eletrodos impressos em papel A4 e em folha de poliimida.	.60
Figura 22.	Evaporação de Au ou Cr/Au sobre a folha de poliimida com máscara de tinta de impressora. (a) ilustração de evaporação de Au, (b) Desenho das máscadas dos eletrodos impressos em papel A4 e folha de poliimida com desenho das mascaras após a evaporação de ouro.	.61
Figura 23.	(a) Remoção da tinta de impressora com água sobre a superfície da poliimida após a evaporação de Au. (b) Trilhas de Au sobre a superfície de poliimida.	.62
Figura 24.	Eletrodo miniaturizado: a) com o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo de Au/Ni e o eletrodo de referência de Ag sobre folhas de poliimida e b) com o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo de Cr/Au e eletrodo de referência de Ag sobre folhas de transparência de retroprojetor.	.62
Figura 25.	Diagrama de uma reação com e sem auxílio de biocatálise com o nível de energia em cada etapa da reação. A catálise promovida pela enzima aparece com a diminuição da energia de ativação sem haver a mudança da energia livre do reagente S e da energia livre do produto P <sup>60,61</sup>	.66
Figura 26.	Diagramas que mostram a atividade enzimática pelo modelo do encaixe induzido junto com a reação descrita por Michaelis e Menten <sup>60,61</sup> .	.66
Figura 27.	Efeito da concentração de analito na velocidade inicial da reação enzimática <sup>60</sup> .	.67

Figura 28.	Linearização da equação de Michaelis-Menten em função de 1/v <sub>0</sub> vs 1/[S] <sup>60</sup>	. 68
Figura 29.	Reação de oxidação do pirocatecol catalisada pela enzima PFO	. 70
Figura 30.	Voltamogramas cíclicos de um eletrodo de Au em meio de PI-2-COOH 0,1mol L <sup>-1</sup> e TMABF <sub>4</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> em ACN com a adição de 1% de água; v = 50 mV s <sup>-1</sup> .	. 72
Figura 31.	Voltamogramas cíclicos de um eletrodo de QCM em meio de PI-2-COOH 0,1mol L <sup>-1</sup> e TMABF <sub>4</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> em ACN sem a adição de água; v = 50 mV s <sup>-1</sup>	. 74
Figura 32.	Cronoamperograma de um eletrodo de Au em meio de PI-2-COOH 0,1mol L <sup>-1</sup> e TBABF <sub>4</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> em ACN sem a adição de água; t = 10 s e E = 1,95 V vs Ag/AgCl.	. 76
Figura 33.	Voltamogramas cíclicos de um eletrodo de FTO em meio de PI-2-COOH 0,1mol L <sup>-1</sup> e TMABF <sub>4</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> em ACN sem a adição de água; v = 50 mV s <sup>-1</sup>	. 78
Figura 34.	Voltamogramas cíclicos de um eletrodo miniaturizado em meio de PI-2-COOH 0,1mol L <sup>-1</sup> e TMABF <sub>4</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> em ACN sem a adição de água; v = 50 mV s <sup>-1</sup>	. 79
Figura 35.	Resposta eletroquímica de um filme de PPI-2-COOH em uma solução de TMABF <sub>4</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> em ACN sem a adição de água obtida simultaneamente com medidas de QCM	. 81
Figura 36.	Variação de ganho de massa vs potencial aplicado para um filme de PPI-2-COOH em TMABF <sub>4</sub> em ACN, v = 50 mV s <sup>-1</sup> . O filme foi preparado em ACN por VC sem a adição de água	. 82
Figura 37.	Variação de massa por variação da carga durante a eletrossíntese de um filme de PPI-2-COOH por VC em uma solução sem a adição de água com eletrólito de suporte de TMABF <sub>4</sub> e PI-2-COOH, com simulação da curva para rotas de eletrossíntese eletroquímica envolvendo 1, 2, 3 e 4 elétrons	. 84
Figura 38.	Variação de massa por variação da carga durante a eletrossíntese do filme de PPI-2-COOH por CA em uma solução sem a adição de água com eletrólito de suporte de TBABF <sub>4</sub> e PI-2-COOH com simulação da curva para rotas de eletrossíntese envolvendo 1, 2, 3 e 4 elétrons.	. 85
Figura 39.	Etapas de oxidação do PI-2-COOH e iniciação da polimerização até a obtenção de dímeros.	. 87
Figura 40.	Formação de radicais cations através da oxidação do monômero e do dímero do PI-2-COOH e propagação de polimerização até obtenção do polímero	. 90

Figura 41.	FTIR dos filmes de PPI-2-COOH eletrossintetizados por: (a) VC na solução de ACN contendo PI-2-COOH, TMABF <sub>4</sub> e sem adição de água. (b) CA na solução de ACN contendo PI-2-COOH, TBABF <sub>4</sub> e sem a adição de água e (c) VC na solução de ACN contendo PI-2-COOH, TMABF <sub>4</sub> e com a adição de água
Figura 42.	Espectro de absorção UV-VIS para o filme de PPI-2-COOH de 1 ciclo, preparado sobre eletrodos de FTO94
Figura 43.	Espectros de absorção no UV-VIS para o filme de PPI-2-COOH de 1, 5 e 8 ciclos, eletrossintetizados sobre eletrodos de FTO95
Figura 44.	Espectros de absorção UV-VIS <i>in-situ</i> de 1100 até 190 nm em potenciais de -0,6 até 1,6 V vs Ag/AgCl para um filme de PPI-2-COOH obtidos após 3 ciclos sobre eletrodos de FTO96
Figura 45.	Evolução das regiões de absorção do espectro de UV-VIS <i>in-situ</i> em função do potencial aplicado sobre o filme de PPI-2-COOH98
Figura 46.	Molécula gerada pelo cálculo de mínima energia pelo método MM2 para oligômero de 16 anéis de PI-2-COOH ligados na posição 4,599
Figura 47.	Medida de absorção em 410 nm referente à formação da quinona promovida pela oxidação da PFO101
Figura 48.	Rotas possíveis para imobilização enzimática com ativação do ácido carboxílico
Figura 49.	Resposta voltamétrica do biossensor miniaturizado em solução tampão fosfato de pH 6,5 sem e com adição de 0,1 mol L <sup>-1</sup> de pirocatecol
Figura 50.	Resposta amperométrica com variação do pH em solução tampão fosfato para um biossensor à base de PFO imobilizada sobre um filme de PPI-2-COOH com injeções de fixas de pirocatecol (10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> ).
Figura 51.	Resposta amperométrica com variação da temperatura sobre o biossensor a base de PFO imobilizada sobre filme de PPI-2-COOH com injeções de fixas de pirocatecol (10 <sup>-2</sup> mol L <sup>-1</sup> ) e pH de 9,2
Figura 52.	Esquema do sistema de FIA usando uma pastilha termoelétrica e um termostato digital109
Figura 53.	Resposta eletroquímica do filme de PPI-2-COOH em uma solução tampão fosfato pH9,2, com e sem adição de pirocatecol (10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> ), de -0,5 até 0,5 V <i>v</i> s Ag/QRE, a 40°C e 50 mV s <sup>-1</sup> : (a) voltamograma cíclico e (b) diferença entre as curvas do voltamograma cíclico com e sem pirocatecol na solução
Figura 54.	Resposta eletroquímica do biossensor PPI-2-COOH/PFO em uma solução tampão fosfato pH 9,2 com e sem adição de pirocatecol

	(10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> ) de -0,5 até 0,5 V <i>vs</i> Ag/QRE a 40 °C e 50 mV s <sup>-1</sup> : (a) voltamograma cíclico e (b) diferença entre as curvas do voltamograma cíclico com e sem pirocatecol na solução
Figura 55.	Resposta do biossensor PPI-2-COOH/PFO pela técnica de CA em potencial de +70 mV <i>vs</i> Ag/QRE, com temperatura de trabalho de 40°C e em solução tampão fosfato de pH 9,4 e com injeções em fluxo de solução tampão contendo concentrações de pirocatecol de 5x10 <sup>-6</sup> até 10 <sup>-1</sup> mol L <sup>-1</sup>
Figura 56.	Média e respectivo desvio padrão das respostas do biossensor a base de tirosinase imobilizada por ligações covalente em filme de PPI-2-COOH pela técnica de CA em potencial de +70 mV vs Ag/QRE, com temperatura de trabalho de 40°C e em solução tampão fosfato de pH 9,4 e com injeções em fluxo de solução tampão contendo concentrações de pirocatecol de 5x10 <sup>-6</sup> até 10 <sup>-1</sup> mol L <sup>-1</sup>
Figura 57.	Resultados de velocidade inicial vs variação da concentração do pirocatecol em uma curva típica da equação de Michaelis-Menten limitada pela velocidade máxima de reação
Figura 58.	Ajuste linear do gráfico obtido pelo inverso as velocidade inicial vs o inverso da concentração de pirocatecol, o qual pode-se determinar facilmente a velocidade máxima e a constante de Michaelis-Menten
Figura 59.	Respostas do biossensor a base de tirosinase imobilizada por ligações covalente em filme de PPI-2-COOH pela técnica de CA em potencial de +70 mV <i>vs</i> Ag/QRE, após 2 horas de repouso, com temperatura de trabalho de 40°C e em solução tampão fosfato de pH 9,4 e com injeções em fluxo de solução tampão contendo concentração de pirocatecol de 10 <sup>-6</sup>

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 –	Energia total para a formação do dímero a partir do PI-2-COOH em diversas posições de acoplamento e diferença entre a menor energia encontrada com as demais energias em ordem crescente88
Tabela 2 -	Energia total para a formação do trímero a partir do dímero e PI-2-COOH em diversas posições de acoplamento e diferença entre a menor energia encontrada com as demais energias em ordem crescente
Tabela 3 -	Valores máximos de fenóis totais baseada na resolução do CONAMA no. 357, de 17 de março de 2005 <sup>83</sup> 118

### LISTA DE ABREVIATURAS

ACN Acetonitrila

Ag/AgCl Eletrodo de referência (prata - cloreto de prata)

Ag/QRE Eletrodo de referência (prata – quase referência)

AT, BT, CT, DT Cortes cristalográficos do cristal de quartzo.

BC Banda de condução

BV Banda de valência

CA Cronoamperometria

CE Contra-eletrodo

 $E_D$  Energia de decaimento

EDC N-(3-Dimetilaminopropil)-N-etil-carbodiimida

 $E_{DIS}$  Energia dissipada

 $E_{GAP}$  Energia de gap

 $E_{IO}$  Energia de ionização

EQCM Eletroquímica em conjunto com a técnica de microbalança de

cristal de quartzo

E<sub>REL</sub> Energia de relação

ET Eletrodo de trabalho

FIA Análise por injeção em fluxo

FPW Ressonância de onda acústica laminar

FTIR Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.

FTO Laminas de vidro com um filme de óxido de estanho dopado

com flúor

HOMO Orbital molecular ocupado de maior energia

LUMO Orbital molecular não ocupado de menor energia

PFO Polifenol oxidase ou tirosinase

PFP Pentafluorofenol

PI-2-COOH Pirrol-2-ácido carboxílico

PPI Polipirrol

PPI-2-COOH Polipirrol-2-ácido carboxílico

QCM Microbalança de cristal de quartzo

RE Eletrodo de referência

SAW Ressonância de onda acústica de superfície

SCE Eletrodo de referência de calomelano

SH-APM Ressonância de cisalhamento no plano horizontal

TBABF<sub>4</sub> Tetra-n-butilamônio de tetrafluoroborato

TMABF<sub>4</sub> Tetrametilamônio de tetrafluoroborato

TSM Ressonância de cisalhamento de espessura

UV-VIS in-situ Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta, visível e

infravermelho próximo in situ

VC Voltametria cíclica

# LISTA DE SÍMBOLOS

$I_q$	Espessura do cristal de quartzo
$f_O$	Freqüência ressonante do cristal de quartzo
$\lambda_q$	Comprimento de onda acústica transversal do cristal de quartzo
$V_q$	Velocidade de propagação da onda acústica do cristal de quartzo
$m_q$	Massa do cristal de quartzo
$\mu_q$	Modulo de cisalhamento do quartzo
$ ho_q$	Densidade do cristal de quartzo.
$dl_q$	Variação de espessura infinitesimal sobre o cristal de quartzo
$dm_q$	Variação de massa infinitesimal do cristal de quartzo
dm <sub>f</sub>	Variação infinitesimal do filme depositado sobre a superfície do cristal.
Α	Área efetiva do cristal de quartzo
$A_0$	Amplitude de oscilação do cristal de quartzo.
δ	Profundidade de penetração de oscilação em um meio.
$\eta_{l}$	Viscosidade do líquido
$ ho_l$	Densidade do líquido
k	Constante do cristal de quartzo ressonante de 56,6 Hz $\mu g^{-1}$
t	Tempo
$\Delta f$	Variação da freqüência do cristal de quartzo.
f	Freqüência do cristal de quartzo
Δm	Variação da massa sobre ocristal de quartzo.
$E_i$	Potencial inicial estabelecido na voltametria cíclica
$E_{MAX}$	Potencial máximo estabelecido na voltametria cíclica
$E_{MIN}$	Potencial minimo estabelecido na voltametria cíclica
$E_F$	Potencial final estabelecido na voltametria cíclica
V	Velocidade de varredura na voltametria cíclica

$V_C$	Volume conhecido
L	Comprimento do capilar
D	Diâmetro do capilar
Μ	Massa molecular total do filme na superfície do eletrodo
S	Massa molecular do solvente
Мр	Massa molecular da unidade da cadeia polimérica
Mw	Massa molecular
F	Constante de Faraday
n	Número de elétrons
ξ	Mol de espécies não definidas
Q	Carga eletroquímica
ΔQ	Variação da carga eletroquímica
D/A	Digital-analógico
A/D	Analógico-digital

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	_ 23
1.1	OBJETIVOS	_ 27
1.2	DESCRIÇÃO DA TESE	_ 27
2	TÉCNICAS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	_ 29
2.1	MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO (QCM)	_ 29
2.1.1	PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS BÁSICOS DA QCM	_ 30
2.2	ELETROQUÍMICA	_ 34
2.2.1	CÉLULAS ELETROQUÍMICAS	_ 38
2.2.1.1	I CÉLULA ELETROQUÍMICA I	_ 38
2.2.1.2	2 CÉLULA ELETROQUÍMICA II	_ 39
2.2.1.3	CÉLULA ELETROQUÍMICA III	_ 40
2.2.1.4	4 CÉLULA ELETROQUÍMICA IV	_ 42
2.3	ELETROQUÍMICA COM MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO (EQCM)	_ 43
2.4	ESPECTROSCOPIA	_ 46
2.4.1	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	_ 47
2.4.2	CONCEITOS E PROPRIEDADES ELÉTRICAS INTRÍNSECAS DO PPI	_ 49
2.4.3	MONTAGEM EXPERIMETAL PARA A MEDIDAS NO UV-VIS IN-SITU	_ 55
2.5	MODELAGEM MOLECULAR	_ 57
2.6	FABRICAÇÃO DOS ELETRODOS MINIATURIZADOS	_ 60
2.7	REAGENTES E SOLUÇÕES	_ 63
2.8	A ENZIMA POLIFENOL OXIDASE (PFO)	_ 64
2.8.1	POLIFENOL OXIDASE (PFO)	_ 69
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	_ 71
3.1	SÍNTESE ELETROQÍMICA DOS FILMES DE PPI-2-COOH	71

ELETROSSÍNTESE DO PPI-2-COOH COM A PRESENÇA DE ÁGUA	_ 71
ELETROSSÍNTESE DE FILMES DE PPI-2-COOH SEM A PRESENÇA DE ÁGUA E EM ELETRODOS DA QCM	_ 73
ELETROSSÍNTESE DO FILME DE PPI-2-COOH SEM A PRESENÇA DE ÁGUA E EM ELETRODOS DE FTO	_ 77
ELETROSSÍNTESE DO FILMES DE PPI-2-COOH SEM A PRESENÇA DE ÁGUA E EM ELETRODOS MINIATURIZADOS	_ 79
RESPOSTAS VOLTAMÉTRICAS DOS FILMES DE PPI-2-COOH	_ 80
INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DA EQCM DURANTE A ELETROSSÍNTESE DOS FILMES PPI-2-COOH	_ 83
MECANISMO DE ELETROPOLIMERIZAÇÃO DO PI-2-COOH	_ 86
CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE PPI-2-COOH POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO	_ 90
CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE PPI-2-COOH POR UV-VIS IN-SITU_	_ 93
MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMATICA DA PFO	100
IMOBILIZAÇÃO DA PFO SOBRE FILMES DE PPI-2-COOH	101
IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL DE TRABALHO DO BIOSSENSOR	103
IDENTIFICAÇÃO DO PH DE TRABALHO DO BIOSSENSOR	104
OBTENÇÃO DA TEMPERATURA DE TRABALHO DO BIOSSENSOR	106
IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL DE TRABALHO DEFINITIVO DO BIOSSENSOR	110
RESPOSTA AMPEROMÉTRICA DO BIOSSENSOR À BASE DE PFO IMOBILIZADA EM FILMES DE PPI-2-COOH	113
CONCLUSÕES	121
RÊNCIAS	125
	ELETROSSÍNTESE DE FILMES DE PPI-2-COOH SEM A PRESENÇA DE ÁGUA E EM ELETRODOS DA QCM  ELETROSSÍNTESE DO FILME DE PPI-2-COOH SEM A PRESENÇA DE ÁGUA E EM ELETRODOS DE FTO  ELETROSSÍNTESE DO FILMES DE PPI-2-COOH SEM A PRESENÇA DE ÁGUA E EM ELETRODOS MINIATURIZADOS  RESPOSTAS VOLTAMÉTRICAS DOS FILMES DE PPI-2-COOH  INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DA EQCM DURANTE A ELETROSSÍNTESE DOS FILMES PPI-2-COOH  MECANISMO DE ELETROPOLIMERIZAÇÃO DO PI-2-COOH  CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE PPI-2-COOH POR ESPECTROSCÓPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO  CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE PPI-2-COOH POR UV-VIS IN-SITU  MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMATICA DA PFO  IMOBILIZAÇÃO DA PFO SOBRE FILMES DE PPI-2-COOH  IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL DE TRABALHO DO BIOSSENSOR  IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL DE TRABALHO DEFINITIVO DO BIOSSENSOR  RESPOSTA AMPEROMÉTRICA DO BIOSSENSOR À BASE DE PFO IMOBILIZADA EM FILMES DE PPI-2-COOH  CONCLUSÕES

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo definição da IUPAC<sup>1</sup>, um sensor químico é um dispositivo que transforma uma informação química em um sinal analítico e é composto basicamente por duas partes, o receptor e o transdutor. Os sensores são classificados de acordo com o principio operacional do transdutor, sendo os mais comuns os transdutores ópticos, elétricos, eletroquímicos, sensíveis às variações de massa e etc. Clark e Lyon (1962)<sup>2</sup> demonstraram que uma enzima podia ser incorporada a um eletrodo, sendo esta enzima o elemento de reconhecimento molecular, chamado de biorreceptor. Assim, o biossensor se diferencia dos outros sensores pela presença de um elemento de reconhecimento molecular à base de um elemento biológico tais como enzima, anticorpo, célula, membrana e etc., ligado ou integrado ao transdutor<sup>3</sup>. Após Clark e Lyons, laboratórios farmacêuticos, clínicos químicos demonstraram grande interesse econômico na utilização de biossensores, devido ao baixo custo, portabilidade e praticidade destes sistemas<sup>4</sup>, gerando assim um grande aumento no número de trabalhos científicos nas duas ultimas décadas na área, como pode ser observado na Figura 1, que mostra a artigos encontrados quantidade de com а busca no endereco www.sciencedirect.com entre o período de 1978 até 2008 com a palavra chave "biosensor". Esta figura mostra claramente o aumento relativamente rápido e linear nos últimos quatro anos relacionados à área de biossensores.

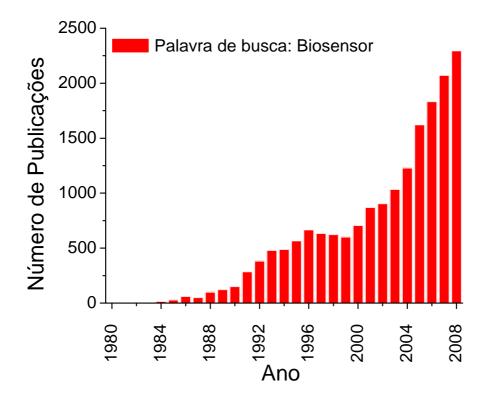


Figura 1. Busca feita no endereço eletrônico www.sciencedirect.com com a palavra chave de busca "biosensor".

Assim como os sensores, os biossensores também são classificados pelo tipo de transdutor utilizado, de tal forma que o transdutor tem como papel converter a resposta de certo analito em sinal (elétrico, óptico, de variação de massa, etc.), e torná-lo detectável por um equipamento de medida<sup>3</sup>. Dentre os transdutores que convertem os sinais analíticos em resposta, têm-se os transdutores eletroquímicos, classificados em voltamétricos, potenciométricos e amperométricos. No presente trabalho, utilizou-se um transdutor amperométrico, que possibilita medidas das variações de correntes elétricas produzidas a partir de reações de oxidação e redução na interface eletrodo/solução. A corrente gerada no eletrodo é uma resposta proporcional à variação de um analito que sofre reações catalisadas pela enzima.

Diferentes enzimas têm sido utilizadas como elementos de reconhecimento em biossensores eletroquímicos e, em alguns casos, imobilizadas em matrizes poliméricas<sup>5</sup>. Para os biossensores utilizados na análise de compostos fenólicos, a tirosinase, também conhecida como polifenol oxidase (PFO), é utilizada como biorreceptor. A catálise em presença de oxigênio molecular leva à hidroxilação de compostos mono-fenólicos a o-quinonas e à oxidação de o-difenóis a o-quinonas, provocando variações nos sinais amperométricos do eletrodo enzimático<sup>6-10</sup>. Da mesma forma a PFO pode ser utilizada como biorreceptor de um dos herbicidas mais usados no mundo, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cujo principal produto de sua degradação é o 2,4-diclorofenol (2,4-DCF) e pode ser detectado em amostras de solo, água, alimentos, etc<sup>11</sup>.

Dentre os polímeros utilizados como transdutores amperométricos, o polipirrol (PPI) é um dos mais usados <sup>12</sup>. A facilidade de preparação de filmes de PPI estáveis sob condições brandas de solventes e de potenciais o torna mais apropriado para o emprego como transdutor em biossensores; além disto, o PPI apresenta uma ótima biocompatibilidade com diversas enzimas, tais como; glicoseoxidase, glicose-desidrogenase, colesterol-oxidase, colesterol-esterase, glutamato-desidrogenase, frutose-desidrogenase, urease e tirosinase<sup>5</sup>.

A estabilidade e a sensibilidade de um biossensor amperométrico dependem de diversos fatores físicos e químicos, tais como: a quantidade de biorreceptor imobilizado, a forma de ancoramento da enzima no transdutor, a exposição do centro ativo enzimático em solução, o transporte de carga elétrica entre o biorreceptor e o eletrodo, o pH e a temperatura de trabalho e o tempo de estocagem<sup>13-16</sup>.

Os métodos mais convencionais para imobilização de um biorreceptor em um transdutor são por via ligação covalente em superfícies ou filmes funcionalizados, adsorção eletrostática em filmes camada a camada (LBL), co-

reticulação pelo uso de glutaraldeído ou de filmes sol-gel e o aprisionamento em matrizes poliméricas ou membranas<sup>3,5,17</sup>. Nos últimos anos, diversos autores buscaram funcionalizar filmes de PPI, usar derivados do PPI e copolímeros com o intuito de imobilizar mais eficientemente o biorreceptor na matriz polimérica por meio de ligação covalente. A copolimerização do pirrol com o N-(3-aminopropil) possibilitou a obtenção de um polímero funcionalizado que favoreceu a imobilização da tirosinase por ligação covalente e a obtenção quantitativa de fenol em uma solução aquosa<sup>18</sup>. Dentre os monômeros substituídos derivados do pirrol, o pirrol-2-ácido carboxílico ainda não gerou grande interesse para estudos sobre eletropolimerização pela presença e posição do ácido carboxílico no anel heterocíclico passar uma falsa idéia de obtenção de um polímero não conjugado. Inicialmente, Curulli et al. afirmaram ser possível se obter um filme de polipirrol-2-ácido carboxílico (PPI-2-COOH) em meio aquoso com aplicação como biossensor<sup>19</sup>. Porém, um ano após, mostraram que não era possível obter um filme sobre o eletrodo após a oxidação do monômero e sim a formação de oligômeros<sup>20-22</sup>.

Em particular, a falta de estudos sobre a eletrossíntese de filmes de PPI-2-COOH, de uma proposta do mecanismo de eletropolimerização e de resultados de caracterização deste polímero até agora, motivou-nos a dedicar atenção ao pirrol-2-ácido carboxílico (PI-2-COOH). Nesta tese, foi possível obter as melhores condições para a eletropolimerização do PI-2-COOH e propor um mecanismo de reação deste monômero em meio não aquoso. O trabalho foi finalizado mostrando a aplicação dos filmes de PPI-2-COOH como transdutores amperométricos obtendo um novo biossensor de compostos fenólicos. O interesse deste novo biossensor terá como objetivo principal, futura detecção à campo da presença do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

### 1.1 OBJETIVOS

Esta tese teve como principal objetivo a construção de biossensor amperométrico a base de tirosinase para detecção de composto fenólico, com intuito de aplicar na detecção de herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Para a construção do biossensor foi necessário eletrossintizar em meio não aquoso e caracterizar um novo polímero derivado do polipirrol (PPI) e funcionalizado com grupo carboxílico. Este polímero foi utilizado como transdutor do biossensor amperométrico na detecção de composto fenólico. Após se obter os filmes desejados, o foco do trabalho se voltou para a determinação do mecanismo de eletropolimerização e as propriedades intrínsecas dos filmes a partir do uso de diversas técnicas de caracterização, tais como microgravimetria, espectroscopia de absorção no UV-VIS in-situ, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier e por modelagem molecular. A próxima etapa do trabalho foi construir biossensores imobilizando a polifenol oxidase para a detecção de compostos fenólicos em microeletrodos confeccionados para aplicação em sistemas de análises por injeção em fluxo (FIA). Finalizando o trabalho, obtivemos as respostas dos biossensores na detecção de pirocatecol.

# 1.2 DESCRIÇÃO DA TESE

No CAPÍTULO 2 são apresentadas as técnicas e a teoria relacionada aos procedimentos experimentais utilizados neste trabalho. Nos ITEMS 2.1, 2.2, 2.3 e 2.4 apresentamos as características e a união entre as técnicas eletroquímicas e a técnica de QCM e a união da técnica eletroquímica com a espectroscopia de

absorção na região do UV até o infravermelho próximo (UV-VIS in-situ). No ITEM 2.5 descrevemos brevemente os métodos de modelagem molecular. No ITEM 2.7 e 2.8 descrevemos com detalhes a fabricação dos eletrodos miniaturizados e os reagentes e soluções usados neste trabalho. No ITEM 2.9 realizamos uma breve descrição sobre as enzimas e as propriedades de catálise da polifenol oxidase (PFO). No CAPÍTULO 3 apresentamos os resultados e a discussão. No ITEM 3.1, 3.2 e 3.3 discutimos os resultados sobre a eletrossíntese e resposta dos filmes de polipirrol-2-ácido carboxílico (PPI-2-COOH) junto a QCM, com e sem adição de água na solução de eletrólito de suporte. No ITEM 3.4 sugerimos um mecanismo de eletropolimerização do filme de PPI-2-COOH em meio não aquoso. No ITEM 3.5 e 3.6 discutimos os resultados de FTIR e das medidas de UV VIS in-situ. No ITEM 3.7 e 3.8 apresentamos as medidas de atividade enzimática da PFO e a imobilização enzimática da PFO sobre os filmes de PPI-2-COOH. Nos ITENS 3.9, 3.10, 3.11 e 3.12 identificamos o potencial e o pH ótimos de trabalho dos biossensores e sugerimos a construção de uma nova célula eletroquímica para se determinar a temperatura ótima de trabalho dos biossensores. No ITEM 3.13 finalizamos o trabalho com as respostas dos biossensores com variação de concentração de analito na solução. Por último, no CAPÍTULO 4, apresentamos as conclusões desta tese e as perspectivas para trabalhos futuros.

## 2 TÉCNICAS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Neste capitulo são apresentados os procedimentos experimentais usados nesta tese, destacando-se a união entre as técnicas eletroquímicas e a técnica de QCM e a união da técnica eletroquímica com a espectroscopia de absorção na região do UV até o infravermelho próximo (UV-VIS *in-situ*) e a introdução sobre as propriedades intrinsecas de filmes de polipirrol (PPI) com intuito de comparação nas interpretações no novo polímero. Outro procedimento experimental destacado neste item é a fabricação de eletrodos miniaturizados para a fabricação do biossensor.

### 2.1 MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO (QCM)

Em 1880, os irmãos Pierre e Jacques Curie constataram que alguns cristais, quando sujeitos a deformações mecânicas (torção, pressão, flexão, etc), produziam uma diferença de potencial entre os pares de faces perpendiculares à da aplicação da força no cristal. A este fenômeno deram o nome de efeito piezelétrico <sup>23,24</sup>. Após o artigo publicado por G. Lippman (1881), que sugeria o efeito inverso da piezeletricidade, os irmãos Curie conseguiram demonstrar o efeito da piezeletricidade inversa, submetendo o cristal a um campo elétrico que gerava uma deformação mecânica <sup>25</sup>.

Desde então, bilhões de equipamentos com osciladores piezelétricos são fabricados, em particular para relógios, computadores e televisores <sup>23,24</sup>. Entre os equipamentos com osciladores piezelétricos, destaca-se a microbalança de cristal de quartzo (*quartz cristal microbalance – QCM*) o qual é amplamente usada em medidas de microgravimetria durante depósitos de filmes finos sobre uma superfície.

Neste trabalho, a QCM será usada para acompanhar variações de massa sobre eletrodos durante as medidas eletroquímicas.

### 2.1.1 PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS BÁSICOS DA QCM

Os osciladores piezelétricos são dependentes da frequência fundamental do cristal de quartzo, o qual pode variar dependente do tipo de corte em diferentes ângulos em relação ao eixo cristalográfico e este corte define o seu modo vibracional, como mostra a Figura 2.

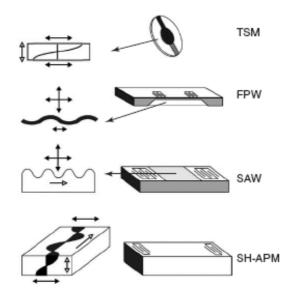


Figura 2. TSM - ressonância de cisalhamento de espessura (usado na QCM), FPW - ressonância de onda acústica laminar, SAW - ressonância de onda acústica de superfície, SH-APM - ressonância de cisalhamento no plano horizontal <sup>23</sup>.

Os cortes cristalográficos são nomeados por AT, BT, CT, DT e outros<sup>26,27</sup>. Para aplicação em uma microbalança de cristal de quartzo, é usado o corte cristalográfico AT de 35º 15' em relação ao eixo Z (Figura 3).

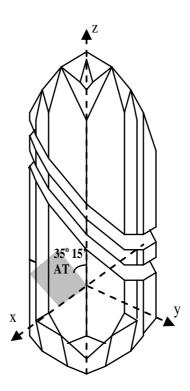


Figura 3. Diagrama esquemático do corte AT do cristal de quartzo, com uma fatia de cristal cortado em 35º 15' em relação ao eixo óptico.

O modo vibracional preferencial do corte AT é do tipo cisalhamento e para este tipo de corte, o cristal apresenta uma grande janela de freqüências, variando de  $5x10^2$  até  $3x10^8$  Hz, com uma estabilidade em alta freqüência de  $\Delta f/f \approx 10^{-8}$  Hz. Além desta propriedade, outra grande vantagem do corte AT é ter o coeficiente de temperatura praticamente zero entre 0 °C e 50 °C <sup>28</sup>.

Em 1959, Sauerbrey propôs uma equação que correlacionava a variação de freqüência do cristal com a massa depositada sobre a superfície do cristal, conhecida como equação de Sauerbrey<sup>23,27,29,30,31</sup>. Para o cristal de quartzo ressonante, em modo fundamental de cisalhamento, o comprimento de onda acústica transversal ( $\lambda$ ) é <sup>26</sup>:

$$\lambda_q = 2l_q$$
 (1)

sendo  $l_q$  a espessura do cristal. Assim, a freqüência ressonante  $f_0$  está diretamente relacionada ao comprimento de onda acústica transversal e à velocidade de propagação da onda acústica do cristal ( $v_q$ )  $^{26,29}$ .

$$f_q = \frac{v_q}{\lambda_q} = \frac{v_q}{2l_q}$$
 (2)

Como a freqüência do quartzo está relacionada à espessura, para uma variação infinitesimal da espessura  $I_q$  e da massa  $m_q$ , como mostra na Figura  $4^{26}$ , tem-se a relação (3):

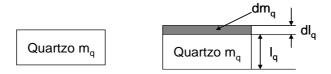


Figura 4. Diagrama esquemático da lâmina de cristal de quartzo e simulação do aumento infinitesimal na espessura do quartzo em uma superfície <sup>26</sup>.

$$\frac{df_q}{f_0} = -\frac{dl_q}{l_a} = -\frac{dm_q}{m_a} \tag{3}$$

Para um cristal de quartzo de densidade uniforme ( $\rho_q$ ), tem-se a relação 4:

$$\rho_q = \frac{m_q}{Al_a} \quad , \quad (4)$$

onde A é a área efetiva do cristal.

Substituindo a equação 4 na equação 3 e considerando a variação de massa infinitesimal do cristal,  $dm_q$ , igual à variação infinitesimal do filme depositado sobre a superfície do cristal,  $dm_f$ , tem-se a equação 5 <sup>26</sup>:

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2 \Delta m_f}{\rho_q \nu_q A}$$
 (5)

A cinética do cristal de quartzo também pode ser expressa em termos do módulo do cisalhamento do quartzo <sup>26,28</sup>:

$$v_q = \sqrt{\frac{\mu_q}{\rho_q}} \qquad (6)$$

Assim, obtém-se a equação de Sauerbrey (equação 7), expressa em termos de uma constante  $k^{23,26,28,29,32}$ :

$$\Delta f = \left(-\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\rho_q \mu_q}}\right) \Delta m_f = k.\Delta m_f \qquad (7)$$

A equação de Sauerbrey foi desenvolvida para aplicação da microbalança na análise de filmes sólidos no vácuo. Em meios líquidos, porém, a freqüência de oscilação do cristal varia dependendo do meio em que é imerso o cristal. A relação da freqüência em função do líquido utilizado foi descrita por Kanazawa e Gordon em 1985  $^{33,34}$ . O cristal de quartzo tem uma amplitude ( $A_0$ ) em seu modo vibracional normal; quando é colocado em um líquido, a amplitude de oscilação  $A_0$  transferida para acelerar o líquido decai exponencialmente em função da profundidade de penetração da oscilação ( $\delta$ ), como mostra a Figura 5  $^{35}$  e a equação 8  $^{35}$ .

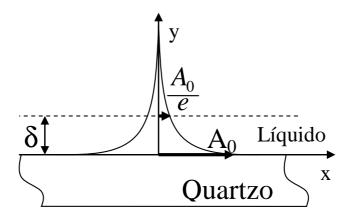


Figura 5. Diagrama esquemático da interface quartzo-líquido com a amplitude de oscilação do cristal de quartzo e decaimento da amplitude em função da distancia do quartzo.

$$A(y) = A_0 e^{-(y/\delta)}$$
 (8)

Sendo  $\delta = (\eta l / \pi f_q \rho_l)^{1/2}$ , a viscosidade do líquido  $\eta_l$  e a densidade do líquido em que o cristal foi colocado,  $\rho_l$ . Assim, a relação da freqüência com a viscosidade e densidade do líquido fica expressa pela equação 9  $^{26,27,29,30}$ :

$$\Delta f = -\sqrt{\frac{f_0^3 \rho_l \eta_l}{\pi \rho_q \mu_q}} \qquad (9)$$

Considerando que neste trabalho foi depositado um filme fino e rígido sobre a superfície do eletrodo, pode-se considerar a equação 7 válida.

Aqui foi usada a QCM200 da Stanford Research Systems<sup>32</sup> com cristal de quartzo ressonante com corte AT de freqüência fundamental aproximada de 5 MHz, área do eletrodo de ouro do cristal de quartzo, exposta no líquido, de ~1,37 cm², porém, com área efetiva da região ressonante entre os eletrodos de Au de ~0,4 cm², com  $\rho_q$  de 2,648 g cm³ e  $\mu$ q de 2,947x10¹¹ g cm⁻¹ s⁻². Assim, obteve-se a constante k do cristal de quartzo ressonante de 56.6 Hz  $\mu$ g⁻¹ cm² e a equação 7 escrita da seguinte forma³²:

$$\frac{\Delta f}{\Delta m_f} = k = 56.6 \left[ \frac{Hz.cm^2}{\mu g} \right]$$
 (10)

### 2.2 ELETROQUÍMICA

A eletroquímica é o ramo da química que correlaciona efeitos químicos com efeitos elétricos. A maior parte dos estudos eletroquímicos envolve a variação de

corrente como produto da energia elétrica produzida ou consumida para promover uma reação química <sup>36</sup>.

A Figura 6 mostra o numero de artigos publicados entre 1970 e 2008, obtido por meio da busca no site www.sciencedirect.com e utilizando o termo "electrochemical". Pode-se observar o grande crescimento do número de artigos a cada ano, os quais citam técnicas eletroquímicas em sínteses ou caracterizações de novos materiais. Diante das técnicas eletroquímicas que surgiram e das que foram aperfeiçoadas nos últimos quarenta anos, pode-se citar importância destas para o preparo de novos materiais e caracterizações de filmes e interfaces <sup>37</sup>.

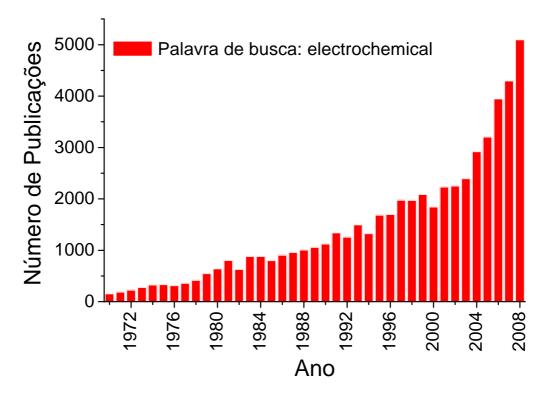


Figura 6. Curva de números de artigos publicados por ano entre os períodos de 1970 até novembro de 2008. Os valores obtidos foram através da busca no endereço eletrônico "www.sciencedirect.com" com termo de busca "electrochemical".

Neste trabalho, foram utilizadas as técnicas eletroquímicas de cronoamperometria (CA) e voltametria cíclica (VC). A técnica de CA<sup>36,37</sup> consiste na aplicação de um salto de potenciais (ou de um potencial fixo) entre o eletrodo de

trabalho e o contra eletrodo, ao longo de um tempo t, sendo medida a resposta da corrente em função do tempo em forma de processo faradaico. A resposta de corrente obtida é limitada pela difusão das espécies em solução e na interface eletrodo/solução como mostra a Figura 7. Durante a síntese de polímeros por AC ocorre a oxidação e redução do monômero e de oligômeros a um potencial fixo. A aplicação de potenciais fixos por CA sobre filmes poliméricos resulta em um estado oxidativo destes filmes promovido pela oxidação ou redução em solução, podendo ocorrer entrada ou saída de espécies iônicas no filme. A CA é comumente investigada em célula eletroquímica com três eletrodos.

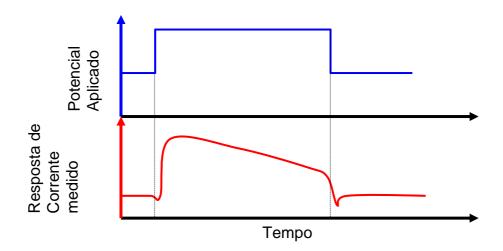


Figura 7. Exemplo de potencial aplicado pela técnica de cronoamperometria e um tipo de a resposta de corrente obtido.

A técnica de VC <sup>36,37</sup> consiste na aplicação de uma rampa de potenciais a um eletrodo de trabalho e é uma técnica dinâmica. O potencial é variado continuamente com o tempo e leva à ocorrência de reações de oxidação e redução de espécies eletroativas no conjunto solução, substrato e filme. Esta variação da resposta das espécies eletroativas entre um contra-eletrodo (CE) e um eletrodo de trabalho (ET) produz uma variação na corrente, que pode ser medida em função do potencial aplicado, que é o chamado voltamograma cíclico. O potencial aplicado

cresce linearmente a partir de um potencial inicial ( $E_i$ ), a uma velocidade de varredura (v), até atingir um potencial máximo estabelecido ( $E_{max}$ ), revertendo o sentido e decresce até um potencial mínimo ( $E_{min}$ ), revertendo novamente o sentido até atingir o potencial final ( $E_i$ ), como mostra a Figura 8.

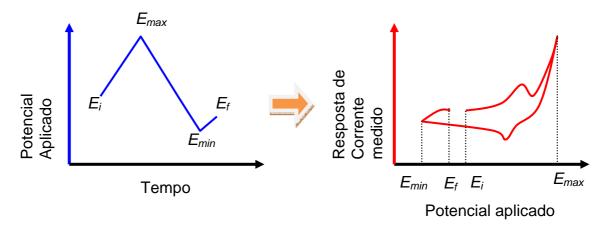


Figura 8. Exemplo de potencial aplicado pela técnica de voltametria cíclica e um tipo de a resposta de corrente obtido.

A VC serve tanto para a síntese, quanto para a caracterização dos filmes poliméricos. O voltamograma usado para a caracterização de materiais poliméricos depositados na superfície de um eletrodo em soluções livres do monômero é chamado de resposta eletroquímica. A resposta eletroquímica pode ser obtida em potenciais positivos e negativos, em curvas anódica e catódica, e que fornecem a região onde ocorrem as reações de oxidação e a redução dos filmes poliméricos, com as características intrínsecas destes materiais. Para a síntese de um polímero, é acrescentado à solução de trabalho o monômero. Os processos de eletropolimerização se iniciam em potenciais anódicos, promovendo a oxidação do monômero próximo à interface eletrodo/solução. Os monômeros oxidados (cátions radicais) podem sofrer acoplamento com outros monômeros oxidados, ou neutros,

formando dímeros, trimeros até oligômeros e polímeros, que se depositam na superfície do eletrodo.

Para se obter mais informações durante a síntese e caracterização eletroquímica dos filmes de PPI-2-COOH pelas técnicas de CA e VC, elas foram acopladas a outros equipamentos, tais como a QCM e o espectrofotômetro de absorção no UV-VIS. Para cada finalidade, foram usadas células eletroquímicas diferentes, porém, todas continham um compartimento para três eletrodos: o eletrodo de trabalho, o eletrodo de referência e o contra eletrodo. Para as medidas eletroquímicas, usou-se o potenciostato/galvanostato EG&G PAR 283 interfaciado a um microcomputador por uma placa de aquisição GPIB (National Instruments Corporation), usando o programa de aquisição de dados M270.

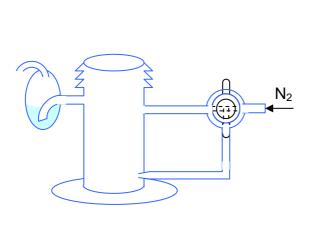
# 2.2.1 CÉLULAS ELETROQUÍMICAS

Neste item são apresentados quatro tipos diferentes de células eletroquímicas.

## 2.2.1.1 CÉLULA ELETROQUÍMICA I

Inicialmente, para as sínteses e as resposta eletroquímicas em eletrodos miniaturizados e eletrodos transparentes, usou-se uma célula eletroquímica de vidro básica contendo entrada de nitrogênio  $(N_2)$  com registro para borbulhar a solução ou manter atmosfera de  $N_2$  como mostra a

Figura 9.



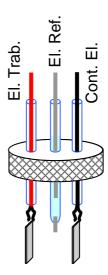


Figura 9. Célula eletroquímica com compartimento de 3 eletrodos e entrada de N<sub>2</sub>.

A tampa de teflon continha uma entrada para três eletrodos, um contra eletrodo de placa de Pt com área de ~3 cm², o eletrodo de referência Ag/AgCl e o eletrodo de trabalho dos seguintes tipos:

- ✓ Lâminas de vidro com cromo/ouro (Cr/Au) evaporado (30/200 nm).
- ✓ Lâminas de vidro com filme de óxido de estanho dopado com flúor (FTO) da (Flexitec - Brasil).
- ✓ Eletrodos miniaturizados (item 2.7).

#### 2.2.1.2 CÉLULA ELETROQUÍMICA II

A célula eletroquímica usada nas medidas de absorção no UV-VIS *in* situ tinha a peculiaridade de ter faces planas paralelas de vidro como mostra a

Figura 10. Esta célula eletroquímica também tinha entradas separadas para o eletrodo de referência e os contra eletrodos, cuja finalidade era evitar a interrupção do feixe de luz incidente. O eletrodo de referência usado foi de Ag/AgCI e como contra eletrodo, uma espiral de fio de Pt. Como eletrodo de trabalho foi usada uma

lâmina de FTO, já com os filmes depositados, e que foi presa em uma tampa de teflon com o cuidado de ser foi colocada paralela às faces planas da célula eletroquímica.

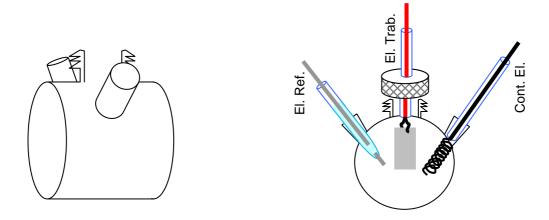


Figura 10. Célula eletroquímica para medidas de Uv-vis *in* situ com faces de vidro planas e paralelas.

### 2.2.1.3 CÉLULA ELETROQUÍMICA III

A Figura 11 mostra o esquema da célula eletroquímica usada para as medidas de eletroquímica junto à microbalança de cristal de quartzo (EQCM). Para montagem desta célula eletroquímica, foi usado o suporte do cristal de quartzo do equipamento QCM200 (Stamford Research Systems)<sup>32</sup> contendo dois conectores para o cristal de quartzo, sendo um dos conectores destinado à conexão com a superfície do cristal exposto à solução e cujo papel será o de ser o eletrodo de trabalho. O cristal de quartzo tinha um freqüência ressonante de 5 MHz com corte no plano AT, diâmetro de 2,54 cm e espessura de 331 μm. Os eletrodos sobre a superfície do cristal eram camadas de Cr/Au (20/100 nm de espessura).

A área do eletrodo de trabalho era a mesma da superfície do eletrodo em contato com a solução, ~ 1,37 cm², porém, a área efetiva de oscilação do cristal de

quartzo era de ~ 0,4 cm². O eletrodo de referência e contra eletrodo utilizados era Ag/AgCl e um espiral de fio de Pt, respectivamente. Um adaptador de teflon foi construído para conectar a célula eletroquímica ao suporte do cristal de quartzo do equipamento QCM200, com uma rosca na parte inferior e um orifício liso na parte superior, ambos com um anel de borracha para vedação. A célula eletroquímica de vidro foi encaixada ao orifício superior do adaptador e continha uma tampa de teflon com uma entrada para dois eletrodos e atmosfera de N₂, sendo a entrada do eletrodo de referência localizada no centro da tampa para uma melhor aproximação com o eletrodo de trabalho.

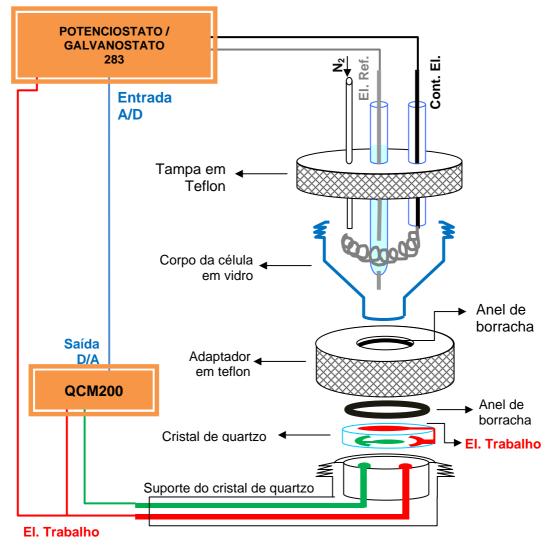


Figura 11. Célula eletroquímica para uso em medidas de EQCM com entrada de dois eletrodos e atmosfera de  $N_2$  e um suporte do cristal de quartzo com esquema de conexão ao potenciostato/galvanostato junto à QCM200.

# 2.2.1.4 CÉLULA ELETROQUÍMICA IV

A célula eletroquímica utilizada para as análises em injeção de fluxo (FIA) continha os eletrodos miniaturizados (Item 2.2.2). Devido aos ruídos obtidos nas medidas e que foram causados pelas oscilações das bombas peristálticas, decidiuse manter o fluxo por escoamento gravitacional. O nível da solução foi mantida em um reservatório tendo a boca voltada a superfície do líquido, como mostra a Figura 12. Para injetar um volume conhecido, sem alterar a velocidade do fluxo, foi usada uma chave comutadora com uma alça de amostragem com um volume conhecido ( $V_C$ ), sendo:

$$V_C = L\pi \left(\frac{D}{2}\right)^2 \tag{11}$$

sendo L e D o comprimento e o diâmetro do capilar, respectivamente.

O fluxo antes de entrar na célula eletroquímica passou por um banho térmico em uma serpentina de capilar usado no fluxo. A temperatura do banho térmico foi monitorada com um termômetro Minipa (Relógio Termo-Higrômetro MT-241) com o termopar fixo próximo à célula eletroquímica, que a célula foi feita em uma tampa com rosca. Nesta tampa, foi adicionado um anel de borracha e feito um corte lateral para o encaixe da fita de eletrodos miniaturizados, evitando vazamentos. Também foi adicionado um disco de teflon como encosto e um cilindro rosqueado à tampa, que pressionava todo o conjunto.

Para ligar os eletrodos miniaturizados ao potenciostato, foram utilizados conectores ISA de uma placa mãe de computadores antigos (486 ou 586).

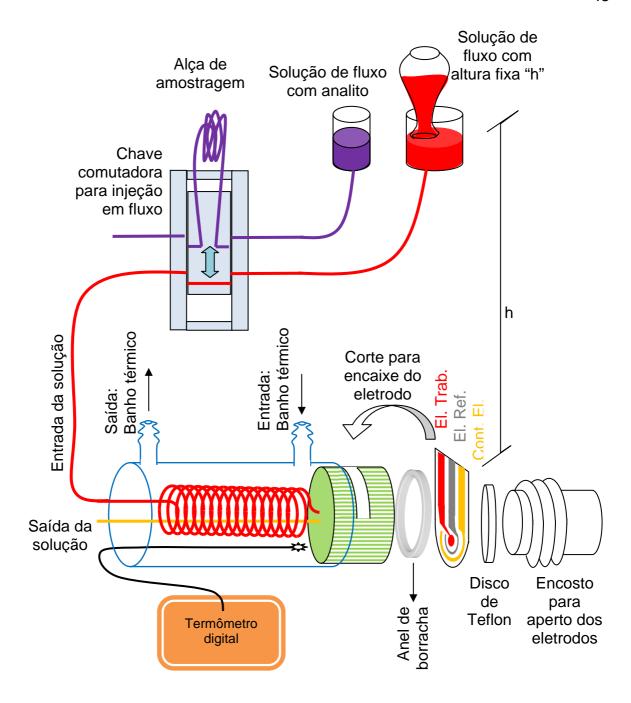


Figura 12. Célula eletroquímica fabricada para as medidas em FIA com microeletrodos.

# 2.3 ELETROQUÍMICA COM MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO (EQCM)

A EQCM possibilita observar a variação de massa e de viscoelasticidade na interface de um eletrodo ou de um eletrodo modificado com monocamadas ou filmes

conjuntamente com os processos de oxidação e redução sofridos nesta interface.

Desta forma, a QCM torna-se uma técnica essencial para se estudar os processos que envolvem variações de carga e de massa, tais como <sup>38</sup>:

- ✓ Processos de dopagem e desdopagem de polímeros condutores.
- ✓ Estudo de rotas de síntese.
- ✓ Determinação do número de elétrons envolvidos em processos de eletropolimerização.

Para se verificar qual era a relação entre o transporte de carga e a variação de massa de superfícies modificadas com camadas eletroativas, Bruckenstein e Hillman desenvolveram uma teoria que descrevia os fenômenos de transporte de íons, solventes e monômeros e que foi revisada na literatura<sup>38</sup>. Neste tratamento, admitiu-se que a massa molecular total do filme na superfície do eletrodo (*M*) era a soma das seguintes contribuições:

- ✓ massa molecular do eletrólito adsorvido (Mi).
- ✓ massa molecular do solvente (S).
- ✓ massa molecular da unidade da cadeira polimérica (Mp).

Aqui, para *Mp* usou-se o valor de 109,1 g mol<sup>-1</sup> que corresponde à diferença entre a massa molecular do monômero, PI-2-COOH (Mw = 111,1 mol L<sup>-1</sup>), e a massa molecular de dois H<sup>+</sup> que foram retirados no processo de oxidação do monômero. Desta forma, obtém-se a equação 12:

$$M = (x\%)(Mp) + (y\%)Mi + (z\%)S = (x\%)(Mw - 2M_{H+}) + (y\%)Mi + (z\%)S$$
(12)

A segunda lei de Faraday  $^{39}$  diz que a carga (Q) necessária para promover a oxidação de um mol de uma espécie  $\xi$  é proporcional ao número de elétrons (n) envolvidos em cada reação. Assim a constante F (constante de Faraday) permite a proporcionalide de um mol de elétrons por um mol de oxidação de espécies:

$$Q = nF\xi \qquad (13)$$

Desta maneira, pode-se obter uma relação direta entre a equação de Faraday e a equação de Sauerbrey (equação 14):

$$nF\frac{\Delta m}{\Delta O} = M = (x\%)(Mw - 2M_{H+}) + (y\%)Mi + (z\%)S$$
 (14)

A equação 14 mostra que é possível se expressar a variação de massa na superfície do eletrodo ( $\Delta$ m) e a variação de carga eletroquímica ( $\Delta$ Q) e extrair valiosas informações sobre os processos ocorridos durante a síntese e a resposta eletroquímica de filmes poliméricos, tal como de PPI-2-COOH.

Para as medidas de EQCM, usou-se a célula eletroquímica III descrita no item 2.2.1.3., que foi conectada ao potenciostato/galvanostato EG&G PAR 283. O potenciostato/galvanostato, por sua vez, foi conectado à QCM200 da Stanford, como descrito no esquema da Figura 11, e interfaciado a um microcomputador por uma placa de aquisição GPIB (National Instruments Corporation). O programa de aquisição de dados usado foi o M270.

Para a realização das medidas de EQCM foram seguidos os passos:

- 1º passo: Conectar a saída D/A do equipamento QCM200 à entrada A/D do potenciostato/galvanostato 283 e a um voltímetro ligado em paralelo com escala mínima entre -10 a 10 V, necessário para se verificar se a escala, usada na conversão digital-analógico, era a correta.
- 2º passo: Conectar o fio do eletrodo de trabalho do potenciostato/galvanostato 283 ao suporte do cristal de quartzo.
- 3º passo: Ligar os equipamentos e esperar estabilizar a temperatura do equipamento com a temperatura do ambiente.

- 4º passo: Inserir na célula eletroquímica: a solução, a tampa de teflon com o contra eletrodo e o eletrodo de referência, a entrada de N<sub>2</sub>; conectar os fios do potenciostato/galvanostato em seus respectivos eletrodos (CE e RE).
- 5º passo: Ativar a entrada auxiliar A/D e colocar os parâmetros no *software* do potenciostato para realização da medida desejada.
- 6º passo: Colocar a QCM200 na escala desejada para se obter uma boa sensibilidade e escala de valores adequados. Para escala de X Hz, a saída D/A do equipamento QCM200 converterá a variação de -X até X Hz para -10 até 10 V, onde X pode assumir um dos seguintes valores; 200, 500, 1000, 2000, 5000, 10000 ou 20000 Hz.
- 7º passo: Após estabilizar a freqüência da QCM, deve-se zerar o equipamento da QCM200 e iniciar a medida pelo software do potenciostato. Desta maneira, o software irá fazer aquisição simultaneamente de dados dos equipamentos para o mesmo intervalo de potencial, corrente ou tempo.

#### 2.4 ESPECTROSCOPIA

A combinação dos métodos eletroquímicos e espectroscópicos permite a investigação *in-situ* dos processos ocorridos durante a dopagem e desdopagem de filmes poliméricos. De forma similar ao visto com as moléculas orgânicas com grupos cromóforos, quando a radiação eletromagnética atravessa um filme de um polímero condutor, alguns comprimentos de onda são absorvidos pela amostra, que passa para um estado de energia excitado. O estado de energia total da molécula pode ser visto como uma soma das energias eletrônica, vibracional e rotacional. Neste trabalho, foram estudadas apenas as energias eletrônica e vibracional e como

não há publicações propondo modelos teóricos e nem descrições sobre a estrutura eletrônica do PI-2-COOH, oligômeros ou do PPI-2-COOH, este trabalho foi baseado em resultados e modelos teóricos da estrutura eletrônica do PPI.

# 2.4.1 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho é o estudo da interação da luz na região do infravermelho do espectro eletromagnético com a matéria. A interação da onda eletromagnética na região do infravermelho é referente aos modos vibracionais das moléculas presente no material. A correlação dos modos vibracionais da espectroscopia no infravermelho para cada tipo de molécula pode ser tabulada na literatura, o qual se torna uma importante técnica para determinação da estrutura química de materiais <sup>40,41</sup>.

Entre os espectrômetros no infravermelho, o espectrômetro no infravermelho por transformada de Fourier é o mais prevalente devido a numerosas vantagens. A principal vantagem da técnica de FTIR é a possibilidade de obter o espectro contendo toda a região do infravermelho no comprimento de onda entre 5000 até 400 cm<sup>-1</sup> <sup>40</sup>. Outras vantagens do FTIR é poder ter espectros com resolução de até 0,001 cm<sup>-1</sup>, poder se somar diversos espectros para obter maior sensibilidade, além dos resultados obtido pelo espectrofotômetro serem de fácil tratamento matemático <sup>40</sup>.

O espectrômetro no infravermelho por transformada de Fourier é constituído de uma fonte de luz na região do infravermelho, um interferômetro com um espelho móvel, um detector, um conversor analógico/digital e um computador (Figura 13). A

luz da fonte de FTIR incide o interferômetro se separando em dois feixes, um incide um espelho fixo e outro incide o espelho móvel. Os feixes de luz refletidos pelo espelho móvel e fixo se sobrepõem. Este feixe de luz sobreposto passa pela amostra incidindo no detector. Com a variação da distancia do espelho móvel ocorrerá interferências construtivas e destrutivas do feixe de luz que incide no detector. O sinal detectado é convertido de analógico para digital e após é feita a transformada de Fourier da variação do sinal pelo deslocamento do espelho para intensidade em função da frequência <sup>40</sup>.

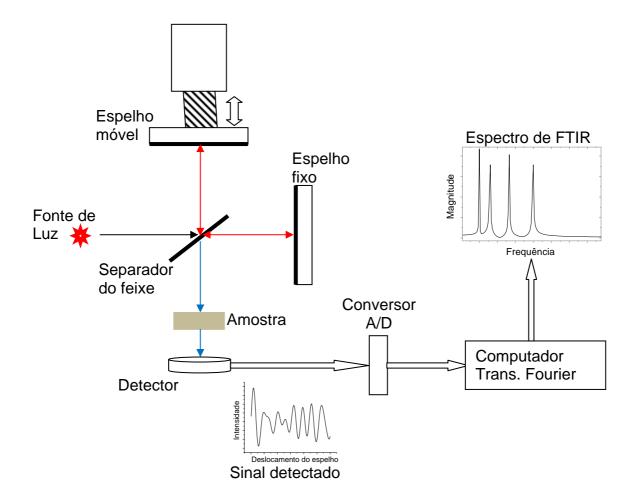


Figura 13. Esquema de um espectrofotômetro de FTIR.

As medidas de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (*FTIR*) foram feitas com o espectrofotômetro Nicolet Nexus 470 em modo de reflexão para os filmes depositados sobre eletrodos de Cr/Au (20/200 nm).

# 2.4.2 CONCEITOS E PROPRIEDADES ELÉTRICAS INTRÍNSECAS DO PPI

As propriedades semicondutoras ou condutoras dos polímeros conjugados estão relacionadas à presença da extensão do orbital  $\pi$ , formado pela combinação das hibridizações sp2 + pz. Sabe-se que a ligação entre os átomos de carbono é do tipo  $\sigma$ , porém, a fraca interação van der Waals entre os planos dos orbitais pz e a extensão dos orbitais  $\pi$  gera as características condutoras e semicondutoras dos polímeros, dando a origem ao orbital molecular  $\pi$ -ligante ( $\pi$ ) e ao orbital molecular  $\pi$ -antiligante ( $\pi$ \*). Estes orbitais moleculares também são chamados de banda de valência  $\pi$  e banda de condução  $\pi$ \*, como mostra a Figura 14<sup>42</sup>.

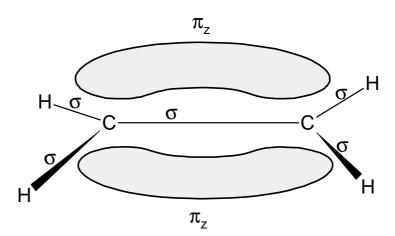


Figura 14. Dupla ligação característica do etileno  $(C_2H_4)$ , onde as ligações  $\sigma$  são representado por linhas e o orbital atômico pz dos átomos de C sobrepondo em forma de ligação molecular do orbital  $\pi_7$ .

A deslocalização dos orbitais acima e abaixo da cadeia polimérica permite com que haja uma mobilidade de carga na extensão desta cadeia. Porém, para um polímero conjugado, há diferenças na distância entre as ligações dos átomos de carbono, ou seja, para as duplas ligações entre os carbonos da cadeia polimérica, a distância é menor do que entre os carbonos com ligações simples, variando conforme a Figura 15 (a) para o poli(acetileno). Esta variação entre as distâncias promove a distorção de Peierls (Figura 15 (b)) e a abertura na estrutura de banda após a dimerização<sup>43</sup>.

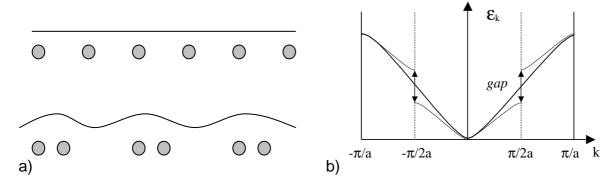


Figura 15. Poliacetileno: (a) dimerização da cadeia polimérica; (b) estrutura de banda antes e após a dimerização.

A distorção de Peierls faz com que os orbitais ocupados  $\pi$  e os orbitais vazios  $\pi^*$  se expandam originando orbitais moleculares análogos às conhecidas bandas de condução e de valência (BC e BV) dos semicondutores. A largura da banda proibida ou a energia de gap ( $E_{GAP}$ ) entre BC e BV é quem determina as propriedades elétricas intrínsecas do polímero. Assim, a condutividade de um polímero conjugado depende de seu estado de oxidação e, muitas vezes, o processo é definido erroneamente como "dopagem", equivalente ao processo de dopagem de semicondutores inorgânicos, quando é melhor representado como uma reação redox. Para a Física do estado sólido, o processo de oxidação de um

polímero conjugado por um agente oxidativo é uma dopagem do tipo-p. A redução por um agente redutor, uma dopagem do tipo-n. Desta forma, quando um polímero conjugado tem a sua condutividade alterada, ele sofre uma dopagem do tipo-p ou tipo-n, com a remoção de elétrons da BV (visto também como injeção de buracos) ou adição de elétrons na BC. Geralmente, para uma molécula orgânica, a geometria de equilíbrio de um estado ionizado é diferente da geometria de equilíbrio do estado fundamental. Seguindo o princípio de Franck-Condon<sup>43,44</sup>, uma molécula de polímero tem inicialmente uma geometria de equilíbrio quando se retira o polímero de seu estado fundamental com uma energia de ionização ( $E_{IO}$ ) (Figura 16). Para este polímero ionizado, ocorrerá uma mudança em sua geometria com certa energia de relação (E<sub>REL</sub>). Com o decaimento do estado ionizado para o estado fundamental, tem-se a saída de energia de decaimento ( $E_D$ ). Porém, a molécula ainda não se apresenta no estado inicial. Para que isto ocorra é necessário retornar para a geometria de equilíbrio do estado fundamental, quando a molécula sofre uma perda de energia (energia dissipada ( $E_{DIS}$ )). A diferença de energia de torção e de distorção entre a molécula de polímero no estado neutro e no estado ionizado é de  $\Delta \varepsilon$ , como mostra a Figura 16.

Podemos considerar que a presença de um íon durante a dopagem do tipopo ou do tipo-n em um polímero conjugado permite a retirada ou adição de elétrons na cadeia polimérica e uma alteração na geometria de equilíbrio do estado fundamental do polímero. Esta mudança de geometria (defeito) atinge entre 10 e 15 seqüências de átomos de carbono na cadeia conjugada<sup>43</sup>. O defeito gerado poderá percorrer toda cadeia polimérica na forma de uma onda solitônica carregando apenas a energia. Este defeito poderá ser encontrado na forma de solitons (pela

remoção de elétrons no poliacetileno), polarons (cátion radical) e bipolarons (dicátions)<sup>43</sup>.

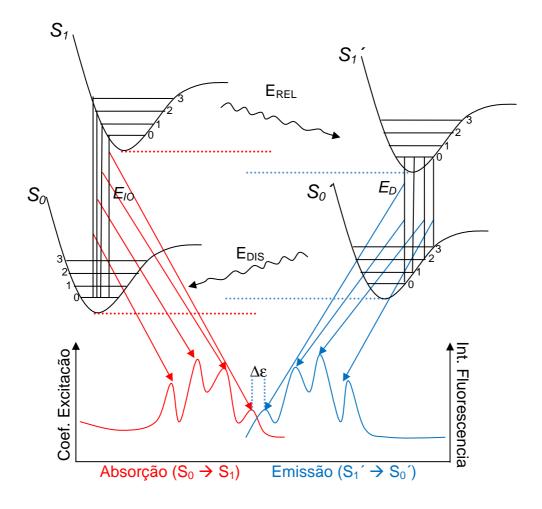


Figura 16. Processo de absorção e emissão entre os estados eletrônicos de uma molécula orgânica  $S_0$  e  $S_1$  com esquema básico do principio de Franck-Condon com transições verticais  $^{43}$ .

O filme de PPI no seu estado neutro é conjugado em toda a extensão de sua cadeia polimérica. Durante a oxidação do PPI, ao se retirar um elétron da sua cadeia polimérica em seu estado neutro, há a formação de um polaron com mobilidade eletrônica em uma configuração quinóide com maior energia e uma carga confinada de spin = ½ (Figura 17)<sup>45,46</sup>. Com a retirada de mais um elétron, há a formação de um bipolaron com duas cargas iguais, de mesmo sinal e confinadas

sob certa distância, com repulsões de forças de Coulomb, e também com mobilidade e uma grande distorção na cadeia polimérica na configuração quinóide (Figura 17).

Figura 17. Representação esquemática da estrutura do PPI neutro e com formação de polaron e de bipolaron após dopagem do *tipo-p*.

Brédas e Street<sup>46</sup> afirmaram que a  $E_{GAP}$  do PPI no seu estado neutro é de 3,2 eV. Com um baixo grau de dopagem do PPI, há a formação de polarons na cadeia polimérica que abrange cerca de quatro anéis quinóides e induz a formação de dois níveis eletrônicos localizados entre o gap: um nível eletrônico do estado polarônico a 0,49 eV acima da BV e outro nível eletrônico em 0,53 eV abaixo da BC (Figura 18 (a))<sup>46,47,48</sup>. Para uma dopagem do PPI moderada, ocorre a formação de um bipolaron na cadeia polimérica. A mudança conformacional da estrutura quinóide provoca modificações nos dois níveis intermediários do PPI, com valores de 0,75 eV da BV e 0,79 eV da BC. Por fim, quando a dopagem atinge o seu valor máximo (33 mol % por unidades de repetição do polímero), ocorre a sobreposição entre os estados bipolarônicos provocando a formação de uma banda extensa de

aproximadamente 0,4 eV entre a BV e a BC. A interação do spin fraco formado pelo bipolaron com a alta concentração de dopantes próximos à região neutra da cadeia do PPI, a atração de Coulomb sofrida pelo dopante (contraíon) provoca uma alteração do valor da  $E_{GAP}$  de 3,2 eV para 3,6 eV.

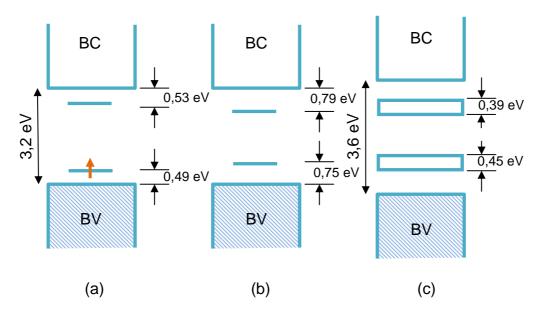


Figura 18. Evolução da estrutura de banda de energia pó PPI com a variação de dopagem: (a) formação de polaron com baixo nível de dopagem; (b) formação de bipolaron com médio nível de dopagem; (c) formação de bandas de bipolaron com alto nível de dopagem<sup>46</sup>.

Os autores Brédas et al.  $^{47}$ , Rapta et al.  $1998^{49}$ , Son e Rajeshwar  $^{50}$  e Patil, Heeger e Wudl  $^{51}$  estudaram os espectros de absorção no UV-VIS *in-situ* de filmes de PPI para diversos graus de dopagens. Estes resultados permitiram que fosse possível definir, para baixos e médios níveis de dopagem, que a transição das bandas  $\pi \to \pi^*$  da região neutra da cadeia do PPI era de 3,2 eV (388 nm). Para um alto grau de dopagem do PPI, a transição de  $\pi \to \pi^*$  é observada na região de 3,6 eV (344 nm). Para um baixo grau de dopagem, são definidas as absorções nas regiões de 0,7, 1,4 e 2,1 eV (1772, 886 e 620 nm) e que podem ser atribuídas à presença de polarons na cadeia polimérica. Para graus intermediários de dopagem,

a banda de absorção na região de 1,4 eV desaparece devido a um processe de recombinação de polarons e formação de bipolarons, que serão termodinamicamente mais estáveis para este estado de dopagem. Assim, quando aumenta o grau de dopagem da cadeia polimérica, a formação de bipolarons é caracterizada também por mudança das regiões de absorção de 0,7 e 2,1 eV para 1 e 2,7 eV (1240 e 460 nm).

De forma semelhante ao modelo proposto por Brédas et al. Para o PPI, Ford, Duke e Salaneck , utilizando o método de espectroscopia parametrizada CNDO/S3, propuseram que a transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  em 3,2 eV para a região neutra da cadeia do PPI corresponde ao aparecimento de duas bandas com uma diferença de aproximadamente 0,4 eV entre elas. Desta maneira, no espectro de absorção no UV-VIS dos filmes de PPI define-se uma banda larga como máximo em 3,2 eV.

#### 2.4.3 MONTAGEM EXPERIMETAL PARA A MEDIDAS NO UV-VIS in-situ

Para as medidas de absorção na região do UV-VIS até o infravermelho próximo *in-situ*, no intervalo de 190 nm até 1100 nm, utilizou-se um espectrofotômetro HITACHI U-2001 conectado a um microcomputador (PC1) (Figura 19). Um potenciostato/galvanostato Versastat II EG&G foi conectado a um outro microcomputador (PC2) (Figura 19) por uma placa de aquisição GPIB (National Instruments Corporation), usando o programa de aquisição de dados M270 e a célula eletroquímica descrita no item 2.2.1.2 CÉLULA ELETROQUÍMICA II.

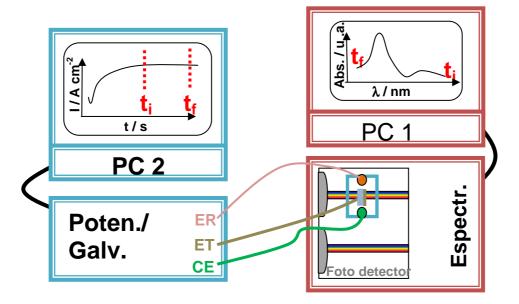


Figura 19. Esquema básico da montagem experimental para medidas de UV-VÍS in-situ.

Inicialmente, foi obtida a resposta eletroquímica em uma solução de 0,1 mol L<sup>-1</sup> TMABF<sub>4</sub> em ACN tratada de um filme de PPI-2-COOH depositado sobre laminas de vidro com filme de óxido de estanho dopado com flúor *(FTO)*, com isto foi possível definir a janela de potenciais que deveria ser usado durante as medidas no UV-VÍS *in-situ*.

A solução de eletrólito de suporte foi então adicionada à célula eletroquímica II, com o cuidado de atingir um nível acima do percorrido pelo feixe de luz do espectrofotômetro. Depois, foram adicionados na célula eletroquímica o contra eletrodo, o eletrodo de referência e uma lâmina de FTO sem um filme depositado como eletrodo de trabalho. O FTO foi posicionado de tal modo a ter as faces paralelas às faces da célula eletroquímica e com uma altura suficiente para que o feixe de luz a atravessasse sem atingir as bordas do eletrodo. Fixou-se a célula eletroquímica com a solução no porta-amostra do espectrofotômetro sem nada no porta-amostra de referência. Depois, foi realizada a medida de linha de base do espectrofotômetro. Em seqüência, retirou-se o substrato de FTO e

adicionou-se o substrato de FTO com um filme de PPI-2-COOH. Depois de verificados os contatos dos eletrodos, a célula eletroquímica foi encaixada no porta-amostra do espectrofotômetro. Os eletrodos foram conectados ao potenciostato e iniciou a medida eletroquímica pela técnica de CA no potencial desejado, por um tempo de 5 minutos. Após 1 minuto da aplicação do potencial, a corrente da medida de CA estabilizou-se devido ao equilíbrio de carga gerada na interface eletrodo/solução e ao equilíbrio difusional do transporte de íons. Em seqüência, foi acionado o espectrofotômetro para se realizar a varredura de 1100 até 300 nm. Após o término da medida de absorção, foi interrompida a medida de CA, que foi depois reiniciada em outro potencial desejado, obtendo-se assim um espectro de absorção para cada potencial aplicado.

#### 2.5 MODELAGEM MOLECULAR

A partir dos resultados experimentais houve um interesse em se propor uma rota de mecanismo de eletropolimerização do PI-2-COOH em acetonitrila tratada (ACN). Para isto, foi necessário usar métodos de modelagem molecular para se obter o calor de formação do formação do polímero. A partir da diferença do calor de formação dos dímeros formados por anéis heterocíclicos do PI-2-COOH ligados em diferentes posições, foi possível se verificar as posições mais favoráveis de acoplamento.

Inicialmente, para a construção da matriz da geometria aproximada da molécula, utilizou-se o pacote de softwares gratuito ACD/LABS (ChemSketch e 3D Vieuer) versão 11.01 da Advanced Chemistry Development, Inc.. Com o software ChemSketch, pode-se montar a estrutura em 2D da molécula desejada. Esta

estrutura foi exportada para o software 3D Vieuer, que permitiu o uso do recurso do software de otimização da molécula em 3D. Esta modelagem prévia demanda relativamente pouco tempo e processamento computacional e é eficaz para se descrever moléculas grandes. Geralmente, os pacotes de otimização 3D usados por estes tipos de software baseiam-se em modelos de mecânica molecular com uma visão clássica da estrutura molecular. As moléculas foram consideradas como um conjunto de esferas unidas por molas de forças constantes de tal forma que a energia potencial total era o resultado da somatória das energias de estiramento, dobramento, torção e interação fora das ligações químicas. Estas interações são geradas pelos seguintes parâmetros: interação de van der Waals, ligações de hidrogênio, repulsão estérica, atrações eletrostáticas, distância e ângulos de ligações, etc<sup>53</sup>. Após este ajuste, a matriz da geometria 3D otimizada foi salva com extensão \*.dat.

O segundo passo foi otimizar a geometria da molécula com o software gratuito WinMopac 7.21, que possui um pacote de métodos semi-empíricos como AM1(Austin Model 1), MNDO (Modified Neglect of Diatomic Overlap, PM3 (Parametric Method 3) e o MNDO/3 ou também chamado MNDO-PM3 (Modified Neglect of Diatomic Overlap – Parametric Method 3). Os métodos semi-empíricos baseiam-se em formalismos de orbitais moleculares, mas com diferentes abordagens para cada método $^{53}$ . Os métodos semi-empíricos AM1, MNDO e seus derivados partem da mesma equação de calor de formação, diferenciando de alguns termos entre eles $^{54,55}$ . O método semi-empírico MNDO usa parâmetros de moléculas no estado fundamental, baseando-se no formalismo com hamiltoniana  $H^{\nu}$  provida principalmente da energia interna correlacionada da ligação- $\sigma$  da cadeia da molécula ( $E_c$ ) e da interação dos elétrons com os operadores da camada de valência de um,

dois e três elétrons efetivos  $(U^{\nu}_{1})$ ,  $(V^{\nu}_{1,2})$  e  $(W^{\nu}_{1,2,3})$ . Desta forma, a hamiltoniana pode ser expressa como<sup>56</sup>:

$$H^{\nu} = U_1^{\nu} + V_{1,2}^{\nu} + W_{1,2,3}^{\nu} + \dots$$
 (15)

O software também carrega várias bibliotecas de rotinas e métodos: A rotina principal é destinada a encontrar o mínimo valor (SIGMA, EF, NLLSQ e BFGS), a segunda rotina possibilita a aproximação não restrita ou restrita à Hamiltoniana de Hartree-Fock (UHF e RHF) e o terceiro com um conjunto de métodos adicionais. O conjunto de métodos adicionais possibilita impor condições de simetria (SYMMETRY), o uso da correção de mecânica molecular para bandas CONH (NOMM e MMOK), do método de otimização de geometria de Davidon Fletvher-Powell (*DFP*), do sistema de dois elétrons desemparelhados (BIRADICAL) e do método de convergência Pulay (PULAY).

Com base nos trabalhos de otimização geométrica propostos para o PPI por métodos semi-empíricos, optou-se pelo uso do método MNDO. Entre os métodos e rotinas presentes no *software* foi usado o conhecido método de Hartree-Fock o qual considera todos os termos da densidade eletrônica total dos átomos com a inclusão da antissimetria da função de onda exigida pelo Princípio de Exclusão de Pauli <sup>55</sup>.

Para se determinar quais os métodos e rotinas restantes que fariam parte das regressões, foram testadas duas construções de moléculas. Um dímero de PI-2-COOH com ligações entre os anéis heterocíclicos na posição 5,4 e outro, na posição 4,5 (Figura 20).

Figura 20. Dímeros formados de PI-2-COOH nas posições 5,4 e 4,5.

Como o *software* 3D Vieuer gera matrizes diferentes para os dímeros nas posições 5,4 e 4,5, a otimização molecular realizada pelo *software* WinMopad não resulta necessariamente no mesmo valor do calor de formação e da energia total da molécula. Deste modo, foi necessário realizar diversos testes até se obter uma sequência de métodos e de rotinas que gerassem uma menor diferença entre a energia total ou o calor de formação entre os dois dímeros. A sequência de método e de rotinas selecionadas foram: MNDO, BFGS, RHF e PPULAY.

### 2.6 FABRICAÇÃO DOS ELETRODOS MINIATURIZADOS

Os eletrodos miniaturizados usados no sistema FIA foram confeccionados sobre filmes de poliimida e ou em transparências para retro-projeção (Data Jet – Ref 15500). Inicialmente, as folhas de transparência e ou de poliimida foram lavadas em um banho de álcool isopropílico, depois foram colocados no ultrasom por 10 min e então secas com jato de N<sub>2</sub>. O desenho das trilhas foi impresso em escala em uma impressora a jato de tinta (HP-Deskjet 930C) em modo de alta qualidade no lado liso da folha de poliimida ou transparência (Figura 21). Com isto, foi possível remover posteriormente o metal nos locais cobertos pela tinta.



Figura 21. Desenho das máscaras dos eletrodos impressos em papel A4 e em folha de poliimida.

As máscaras foram secas e presas no suporte da evaporadora (Boc Edwards Auto 306/FL-400) com o cuidado para não borrar e com o auxílio de fita adesiva de dupla face. Foi realizada a evaporação de Au (40 nm) ou Cr/Au (30/200 nm) sobre a folha de poliimida e ou a transparência com as máscaras de tinta. No caso da poliimida foi possível evaporar apenas o Au, sem necessidade do Cr como camada de adesão. Como a poliimida suporta uma temperatura superior àquela da transparência, foi possível obter uma boa adesão do Au quando ela foi submetida a 250 °C durante 10 min. O tempo e temperatura necessários para se melhorar a adesão do Au nas folhas de poliimida dependem do fabricante e do lote de fabricação da poliimida.

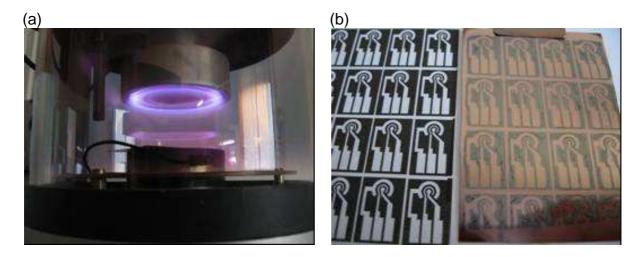


Figura 22. Evaporação de Au ou Cr/Au sobre a folha de poliimida com máscara de tinta de impressora. (a) ilustração de evaporação de Au, (b) Desenho das máscadas dos eletrodos impressos em papel A4 e folha de poliimida com desenho das mascaras após a evaporação de ouro.

Após a evaporação do metal, a poliimida, ou a transparência, foi lavada com água e atritada suavemente para se retirar a tinta com Au (Figura 23 a). Desta maneira, restaram somente as trilhas de Au ou Cr/Au (Figura 23 b).

Outros metais ou polímeros podem ser depositados sobre as trilhas de Au por deposições eletroquímicas ou pelo método *electroless* (Figura 24a). A Figura 24b mostra um eletrodo miniaturizado com os eletrodos de trabalho e contra eletrodo de Cr/Au e o eletrodo de referência de Ag (quase referência (Ag-QRE)) depositado sobre o Cr/Au.

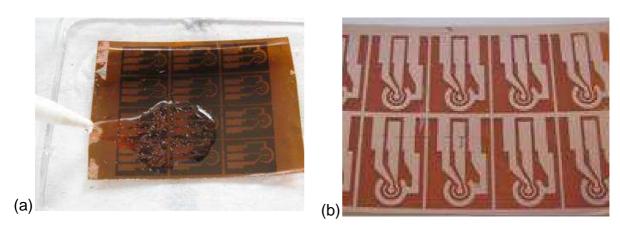


Figura 23. (a) Remoção da tinta de impressora com água sobre a superfície da poliimida após a evaporação de Au. (b) Trilhas de Au sobre a superfície de poliimida.

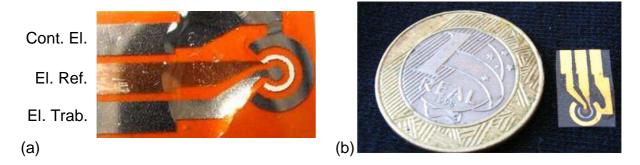


Figura 24. Eletrodo miniaturizado: a) com o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo de Au/Ni e o eletrodo de referência de Ag sobre folhas de poliimida e b) com o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo de Cr/Au e eletrodo de referência de Ag sobre folhas de transparência de retroprojetor.

Para a deposição de Ag sobre a trilha destinada ao eletrodo de referência, preparou-se uma solução aquosa de nitrato de prata (10 g L<sup>-1</sup>). A esta solução foi adicionado hidróxido de amônia até o clareamento da solução e, em seguida, adicionou-se lentamente hidróxido do potássio (2 g L<sup>-1</sup>) agitando-a para evitar a formação de precipitado e depois, mais hidróxido de amônia, gota a gota, até que a

solução atingisse uma coloração marrom claro. Para a eletrodeposição de Ag, conectou-se à trilha destinada ao eletrodo de referência ao fio do conector de trabalho do potenciostato. Para tanto, utilizamos um eletrodo de referência de calomelano (SCE) e contra eletrodo de Pt. A eletrodeposição foi feita por CA em um potencial de 0,05 V vs SCE durante 40 s. Para finalizar, os eletrodos miniaturizados foram lavados com água, secos com N<sub>2</sub> e as trilhas foram isoladas com resina epóxi (Araldite), restando somente as superfícies destinadas aos eletrodos de trabalho, de referência e o contra eletrodo.

# 2.7 REAGENTES E SOLUÇÕES

Para os estudos sobre a síntese, a resposta eletroquímica e as medidas de UV-VIS *in-situ* dos filmes de PPI-2-COOH, foi usada acetonitrila (ACN) (Mallinckrodt com 0,0032% de água – valor de rótulo) estocada em peneira molecular ativada. A ativação da peneira molecular foi feita por lavagem e posterior tratamento da peneira entre 300-400 °C durante 2 h. Os sais tetra-n-butilamônio de tetrafluoroborato (TBABF4 da Avocado, 97%) e tetrametilamônio de tetrafluoroborato (TMABF4 da Avocado, 97%) e o monômero, pirrol-2-ácido carboxílico (PI-2-COOH da Fluka, 97%), foram mantidos em um dessecador sob vácuo para proteção contra umidade. Estes procedimentos foram necessários para se evitar a presença de água e possibilitar um maior controle sobre a influência da água durante o preparo e a caracterização dos filmes poliméricos.

Para a ativação do grupo ácido carboxílico do PPI-2-COOH foi usada uma solução contendo N-(3-Dimetilaminopropil)-N-etil-carbodiimida (EDC) (Aldrich, ≥97%) e pentafluorofenol (PFP) (Aldrich, 99+%) em etanol. Para a imobilização da enzima

foi preparada uma solução contendo tirosinase de cogumelo obtida comercialmente (Fluka, 2260 U mg<sup>-1</sup>) e preparada em uma solução tampão fosfato em pH 6,5 defosfato de sódio bibásico anidro (Synth) e fosfato de sódio monobásico monohidrato (J.T. Baker)). Para se obter as respostas dos biossensores foram preparadas diversas soluções tampão fosfato a diferentes valores de pHs em diversas concentrações de pirocatecol (Mallinckrodt).

#### 2.8 A ENZIMA POLIFENOL OXIDASE (PFO)

No século 18 surgiu o primeiro trabalho sobre a catálise biológica, tratando da digestão de alimentos em aves pela excreção de uma substância pelo estômago<sup>57,58</sup>. Hoje, sabe-se que as enzimas estão presentes em todos os seres vivos, que são em sua maioria biopolímeros biológicos de elevada massa molecular (proteínas, exceto o grupo de moléculas de RNA) e são necessárias para catalisar reações químicas<sup>59</sup>. Os nomes mais comuns das enzimas são derivados do tipo de catálise que esta enzima pode promover e da específica reação que ela catalisa com a terminação do sufixo "ase". Por exemplo, a polifenol oxidase tem o seu nome derivado da propriedade de catalisar a oxidação de mono-fenóis a polifenóis <sup>58-60</sup>.

As enzimas são portadoras de centros ativos, regiões especializadas em reconhecer reagentes específicos e catalisar a reação química. O centro ativo pode ser uma molécula orgânica ou um íon metálico. As interações entre os centros ativos e o reagente são as mesmas forças que estabilizam a estrutura das proteínas: interação hidrofóbica, interação eletrostática, pontes de hidrogênio e interação de van der Waals<sup>61</sup>.

De acordo com o tipo de reação de catálise promovida pelas enzimas, existe uma classificação internacional de enzimas agrupadas em seis classes<sup>58,59</sup>:

- ✓ Oxirredutases: catalisam as reações por meio de oxidação ou redução, ou seja, transferência de elétrons.
- ✓ Transferases: transferem grupos funcionais entre doador e aceptor.
- ✓ Hidrolase: promovem a clivagem de um material orgânico com a utilização de água.
- ✓ Liases: catalisam a clivagem de C-C, C-O, C-N por meio de outras ligações e removendo de moléculas de água, amônia e gás carbônico.
- ✓ Isomerases: catalisam mudanças geométricas ou mudança estrutural produzindo uma forma isomérica.
- ✓ Ligases: catalisam a formação de ligação entre duas moléculas por reações de condensação pela clivagem do ATP.

Em geral, a classe de enzimas oxirredutases, que promove a catálise das reações de oxidação ou redução, é amplamente usada na fabricação de biossensores amperométricos. Dentro da classe de enzimas oxirredutases, as mais usadas em biossensores são as oxidases, desidrogenases e peroxidases.

Como catalisadores, as enzimas atuam na redução da energia de ativação necessária para que se dê uma reação química, acelerando a velocidade de reação e atingindo o estado de equilíbrio químico sem alterá-la, como mostra a Figura 25.

Inicialmente, a cinética enzimática em um sistema de só um reagente foi descrita por Michaelis e Menten <sup>60,61</sup>, que propuseram um modelo simples que descreve a maiorias das reações catalisadas por enzimas. Inicialmente, a enzima (E) se liga ao reagente (S) e forma em uma constante de velocidade (k1) um

complexo intermediário e transitório de enzima-reagente (ES), que poderá retornar ao se estado inicial definido pela constante de velocidade (k2) ou reagir e transfomar-se em um produto (P) em uma constante de velocidade (k3) (Figura 26). 60,61

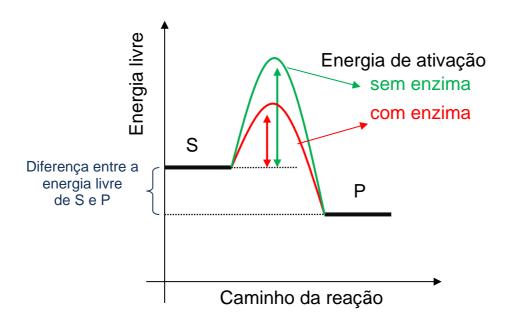


Figura 25. Diagrama de uma reação com e sem auxílio de biocatálise com o nível de energia em cada etapa da reação. A catálise promovida pela enzima aparece com a diminuição da energia de ativação sem haver a mudança da energia livre do reagente S e da energia livre do produto P<sup>60,61</sup>.

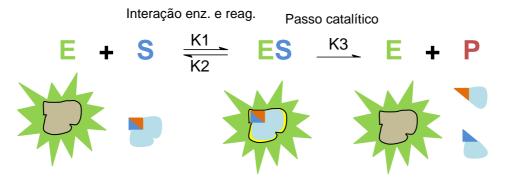


Figura 26. Diagramas que mostram a atividade enzimática pelo modelo do encaixe induzido junto com a reação descrita por Michaelis e Menten<sup>60,61</sup>.

Seguindo as etapas da Figura 26, tem-se a constante de Michaelis-Menten  $(k_M)$  (equação 19)  $^{60}$ .

$$\frac{\left(k3+k2\right)}{k1} = k_M \qquad (16)$$

Assim, pode-se descrever a equação de Michaelis-Menten (equação 17) por meio da velocidade inicial ( $v_0$ ) e da velocidade inicial máxima da reação ( $v_{MAX}$ ), sendo o comportamento da curva da equação de Michaelis-Menten descrita pela Figura 27  $^{60}$ .

$$v_0 = \frac{v_{MAX}[S]}{k_M + [S]}$$
 (17)

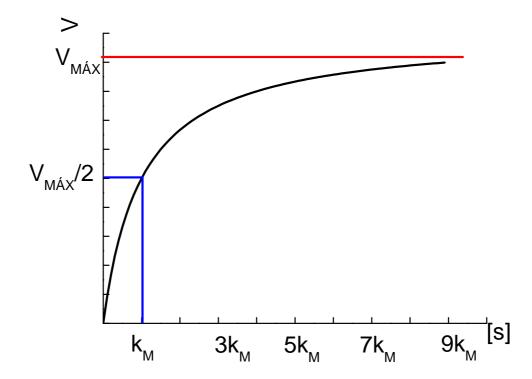


Figura 27. Efeito da concentração de analito na velocidade inicial da reação enzimática<sup>60</sup>.

A partir dos resultados de velocidade inicial de reação *versus* variação de concentração, obtém-se o limite de velocidade, definido como a velocidade máxima

de reação ( $v_{M\acute{A}X}$ ) no patamar da Figura 27 e o ponto de  $1/2v_{M\acute{A}X}$ , este último que possibilita a obtenção direta do valor de  $k_M^{60}$ .

A equação 18 permite a obtenção do gráfico linear de 1/v<sub>0</sub> vs 1/[S] <sup>60</sup>:

$$\frac{1}{v_0} = \left( \left( \frac{k_M}{v_{M\acute{A}X}} \right) \cdot \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{v_{M\acute{A}X}} , (18)$$

Com a equação 18, pode-se obter o coeficiente angular igual a  $k_M/v_{M\dot{A}X}$  e o intercepto de -1/ $k_M$  e 1/ $v_{M\dot{A}X}$  nos pontos onde 1/ $v_0$  ou 1/[S] é zero <sup>60</sup>.

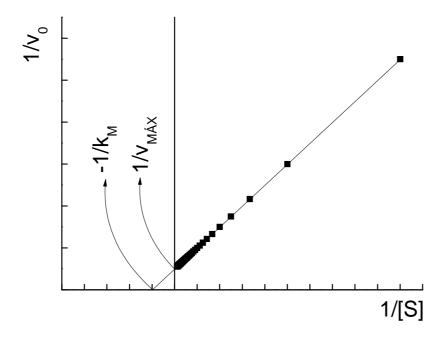


Figura 28. Linearização da equação de Michaelis-Menten em função de  $1/v_0\ vs\ 1/[S]^{60}$ .

Desta maneira, por meio das equações de Michaelis-Menten é possível se checar a cinética de catálise de uma enzima imobilizada em um biossensor em função da resposta amperométrica.

Na cinética enzimática a velocidade de uma reação depende fortemente de dois fatores: temperatura e pH <sup>59,60</sup>. O aumento da temperatura influencia

diretamente o aumento da velocidade de reação, já que aumenta a energia térmica do sistema e, conseqüentemente, a quantidade de moléculas com energia próxima à da energia de ativação <sup>59,60</sup>. Desta maneira, a velocidade da reação aumenta com a facilidade de se realizar a catálise em um sistema com uma maior energia. No caso da biocatálise, existe um fator limitante para o aumento da temperatura, pois como as enzimas são derivadas de proteínas, a partir de uma determinada temperatura elas apresentam desnaturazão das proteínas e perdem a sua atividade enzimática <sup>59,60</sup>. Desta maneira, todas as enzimas apresentam um gráfico de velocidade de reação *vs* temperatura com um ponto de máximo onde, com o aumento da temperatura, verifica-se a perda definitiva da atividade<sup>59</sup>.

A concentração dos íons H<sup>+</sup> presentes em solução ou, em outras palavras, o valor do pH, influencia a velocidade de reação enzimática, o estado da enzima ou do analito ou de ambos e possibilita a melhora, retardo ou até mesmo a não ocorrência de determinada reação enzimática <sup>59,60</sup>.

#### 2.8.1 POLIFENOL OXIDASE (PFO)

A polifenol oxidase (PFO), também chamada tirosinase, catecolase ou catecol oxidase, catalisa a oxidação tanto de monofenóis (tirosina, fenol, etc.) como de difenóis (catecol, dopamina, etc.)<sup>57</sup>. A PFO é uma enzima abundante na natureza e está presente em uma maior quantidade em cogumelos e ela na batata, maçã, mandioquinha, banana, abacate, etc., sendo a enzima responsável pelo aparecimento das pigmentações escuras nos vegetais, frutos e fungos.

O centro ativo da PFO é composto por um complexo binuclear com um par de átomos de cobre  $(Cu(II))^{6,62}$  e que catalisa a oxidação dos grupos hidroxilas

presentes no pirocatecol, envolvendo 1/2O<sub>2</sub>, e resulta na formação de o-quinona e água, como mostra a Figura 29.

$$\begin{array}{c|c}
OH & O \\
+ 1/2 O_2 & PFO \\
\end{array}$$

$$\begin{array}{c|c}
O & O \\
+ H_2O
\end{array}$$

Figura 29. Reação de oxidação do pirocatecol catalisada pela enzima PFO.

Da mesma forma a PFO catalisa a oxidação do 2,4-diclorofenol (2,4-DCF) cujo é o produto da degradação do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

#### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capitulo são apresentados os resultados e discussão obtidos neste trabalho, seguindo a sequência de síntese e caracterização do novo polímero e após foi feito a construção e a caracterização do biossensor checando a funcionalidade como biossensor de composto fenólicos.

#### 3.1 SÍNTESE ELETROQÍMICA DOS FILMES DE PPI-2-COOH

No inicio deste trabalho, foram realizadas diversas tentativas frustradas para a obtenção de um filme eletroativo e espesso de PPI-2-COOH em uma solução de acetonitrila (ACN). Ao estudarmos os trabalhos sobre a superoxidação do polipirrol (PPI)<sup>63,64</sup>, surgiu uma explicação para um possível efeito da presença de água no solvente que provocaria a superoxidação do filme de PPI-2-COOH, bloqueando a superfície do eletrodo para um processo de formação de um filme eletroativo. Assim, foi decidido que deveria ser feito um estudo mais sistemático sobre a eletrossíntese do PPI-2-COOH em meio não-aquosa na ausência e na presença de uma quantidade definida de água.

### 3.1.1 ELETROSSÍNTESE DO PPI-2-COOH COM A PRESENÇA DE ÁGUA

A Figura 30 mostra o processo de eletrossíntese de um filme de PPI-2-COOH por VC no intervalo de potenciais de 0 a 1,95 V vs Ag/AgCl, em uma solução contendo PI-2-COOH 0,1mol L<sup>-1</sup>, TMABF<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> em ACN tratada com adição de 1% de água em eletrodos de Cr/Au (20/200 nm) evaporados em lâminas de vidro.

Durante a varredura no primeiro ciclo da Figura 30 (a), foi observado uma intensa corrente anódica devido à oxidação do PI-2-COOH. Pode-se observar também nos ciclos sucessivos uma queda brusca da corrente a cada ciclo e após o 10º ciclo (aproximadamente 14 min do início da eletropolimerização) obteve-se um filme uniforme, porém, muito fino sobre a superfície do eletrodo.

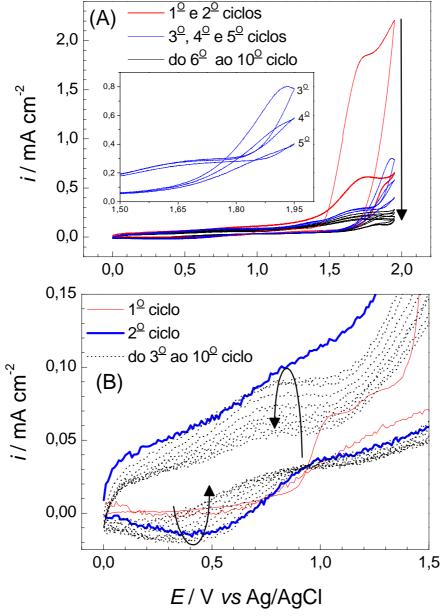


Figura 30. Voltamogramas cíclicos de um eletrodo de Au em meio de PI-2-COOH 0,1mol  $L^{-1}$  e TMABF<sub>4</sub> 0,1 mol  $L^{-1}$  em ACN com a adição de 1% de água; v = 50 mV s<sup>-1</sup>.

Com a inversão da direção na varredura, pode-se observar claramente para o 3º, 4º e 5º ciclo (Ampliação na Figura 30 (a)) a formação de um laço, cuja corrente durante o processo de redução é maior do que a corrente obtida na oxidação. A presença deste laço durante a inversão da varredura é característica de um processo de nucleação do filme polimérico sobre a superfície do eletrodo<sup>65</sup>. O valor de potencial final usado (1,95 V vs Ag/AgCl) foi alto o suficiente para promover a deposição do filme na superfície do eletrodo. Contudo, é alto demais e promove a eletrooxidação do PI-2-COOH. A eletrooxidação do monômero se define entre 1,6 e 1,7 V conforme visto com o início do aumento de corrente durante o processo anódico no primeiro ciclo da Figura 30 (a). Portanto, para a obtenção de um filme mais espesso, ou seja, com maior carga foi necessária a aplicação de um potencial mais elevado (1,95 V). Foi possível também observar que para a síntese do filme de PPI-2-COOH em presença de água surgia um processo catódico pouco definido (Figura 30 (b)). Nos ciclos seguintes ao segundo ciclo, a corrente da resposta voltamétrica diminuiu, o que evidenciou a formação de um filme tipicamente eletroinativo, ou seja, de polímero isolante sobre a superfície do eletrodo<sup>66</sup>.

## 3.1.2 ELETROSSÍNTESE DE FILMES DE PPI-2-COOH SEM A PRESENÇA DE ÁGUA E EM ELETRODOS DA QCM

A Figura 31 mostra a eletrossíntese e os resultados de QCM do filme de PPI-2-COOH por VC em uma solução contendo PI-2-COOH 0,1mol L<sup>-1</sup> e TMABF<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> em ACN tratada e sem a adição água e em eletrodos da QCM. Para um potencial de oxidação mais baixo comparativamente (Figura 31) foi obtida uma cobertura mais uniforme sobre o eletrodo de trabalho e com maior espessura.

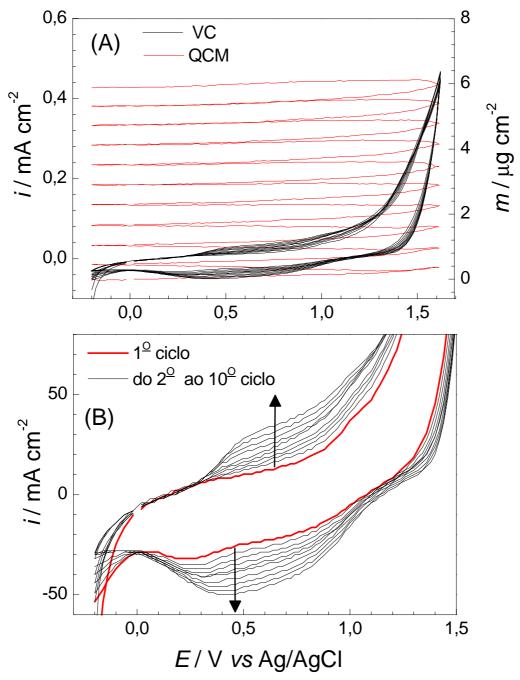


Figura 31. Voltamogramas cíclicos de um eletrodo de QCM em meio de PI-2-COOH 0,1mol  $L^{-1}$  e TMABF<sub>4</sub> 0,1 mol  $L^{-1}$  em ACN sem a adição de água; v = 50 mV  $s^{-1}$ .

A eletrossíntese do filme de PPI-2-COOH na ausência de água e em um menor intervalo de potencial faz com que a densidade de corrente nos voltamogramas aumente em função do número de ciclos. É possível também visualizar na Figura 31 (c), a presença de um par redox largo definido entre 0,57 e

0,4 V para processos anodicos e catódicos, respectivamente. Com a medida de QCM foi realizada conjuntamente com e eletrossíntese do filme de PPI-2-COOH, foi possível confirmar alguns processos na janela de potenciais aplicados (Figura 31 (a) e (c)). A Figura 31 (b) mostra que há um ganho de massa significativo para cada ciclo, mas uma pequena perda de massa na região catódica entre 1,6 e 1,4 V durante o 1º, 2º e 3º ciclo (Figura 31 (b)) devido a um efeito solubilização de oligômeros formados na interface eletrodo/solução. Para os ciclos sucessivos, oligômeros atingem determinados tamanhos críticos e fica mais evidente um ganho de massa praticamente constante para cada ciclo. A definição do par redox na Figura 31 (c) e o aumento de massa por ciclos na Figura 31 (b) evidenciam a obtenção de um filme eletroativo sobre a superfície do eletrodo e que o potencial final de 1,62 V é alto o suficiente para promover a eletrossíntese de um filme espesso.

Durante o processo de síntese do PPI-2-COOH, mostramos claramente que há uma dependência da resposta do eletrodo com a presença de água na solução. Porém, a mudança do eletrólito de suporte e o uso de um alto valor de potencial final aplicado (1.95 V) não afetam tanto as etapas de formação do filme. Isto foi verificado estudando o processo de eletropolimerização do PI-2-COOH por CA aplicando 1,95 V durante 10 s em uma solução contendo PI-2-COOH 0,1mol L<sup>-1</sup> e TBABF<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> em ACN tratada e sem a adição água em eletrodos da QCM. O transiente de corrente obtido na curva (a) da Figura 32 é típico da resposta da eletropolimerização do pirrol e de outros monômeros <sup>67,68</sup>.

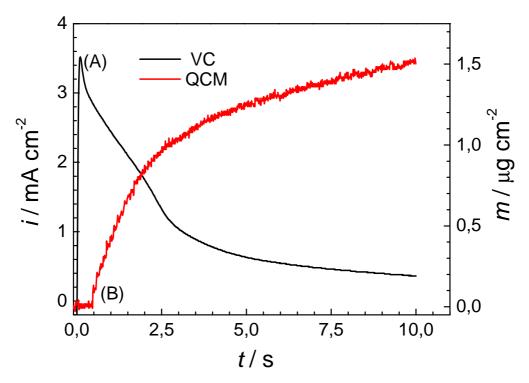


Figura 32. Cronoamperograma de um eletrodo de Au em meio de PI-2-COOH 0,1mol  $L^{-1}$  e TBABF<sub>4</sub> 0,1 mol  $L^{-1}$  em ACN sem a adição de água; t = 10 s e E = 1,95 V vs Ag/AgCl.

A queda de corrente vista na curva (a) da Figura 32 está relacionada ao alto potencial final aplicado, pois ocorre uma queda de concentração do monômero na interface eletrodo/solução e o consumo de monômeros com a formação de dímeros e espécies oligoméricas até a saturação, quando atingem um tamanho crítico. Neste caso, a velocidade é limitada pela velocidade difusional do monômero na solução, sendo que a densidade de corrente (curva (a) da Figura 32) cai em função do tempo até atingir um patamar mínimo. Este patamar se define em função do equilíbrio da velocidade difusional com o consumo de monômero na interface. Durante este processo rápido, a massa aumenta continuamente com o tempo, como pode ser observado na (curva (b) da Figura 32). O efeito da rápida queda de corrente em função do tempo pode ser minimizado aumentando a concentração do monômero,

ou preferencialmente, diminuindo o potencial aplicado. Desta maneira, pode-se ter uma síntese mais controlada e, consequentemente, filmes mais espessos.

Os resultados de eletrossíntese do filme de PPI-2-COOH confirmaram a necessidade da ausência de água no solvente e que o melhor potencial final a ser aplicado foi de 1,62 V vs AgAgCl. Verificou-se também que os eletrólitos de suporte (TBABF4 ou TMABF4) não provocaram grandes diferenças para os resultados das sínteses. Os filmes obtidos com e sem a presença de água e em TBABF4 e TMABF4 foram caracterizados por FTIR. Para as demais caracterizações, foi realizado o procedimento empregado na Figura 31.

## 3.1.3 ELETROSSÍNTESE DO FILME DE PPI-2-COOH SEM A PRESENÇA DE ÁGUA E EM ELETRODOS DE FTO

A Figura 33 mostra os voltamogramas cíclicos, durante a eletrossíntese de um filme de PPI-2-COOH em uma solução contendo PI-2-COOH 0,1mol L<sup>-1</sup> e TMABF<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> em ACN tratada, de um eletrodo de FTO em um intervalo de potenciais reduzido para -0,2 a 1,55 V devido às diferenças interfaciais entre os eletrodos de Au e FTO. Visualmente, após cinco ciclos, foi obtido um filme com características superficiais uniformes, tal como os obtidos sobre eletrodos de Au. Também é possível visualizar na Figura 33 um par redox largo, que da sobreposição de dois processos redox em 0,3 e 0,69 V na curva anódica e em 0,11 e 0,5 V na curva catódica. Esta resposta é típica de um polímero eletroativo depositado sobre a superfície do eletrodo.

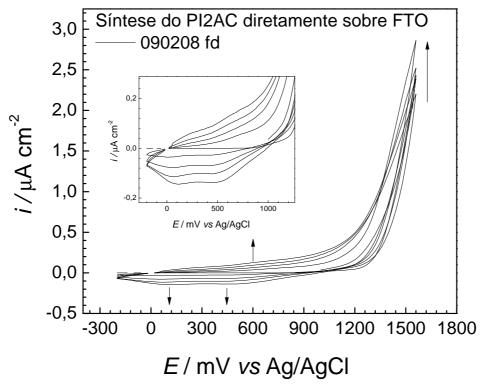


Figura 33. Voltamogramas cíclicos de um eletrodo de FTO em meio de PI-2-COOH 0,1mol L $^{-1}$  e TMABF $_4$  0,1 mol L $^{-1}$  em ACN sem a adição de água; v = 50 mV s $^{-1}$ .

O eletrodo de FTO foi aqui utilizado para permitir a caracterização dos filmes de PPI-2-COOH por espectroscopia no UV-VIS *in-situ*. A necessidade de se realizar estas medidas em eletrodos transparentes é devido ao fato de o espectrofotômetro disponível nos nossos laboratórios aceitar apenas medidas no modo de transmitância. Foram preparados filmes após diferentes números de ciclos finais (cargas totais finais), ou seja, com diferentes espessuras (1, 3, 5 e 8 ciclos).

# 3.1.4 ELETROSSÍNTESE DO FILMES DE PPI-2-COOH SEM A PRESENÇA DE ÁGUA E EM ELETRODOS MINIATURIZADOS

Para a eletrossíntese do filme de PPI-2-COOH foram fixados três eletrodos miniaturizados de uma só vez no contato de trabalho com o objetivo de economizar solução e aumentar a área do eletrodo de trabalho. A Figura 34 mostra os voltamogramas cíclicos durante a eletrossíntese do filme de PPI-2-COOH simultaneamente sobre os três eletrodos miniaturizados em uma solução contendo PI-2-COOH 0,1mol L<sup>-1</sup> e TMABF<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> em ACN tratada.

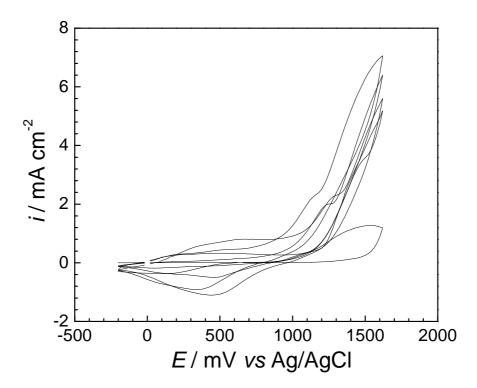


Figura 34. Voltamogramas cíclicos de um eletrodo miniaturizado em meio de PI-2-COOH 0,1mol L<sup>-1</sup> e TMABF<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> em ACN sem a adição de água; v = 50 mV s<sup>-1</sup>.

Devido o tamanho dos eletrodos usados, as curvas apresentadas no gráfico da Figura 34 mostraram um aumento mais rápido da densidade de corrente em função do número dos ciclos do que a da Figura 31. Esta variação se deve à

adsorção mais efetiva dos monômeros na interface mais ao centro dos eletrodos e que caracteriza também uma maior facilidade para que os dímeros e oligômeros saiam da região de interface do eletrodo, ou seja, há uma saturação de oligômeros em um menor tempo do que o visto em um macroeletrodo. Também é possível visualizar, como na Figura 31 (B), um par redox largo definido em 0,7 e 0,45 V para os processos anodico e catódico, respectivamente. Com estes resultados, é possível saber se há uma sobreposição de dois processos redox como na Figura 33. Porém, é difícil a localização do máximo destes processos. A Figura 34, como nas outras respostas de eletrossínteses sem a presença de água, mostra uma típica resposta de um polímero eletroativo depositado sobre a superfície de um eletrodo.

#### 3.2 RESPOSTAS VOLTAMÉTRICAS DOS FILMES DE PPI-2-COOH

Para a obtenção das respostas voltamétricas, foi usado um filme de PPI-2-COOH eletrossintetizado por VC em uma solução contendo PI-2-COOH 0,1mol L<sup>-1</sup> e TMABF<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> em ACN tratada e sem adição de água e em eletrodos da QCM. A Figura 35 mostra um voltamograma cíclico típico de resposta de filmes poliméricos e uma curva de variação de massa-potencial para um filme de PPI-2-COOH em uma solução de ACN com TBACIO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> na ausência do monômero. O intervalo de potencial selecionado para se obter a resposta eletroquímica do filme de PPI-2-COOH foi entre -0,5 a 0,9 V vs Ag/AgCl a 50 mV s<sup>-1</sup>. Este intervalo de potencial aplicado é similar ao usado para o preparo dos filmes de PPI. A resposta de corrente obtida na curva (a) da Figura 35 se mostrou estável nestas condições após 6 ciclos e evidenciou a baixa eletroatividade do filme polimérico. Seguindo o voltamograma cíclico junto à variação de massa em função do potencial aplicado (Curva (a) e (b)

da Figura 35), pode-se observar o transporte e entrada de ânions durante a oxidação no primeiro ciclo e uma grande entrada de cations durante a redução. Este processo se repete durante os ciclos sucessivos, até que seja atingido um equilíbrio no sexto ciclo. Assim, pode-se concluir que este filme tem uma preferência pelo transporte de cátions para dentro do filme.

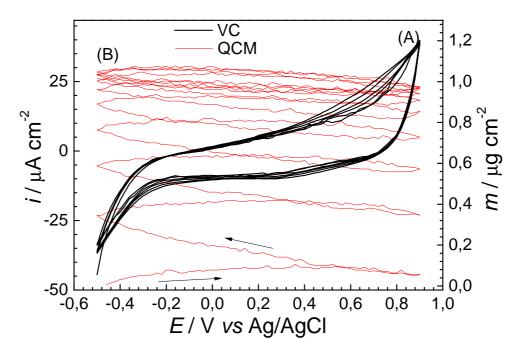


Figura 35. Resposta eletroquímica de um filme de PPI-2-COOH em uma solução de TMABF<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> em ACN sem a adição de água obtida simultaneamente com medidas de QCM.

A Figura 36 mostra de forma mais clara o processo de entrada e saída de íons durante o ciclo mais estável (após o 6º ciclo do voltamograma da Figura 35), onde é possível se verificar a presença de 4 regiões. Durante o processo de oxidação na região (A) (de -0,5 até 0,19 V), obtém-se um aumento de massa para o filme de PPI-2-COOH e que está relacionado ao transporte de ânions (BF<sub>4</sub>) para dentro do filme. Ao passar pelo potencial de -0,19 até 0,9 V, observa-se uma diminuição mais acentuada de ganho de massa (região B) devido à saída dos

cátions do filme (saída do (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>N<sup>+</sup>). Durante a inversão de varredura, no processo de redução, ocorre uma perda de massa na região (C) (de 0,9 até 0,64 V) devido a um efeito de saída do ânion para equilibrar o potencial na interface do eletrodo durante a redução. O filme torna a ganhar massa durante a redução na região (D) já que ocorre nova entrada de cátions.

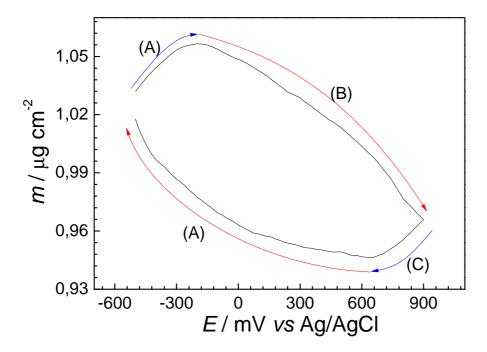


Figura 36. Variação de ganho de massa vs potencial aplicado para um filme de PPI-2-COOH em TMABF $_4$  em ACN, v = 50 mV s $^{-1}$ . O filme foi preparado em ACN por VC sem a adição de água.

Comparando com a resposta eletroquímica de um filme de PPI da literatura apresenta uma maior mobilidade para o transporte e a entrada de anions no filme<sup>36</sup> e não de cátions<sup>38</sup>. No caso do PPI-2-COOH, a sua resposta de EQCM mostrou claramente que a mobilidade para a entrada de cátions é maior do que de ânions e este resultado tem uma grande importância na área de biossensores, já que é possível utilizar concentrações mais elevadas de mediadores tais como azul de metileno, ferroceno ou hexacianoferrato<sup>7</sup> incorporados no filme polimérico

## 3.3 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DA EQCM DURANTE A ELETROSSÍNTESE DOS FILMES PPI-2-COOH

Neste item serão analisados mais detalhadamente os resultados obtidos por EQCM durante as eletrossínteses dos filmes de PPI-2-COOH conforme apresentados na Figura 31 e na Figura 32. Partindo da equação 14 do capítulo 2.3, podemos considerar a princípio que o transporte de solvente e de eletrólito para dentro do filme é zero. Assim, temos a equação simplificada:

$$nF\frac{\Delta m}{\Delta Q} = (x\%)(Mw - 2M_{H+}) \tag{19}$$

Por meio da equação 19 e tendo o valor de  $(M_w - 2M_{H+}) = 109,1$  g mol<sup>-1</sup>, podemos obter a relação linear do ganho de massa pela carga para os mecanismos de síntese que exigem 1, 2, 3 ou 4 elétrons. Desta maneira, conforme visto na Figura 37 e na Figura 38, podem ser obtidas as curvas para os processos envolvendo 1, 2, 3 e 4 elétrons e as curvas de variação de massa por variação da carga durante a eletrossíntese (Figura 31 e Figura 32).

A Figura 37 mostra a variação de massa *vs* variação de carga durante a eletrossíntese do filme de PPI-2-COOH na ausência de água e com TMABF<sub>4</sub> como eletrólito de suporte (Figura 31). A inclinação obtida (Δm/ΔQ) foi de (0,336 ±0,003) mg C<sup>-1</sup>, cujo o valor está entre as curvas teóricas para 3 e 4 elétrons. Baseado nos processos de eletrossíntese do PPI, em condições próximas às deste nosso trabalho, as reações de eletropolimerização do PPI exigem um elétron para a oxidação do monômero, dois elétrons para a etapa de propagação e a fração de carga entre 0,2 e 0,5 referente aos ânions inseridos durante a síntese por unidade polimérica<sup>69,70</sup>. Ao fazermos uma analogia com o mecanismo de eletropolimerização do PPI-2-COOH, podemos considerar a participação de dois elétrons durante a

etapa de propagação e um rendimento de 100 %, sem as inserções de íons. Neste caso, seria esperado uma curva com inclinação de  $\Delta m/\Delta Q$  de 0,565 mg C<sup>-1</sup>. Assim o rendimento da eletrossíntese por VC foi de (59,0  $\pm$  0,5) %.

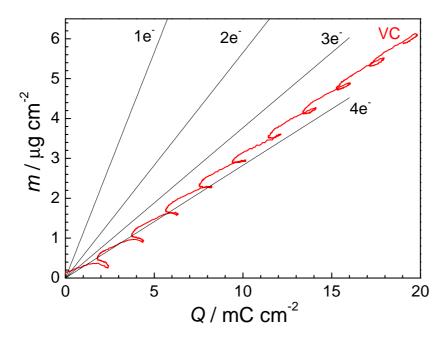


Figura 37. Variação de massa por variação da carga durante a eletrossíntese de um filme de PPI-2-COOH por VC em uma solução sem a adição de água com eletrólito de suporte de  $\mathsf{TMABF_4}$  e PI-2-COOH, com simulação da curva para rotas de eletrossíntese eletroquímica envolvendo 1, 2, 3 e 4 elétrons.

A Figura 38 mostra a dependência linear da variação de massa pela variação de carga eletroquímica da eletrossíntese do filme de PPI-2-COOH por CA na ausência de água e com TBABF<sub>4</sub> como eletrólito de suporte (Figura 32). A inclinação obtida ( $\Delta$ m/ $\Delta$ Q) foi de (0,305 ±0,003) mg C<sup>-1</sup>, cujo valor está entre as curvas teóricas para 3 e 4 elétrons, similarmente ao obtido na Figura 36. O valor do rendimento da eletropolimerização por CA obtido foi de (54,0 ± 0,5) %.

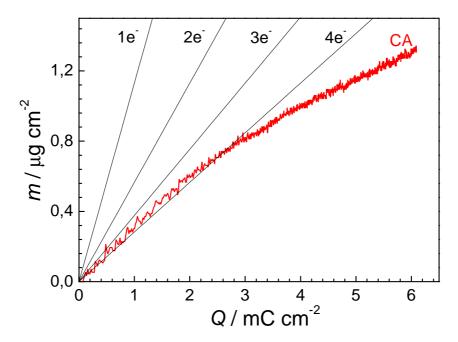


Figura 38. Variação de massa por variação da carga durante a eletrossíntese do filme de PPI-2-COOH por CA em uma solução sem a adição de água com eletrólito de suporte de TBABF<sub>4</sub> e PI-2-COOH com simulação da curva para rotas de eletrossíntese envolvendo 1, 2, 3 e 4 elétrons.

Os resultados de eficiência obtidos durante o início das curvas  $\Delta m$  vs  $\Delta Q$  nas eletropolimerizações por CV e CA em diferentes potenciais finais, eletrólitos de suporte e sem a adição de água, permitiu que verificássemos que o mecanismo de formação do PPI-2-COOH é igual nestes casos estudados. Entretanto, após o inicio do processo de eletropolimerização, a curva de  $\Delta m$  vs  $\Delta Q$  da Figura 36 mostra um aumento da inclinação após os 3 primeiros ciclos e da Figura 37, uma diminuição após 2 s. Esta diferença de variação de inclinação da curva  $\Delta m$  vs  $\Delta Q$  está relacionada à necessidade de transporte e entrada de cátions no polímero na eletrossíntese. Conforme verificamos, a técnica de VC é mais eficaz quando se deseja obter uma maior espessura para os filmes de PPI-2-COOH.

#### 3.4 MECANISMO DE ELETROPOLIMERIZAÇÃO DO PI-2-COOH

O mecanismo sugerido para a eletropolimerização do PI-2-COOH aqui proposto se baseou em parte nas propostas de mecanismo de eletropolimerização do pirrol<sup>38,70,71</sup>, sendo o principal o mecanismo de Reynold<sup>69</sup>.

Inicialmente, para se entender a necessidade de usar acetonitrila tratada sem a adição de água, deve-se entender os efeitos que a presença de água causa no monômero antes e durante a aplicação de determinado potencial. No inicio da eletropolimerização, o monômero em presença de cátions (neste caso (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>N+ ou (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>4</sub>N+) e água terá uma fração do grupo carboxílico dissociado em H<sup>+</sup> e –COO<sup>-72</sup>. No entanto, em acetonitrila sem umidade não ocorre esta dissociação. Durante aplicação de certo potencial, sabemos que a água tem uma janela de potencial estreita (1,29 V vs SHE) regida pela equação estequiométrica<sup>73,74</sup>:

$$\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2O \quad , (20)$$

Desta forma, durante o processo anódico para a oxidação do monômero (PI-2-COOH), será ultrapassada a janela de oxidação da água, ocorrendo a hidrólise da água e a superoxidação dos anéis heterocíclicos de espécies oligoméricas ou de um filme já depositado na superfície do eletrodo. Assim, ocorre a interrupção na etapa de propagação da eletrossíntese e criam-se defeitos de conjugação do polímero que comprometem a eletroatividade do filme e promovem o bloqueio da superfície do eletrodo.

Em ACN sem a presença de água, propomos um mecanismo de eletropolimerização do PI-2-COOH separado em dois processos, o primeiro referente à etapa de iniciação e o segundo, referente à etapa de propagação.

Inicialmente, no primeiro processo, o monômero é oxidado formando um cátion radical (Figura 39) que, segundo o mecanismo de Reynold, sofre acoplamento com outro cátion radical (Figura 39).

Figura 39. Etapas de oxidação do PI-2-COOH e iniciação da polimerização até a obtenção de dímeros.

Conforme as etapas da Figura 38, o acoplamento dos dois anéis heterocíclicos ocorre preferencialmente na posição 5,5 do anel e isto se deve à estabilidade do anel de pirrol nesta posição. Este tipo de acoplamento preferencial pode ser confirmado pela obtenção do calor de formação do dímero nas possíveis posições de acoplamento do anel heterocíclico do PI-2-COOH. Como descrito no item 2.5, modelagem molecular, foram usados os métodos e as rotinas MNDO/BFGS/RHF/PULAY na otimização da geometria molecular quando foram

obtidos a energia total e o calor de formação das moléculas em cada posição possível de acoplamento entre os anéis heterocíclicos (Tabela 1).

Tabela 1 – Energia total para a formação do dímero a partir do PI-2-COOH em diversas posições de acoplamento e diferença entre a menor energia encontrada com as demais energias em ordem crescente.

Posição de ligação entre os anéis de PI-2-COOH	<i>Energia Total</i> Kcal mol <sup>-1</sup>	<i>Difer. entre as energias</i> Kcal mol <sup>-1</sup>
54	-71362,50924	0
45	-71362,48664	0,0226
55	-71362,13174	0,3775
44	-71361,55499	0,95425
53	-71360,22693	2,28231
35	-71360,08534	2,4239
34	-71359,72121	2,78803
43	-71359,68731	2,82193
33	-71357,48871	5,02053

A Tabela 1 foi classificada por ordem crescente de energia total de formação e calculada a diferença da menor energia (posição 5,4) para as demais posições. Esta sequencia também classificou em ordem decrescente as posições preferenciais de acoplamento entre as moléculas, sendo a posição preferencial 5,4 e a segunda mais favorável 5,5.

Após a formação do dímero, foi necessário calcular em seqüência a propagação da polimerização. O dímero com o grupo ácido carboxílico nas extremidades e ligados nas posições preferenciais 5,4 e 5,5, apresenta uma forma ressonante entre os anéis heterocíclicos, desta forma, pode-se sugerir que o acoplamento na propagação será preferencial nas posições 4 ou 5. Assim, seguindo a propagação da polimerização, foi otimizada a geometria do trímero partindo do dímero já formado nas posições 5,5, 4,5 e 5,4 (Tabela 2).

Tabela 2 - Energia total para a formação do trímero a partir do dímero e PI-2-COOH em diversas posições de acoplamento e diferença entre a menor energia encontrada com as demais energias em ordem crescente.

Posição de ligação entre os anéis de PPI-2-COOH	<i>Energia Total</i> Kcal mol <sup>-1</sup>	<i>Difer. entre as energias</i> Kcal mol <sup>-1</sup>
45-45	-106717,65786	0
54-54	-106717,46692	0,19094
45-44	-106716,28944	1,36842
55-45	-106716,20181	1,45605
45-35	-106715,66657	1,99129
54-53	-106715,48324	2,17462
45-34	-106715,45718	2,20068
54-55	-106715,44242	2,21544
55-44	-106715,39699	2,26087
55-35	-106714,96507	2,69279
54-34	-106714,50916	3,1487
55-34	-106713,96239	3,69547
55-43	-106713,89136	3,7665
45-33	-106713,75231	3,90555
54-35	-106713,53669	4,12117
54-33	-106713,02613	4,63173
55-33	-106712,79321	4,86465
45-43	-106712,73095	4,92691

A Tabela 2 confirma a preferência de acoplamento do monômero na posição 4 e 5 do segundo anel heterocíclico do dimero acoplado em 4,5 e 5,5. A propagação da polimerização ocorre pela oxidação do dímero e do monômero envolvendo dois elétrons e depois, a saída de 2H<sup>+</sup>, obtendo-se o trimero. Esta propagação se aproxima do mecanismo proposto para o PPI, diferenciando-se apenas pela posição preferencial de acoplamento entre os anéis, como mostra a Figura 40.

Com a posição preferencial de acoplamento na posição 4,5, tanto para a formação do dimero quanto do trimero, encerra-se a propagação da polimerização, Figura 40, formando um polímero conjugado, de tal forma que os acoplamentos com menor chance de ocorrer (no 3º carbono do anel heterocíclico) provocará defeitos de quebra de conjugação na cadeia polimérica.

Figura 40. Formação de radicais cations através da oxidação do monômero e do dímero do PI-2-COOH e propagação de polimerização até obtenção do polímero.

# 3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE PPI-2-COOH POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO

Neste item foram feitos as medidas de FTIR para os filmes de PPI-2-COOH obtidos nos itens 3.1.1 e 3.1.2.

A Figura 41 (a) mostra o espectro de FTIR no modo de refletância para um filme de PPI-2-COOH, eletropolimerizado por VC, em uma solução de TMABF<sub>4</sub> (0,1 mol L<sup>-1</sup>), PI-2-COOH (0,1 mol L<sup>-1</sup>) em ACN tratada e sem a adição de água. Em particular, para este filme feito em ACN seca e com TMABF<sub>4</sub>, o espectro na região

do infravermelho mostra um sinal forte e estreito nas regiões de 2963 e 2877 cm<sup>-1</sup> devido ao estiramento assimétrico e simétrico do grupo –CH<sub>3</sub> pertencente ao íon (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>N<sup>+</sup> do eletrólito de suporte (TMABF<sub>4</sub>) adsorvido no filme de PPI-2-COOH. Similarmente, o estiramento assimétrico do grupo –CH<sub>2</sub> do eletrólito aparece na região de 2937 cm<sup>-1</sup>.

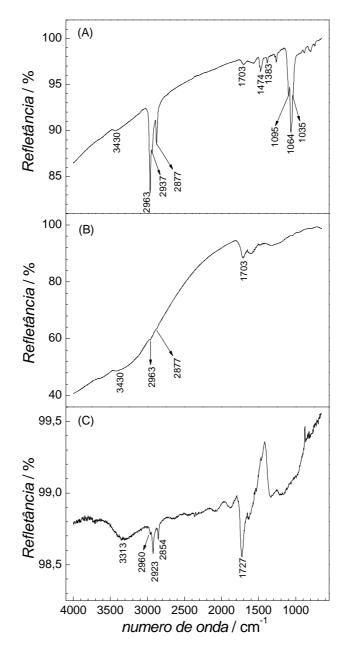


Figura 41. FTIR dos filmes de PPI-2-COOH eletrossintetizados por: (a) VC na solução de ACN contendo PI-2-COOH, TMABF<sub>4</sub> e sem adição de água. (b) CA na solução de ACN contendo PI-2-COOH, TBABF<sub>4</sub> e sem a adição de água e (c) VC na solução de ACN contendo PI-2-COOH, TMABF<sub>4</sub> e com a adição de água.

Também se observou na Figura 41 (a) dois sinais fracos e estreitos em 1474 cm<sup>-1</sup> e 1383 cm<sup>-1</sup> referentes à deformação vibracional assimétrica e simétrica do grupo -CH<sub>3</sub> presente no íon (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>N<sup>+</sup> do eletrólito de suporte. Outro sinal forte e estreito foi observado em 1095, 1064 e 1035 cm<sup>-1</sup>, que pode ser atribuído ao estiramento do ânion BF<sub>4</sub> adsorvido no filme de PPI-2-COOH durante o processo de eletrossíntese. A Figura 41 (b) mostra o espectro de FTIR no modo de refletância para um filme de PPI-2-COOH, eletropolimerizado por CA, em uma solução de TBABF<sub>4</sub> (0,1 mol L<sup>-1</sup>), PI-2-COOH (0,1 mol L<sup>-1</sup>) em ACN tratada e sem a adição de água. A Figura 41 (b) mostra um sinal fraco e estreito em 2963 e 2988 cm<sup>-1</sup> devido a um estiramento assimétrico e simétrico do grupo -CH<sub>3</sub>, como visto na Figura 41 (a), porém, este sinal é referente ao íon  $(C_4H_9)_4N^+$  do eletrólito de suporte (TBABF<sub>4</sub>). Na Figura 41 (b) não se observa o aparecimento do estiramento do ânion BF<sub>4</sub>, que está claramente presente na Figura 41 (a). Na Figura 41 (b) se observa que houve a entrada de cátions para os filmes eletrossintetizados pela técnica de CA. Este resultado de entrada preferencial de cátions no filme de PPI-2-COOH coincide com os resultados obtidos nas medidas com a EQCM. Nos espectros de FTIR dos filmes preparados por VC e CA, sem a adição de água, (Figura 41 (a) e (b)), observa-se um sinal largo e fraco centrado em torno de 3430 cm<sup>-1</sup>, devido à vibração do grupo N-H de uma amina secundária presente nos filmes de PPI<sup>40,75</sup>. Similarmente, o sinal de média intensidade em 1703 cm<sup>-1</sup> na Figura 41 (a) e (b) pode ser atribuído ao estiramento do grupo C=O do ácido carboxílico do PI-2-COOH40,41. A Figura 41 (c) mostra o espectro de FTIR para um filme de PPI-2-COOH, preparado por VC em uma solução de TMABF<sub>4</sub> (0,1 mol L<sup>-1</sup>), PI-2-COOH (0,1 mol L<sup>-1</sup>) em ACN com a adição de 1% de água. Na Figura 41 (c) observa-se também o pico referente ao estiramento do grupo C=O com uma maior intensidade e deslocado se comparamos

com o visto nos demais espectros (Figura 41 (a) e (b)). Assim, o pico centrado em 1727 cm<sup>-1</sup> é devido à presença do grupo C=O no anel heterocíclico superoxidado, como citado em trabalhos sobre superoxidação de filmes de PPI<sup>40,74,76</sup>. Outras mudanças significativas na Figura 41 (c) foram: mudança do sinal fraco e largo de 3430 cm<sup>-1</sup> para 3313 cm<sup>-1</sup>, referente à vibração do N-H de uma amina secundária presente em filmes de PPI, e mudanças dos sinais fortes e estreitos de 2963, 2937e 2877 cm<sup>-1</sup> para 2960, 2923 e 2854 cm<sup>-1</sup>, respectivamente, das regiões referentes aos modos vibracionais do íon (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>N<sup>+</sup> inserido no filme de PPI-2-COOH durante o processo de eletrossíntese.

### 3.6 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE PPI-2-COOH POR UV-VIS in-situ

A investigação sobre as propriedades elétricas e ópticas dos polímeros condutores combinando métodos eletroquímicos e técnicas espectroscópicas permitem o estudo *in-situ* dos processos ocorridos durante a dopagem e desdopagem do material.

Inicialmente, foram preparados vários filmes de PPI-2-COOH após 1, 3, 5 e 8 ciclos (tem 3.1.3). Comparando os espectros de UV-VIS dos filmes com 4 espessuras diferentes, verificou-se que o filme de menor espessura (1 ciclo) possui bandas de absorção mais bem definidas (Figura 42). A desconvolução do espectro em gaussianas possibilitou definir a quantidade e as regiões corretas para as transições eletrônicas do filme de PPI-2-COOH que foram: 340, 370, 410, 475, 555, 670 e 835 nm. Os picos mais definidos observados nos espectros de UV-VIS para o filme menos espesso é possivelmente uma consequência de uma menor variação do tamanho das cadeias poliméricas (menor polidispersividade). Com aumento da

espessura do filme é facilmente percebido a diminuição da cadeia polimérica quando se compara os espectros de absorção dos polímeros de espessura diferentes (Figura 43).

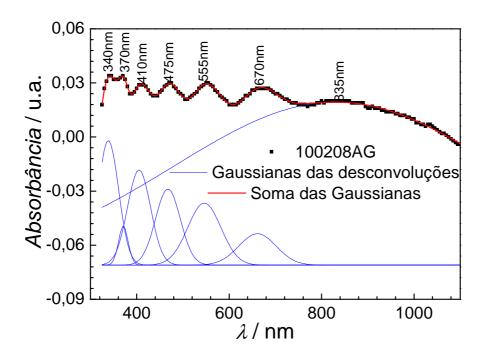


Figura 42. Espectro de absorção UV-VIS para o filme de PPI-2-COOH de 1 ciclo, preparado sobre eletrodos de FTO.

As absorções das regiões 340, 370, 410 e 475 nm observadas na Figura 43 não sofrem mudanças em função da variação da espessura do filme de PPI-2-COOH, já nas regiões de 555, 670 e 835 nm é possível se observar o deslocamento das bandas para menores comprimentos de onda (maior energia), com o aumento da espessura dos filmes. Esta variação confirma a diminuição na cadeia polimérica e, conseqüentemente, a diminuição do tamanho da conjugação do polímero condutor.

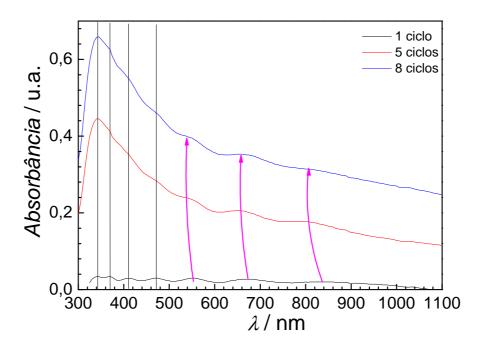


Figura 43. Espectros de absorção no UV-VIS para o filme de PPI-2-COOH de 1, 5 e 8 ciclos, eletrossintetizados sobre eletrodos de FTO.

Foram feitas também medidas no UV-VIS *in-situ* com variações de potencial de -0,6 até 1,6 V vs Ag/AgCl para um filme de PPI-2-COOH obtido por CA e em tempo de estabilização por 1 min antes de iniciar a aquisição do espectro. Os espectros obtidos foram feitos para filmes obtidos após 1, 3, 5 e 8 ciclos. O resultado mais satisfatório encontrado foi para o filme de PPI-2-COOH obtido após 3 ciclos, já que os espectros deste filme apresentaram uma boa variação em função da dopagem permitindo fazer a desconvolução das curvas.

A Figura 44 mostra o espectro de UV-VIS *in-situ* do filme de PPI-2-COOH obtido após 3 ciclos em uma variação do potencial de -0,6 até 0,8 V *vs* Ag/AgCI. Pode-se observar neste espectro uma clara mudança das bandas em função do estado de oxidação do filme. Em 1,0 V inicia-se a queda das bandas de absorção na região de 835 nm, com os demais picos seguindo o comportamento inicial (entre -0,6 até 0,8 V). A partir de 1,0 V, ocorre a diminuição de todas as bandas do espectro. Ao

retornar do potencial de 1,6 para +0,4 V, percebe-se que o filme passa a apresentar modificações estruturais, já que ele não retornou para o mesmo estado oxidativo neste potencial. Para o espectro a +0,4 V sobre o filme que atingiu o valor de potencial acima +1,0 V (filme superoxidado), os pontos de máximos, que ocorrem nas regiões de 469 e 748nm, deslocaram-se para 449 e 739 nm, respectivamente. O deslocamento destas bandas para regiões de menor comprimento de onda (maior energia) é devido à superoxidação sofrida pelo filme e que causa um aumento de defeitos na conjugação do polímero e uma diminuição do tamanho da conjugação.

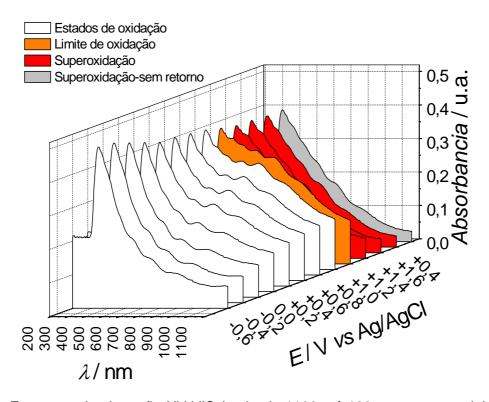


Figura 44. Espectros de absorção UV-VIS *in-situ* de 1100 até 190 nm em potenciais de -0,6 até 1,6 V vs Ag/AgCl para um filme de PPI-2-COOH obtidos após 3 ciclos sobre eletrodos de FTO.

Quando se acompanha a evolução de cada banda de absorção em função do potencial aplicado (Figura 45), nota-se que o filme de PPI-2-COOH apresenta duas transições para a banda do  $\pi \to \pi^*$ , ou seja, aproxima-se das transições

presentes no filme de PPI para baixos e altos níveis de dopagem. Para um baixo nível de dopagem, o filme de PPI apresenta a transição eletrônicas  $\pi \to \pi^*$  em 3,2 eV , de forma semelhante ao observado para o filme de PPI-2-COOH, que apresenta uma transição em 3,35 eV (370 nm). De certo modo, a presença do ácido carboxílico ligado ao anel heterocíclico para o PPI-2-COOH possibilita o aprecimento de regiões da cadeia polimérica com conformações próximas às do filme de PPI com um alto nível de dopante e de tal forma que o espectro de absorção também apresenta a transição eletrônica  $\pi \to \pi^*$  na região de 3,65 eV (340 nm) devido às mudanças conformacionais da molécula, alargando assim a  $E_{GAP}$ .

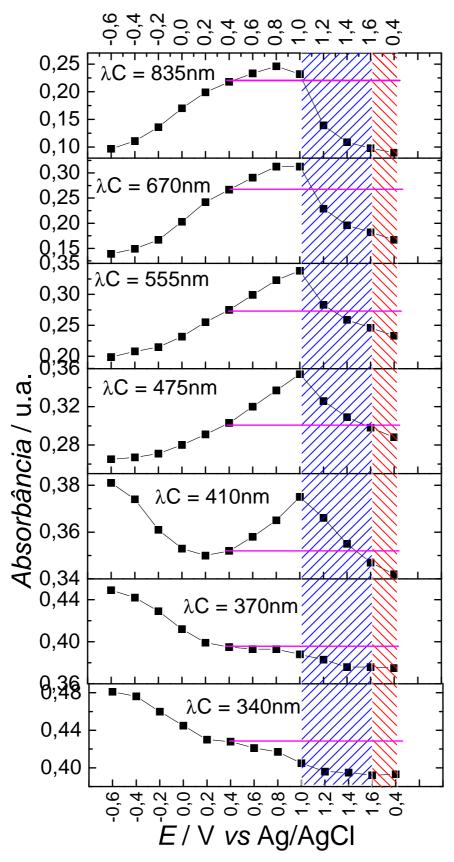


Figura 45. Evolução das regiões de absorção do espectro de UV-VIS *in-situ* em função do potencial aplicado sobre o filme de PPI-2-COOH.

Com a simulação conformacional de uma molécula com 16 anéis de PI-2-COOH ligados na posição 4,5, e gerados pelo cálculo de mínima energia pelo método MM2, é possível propor que, para cada par de anéis heterocíclicos, ocorre uma torção no plano formado entre os anéis, e que de certo modo esta simulação confirma os resultados obtidos, com as transições eletrônicas  $\pi \to \pi^*$  para duas conformações diferentes.

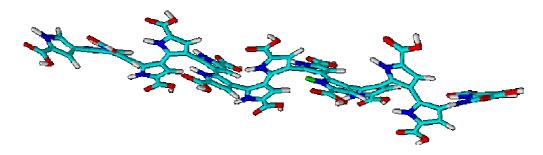


Figura 46. Molécula gerada pelo cálculo de mínima energia pelo método MM2 para oligômero de 16 anéis de PI-2-COOH ligados na posição 4,5.

Na Figura 45 podem ser observadas as evoluções das bandas de absorção em 835 e 670 nm (1,49 e 1,85 eV) em função dos potenciais aplicados. Neste caso, pode-se afirmar que estas bandas são referentes à formação de polarons na cadeia polimérica, que se caracteriza por um rápido aumento na absorção em potenciais relativamente baixos (-0,4 V neste caso). Ao atingir potenciais acima de 0,8 V as absorções em 670 e 835 nm se estabilizam ou diminuem de intensidade. As regiões no espectro de absorção que caracteriza a formação de polarons para os filmes de PPI-2-COOH também apresentam valores próximos aos encontrados em trabalhos sobre PPI<sup>46,47,77</sup>. Na recombinação de polarons tem-se a formação de bipolarons, que serão termodinamicamente mais estáveis para este estado de dopagem. Em comprimentos de onda de 475 e 555 nm, na Figura 45, observa-se o aumento da formação de bipolarons na cadeia polimérica do PPI2COOH em função da

dopagem. As características marcantes da curva na formação de bipolarons se devem ao aumento da intensidade da absorção até o limite onde ocorre a degradação o filme polimérico.

#### 3.7 MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMATICA DA PFO

Um valor de atividade enzimática foi obtido no rótulo do frasco da polifenol oxidase (PFO) comercial. Porém, foi necessário saber a atividade real desta enzima no momento de uso no processo de imobilização e de obtenção de resposta do biossensor, já que esta decresce em função do tempo de estocagem. A atividade da PFO foi determinada medindo-se a variação de absorbância (λ = 410 nm) da quinona formada na reação enzimática. Para isto, foram preparadas duas soluções em temperatura ambiente (25 °C): uma solução de tampão fosfato em pH 6,5 (0,05 mol L-1) contendo 5 mg ml-1 de enzima e a outra, contendo o mesmo tampão fosfato, porém, com pirocatecol a 0,1 mol L-1.

Com auxilio do espectrofotômetro ajustado para medida de absorção em um único comprimento de onda (410 nm) em função do tempo, foram adicionadas ao equipamento duas cubetas com 2,95 mL de solução tampão fosfato contendo o pirocatecol no feixe de luz de referência e de trabalho e assim foi realizada a medida de linha de base. Para se realizar a medida de atividade foi adicionada 0,05 mL da solução contendo a PFO, que foi rapidamente agitada e colocada no espectrofotômetro para se realizar a medida de absorção em função do tempo (Figura 47).

Como se sabe que uma unidade de enzima ativa (unidades mL<sup>-1</sup>) gera um aumento de 0,001 unidades de absorbância por min nas condições

mencionadas<sup>6,8,78</sup>, foi encontrada a atividade média de 7360±700 U mL<sup>-1</sup> de PFO na solução, ou seja, 1472±140 U mg<sup>-1</sup> de enzima purificada.

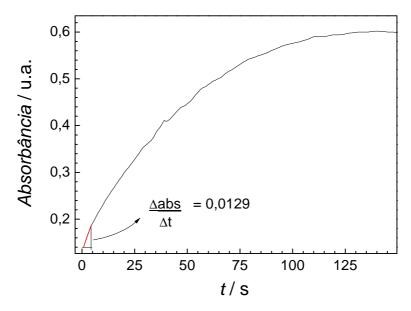


Figura 47. Medida de absorção em 410 nm referente à formação da quinona promovida pela oxidação da PFO.

### 3.8 IMOBILIZAÇÃO DA PFO SOBRE FILMES DE PPI-2-COOH

A imobilização da PFO sobre o filme de PPI-2-COOH foi realizada por meio de ligações covalentes entre o ácido carboxílico e os grupos aminas primários presentes nas enzimas. O método mais simples para se ativar o ácido carboxílico, presente no filme, é por imersão deste filme em uma solução contendo N-(3-Dimetilaminopropil)-N-etil-carbodiimida (EDC). O EDC ligado ao grupo carboxílico do polímero é facilmente substituído pela ligação da enzima pelo grupo amina primária, como pode ser visto na Figura 48 (processo (a)). Quando se usa apenas o EDC, ao imergir o filme polimérico com o ácido carboxílico ativado na solução tampão contendo a enzima desejada, este ácido carboxílico pode retornar ao seu estado

inicial, como mostra a Figura 48 (processo (b)), sendo esta uma rota indesejada de imobilização de enzima.

Figura 48. Rotas possíveis para imobilização enzimática com ativação do ácido carboxílico.

Para evitar o processo (b) da Figura 48, foi preparada uma solução de EDC (0,1 mol L-1) com 0,2 mol L-1 de pentafluorofenol (PFP) em etanol para a ativação do ácido carboxílico. Ao imergir o filme polimérico na solução contendo EDC e PFP durante 25 min, o EDC se ligou ao ácido carboxílico que foi rapidamente substituído pelo PFP, resultando em uma molécula mais estável em tampão fosfato com pH próximo de 7 (processo (c) da Figura 48). Após os 25 min de imersão, o filme foi lavado com etanol e seco com jato de N<sub>2</sub>. Este filme com o ácido carboxílico ativado foi imerso durante 20 min em uma solução tampão fosfato em pH de 6,5 contendo 5 mg ml-1 de PFP. O PFP ligado ao ácido carboxílico é facilmente substituído pela enzima por meio da ligação entre o grupo amina primária e o ácido carboxílico, restando assim a enzima imobilizada ao polímero por meio de uma ligação covalente<sup>79</sup>. Com este procedimento, a PFO foi imobilizada no PPI-2-COOH depositado em eletrodos miniaturizados.

### 3.9 IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL DE TRABALHO DO BIOSSENSOR

Para um biossensor amperométrico, é necessária a identificação do melhor potencial de trabalho para se obter a resposta amperométrica do biossensor em função da concentração de analito. Para tanto, foi feita a CV do biossensor construído sobre os eletrodos miniaturizados tendo a PFO imobilizada por ligações covalentes no filme de PPI-2-COOH.

O voltamograma cíclico foi realizado no sistema de FIA descrito no item 2.2.1.4 (cela eletroquímica IV), porém, com a solução em estado estacionário. Inicialmente, circulou-se uma solução tampão fosfato (0,05 mol L-1 com pH 6,5) até tornar-se cheio por completo o sistema de FIA. Depois disto, o fluxo de solução foi interrompido e obteve o voltamograma cíclico de -0,3 até 0,5 V (voltamograma cíclico de referência). A solução tampão fosfato contendo 0,1 mol L-1 de pirocatecol foi circulada no sistema até se trocar por total a solução. O fluxo foi interrompido novamente e obteve-se novamente um novo voltamograma no mesmo intervalo de potencial da resposta de referência. Estes experimentos possibilitaram a obtenção das respostas voltamétricas do biossensor com e sem o analito (Figura 49). A Figura 49 mostra a diferença da resposta de corrente do biossensor com e sem a presença do pirocatecol. Durante a varredura catódica, não foram observadas variações marcantes de corrente entre as curvas obtidas com e sem a presença de pirocatecol. Para um potencial anódico, a biocatálise promovida pela enzima sobre o eletrodo possibilitou a diminuição de 0,1 V do inicio da oxidação do pirocatecol, sugerindo ser este o potencial onde há uma maior propensão para o aparecimento da resposta amperométrica do biossensor.

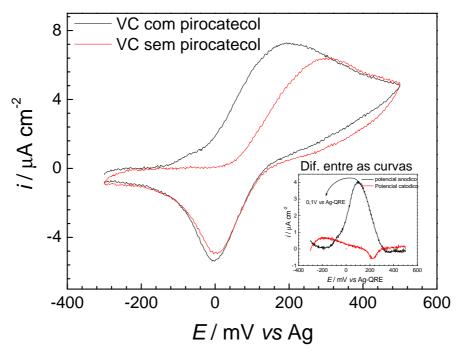


Figura 49. Resposta voltamétrica do biossensor miniaturizado em solução tampão fosfato de pH 6,5 sem e com adição de 0,1 mol L<sup>-1</sup> de pirocatecol.

Como mostra a Figura 49 foi realizada a subtração entre as curvas com e sem pirocatecol nas regiões anódicas e catódicas. As curvas catódicas não apresentaram grandes mudanças, mas para as curvas anódicas, foi obtido um pico intenso centrado em 0,1 V vs Ag/QRE. Este valor encontrado está dentro da região de trabalho mais apropriada para se obter a resposta cronoamperométrica do biossensor à base de PPI-2-COOH/PFO.

### 3.10 IDENTIFICAÇÃO DO pH DE TRABALHO DO BIOSSENSOR

A oxidação de tirosina em solução tampão fosfato realizada pela catalise promovida pela PFO tem o seu pH ótimo em 6,5. Os autores Vieira et al.<sup>8</sup> encontraram para extrato bruto enzimático da batata doce contendo PFO um valor

do pH ótimo centrado em 7,0 em uma solução tampão fosfato com catecol. Esse valor pode variar ligeiramente em função do tamanho e da quantidade de proteínas ligadas à enzima. Ao imobilizar a enzima em um filme polimérico e imergi-lo em uma solução, haverá o aparecimento de cargas na interface do polímero/solução e de ligeiras modificações na conformação do centro ativo enzimático, modificando assim a região de pH ótimo para resposta da enzima.

Para a determinação do pH ótimo do sistema PPI-2-COOH/PFO foi obtida a sua resposta amperométrica pela técnica de CA no potencial de trabalho do biossensor determinado no item anterior (E = 0,1V vs Ag-QRE). No sistema de FIA foram injetadas soluções tampão fosfato com pH variando de 6,5 até 11,08 com injeção de soluções de concentração fixa de pirocatecol (10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>) para cada pH.

A Figura 50 mostra um grande deslocamento do pH ótimo para regiões mais alcalinas. O biossensor à base de PPI-2-COOH/PFO tem uma grande quantidade disponível de dopantes (cátions e anions adsorvidos durante a síntese). A afinidade com cátions do PPI-2-COOH promove um acumulo de cargas interfaciais (H<sup>+</sup>) e muda a conformação do centro ativo da enzima e acarreta em uma diminuição da velocidade de biocatalise promovida pela enzima. Para minimizar os efeitos interfaciais (acumulo de H<sup>+</sup>), o pH alcalino promove uma diminuição na quantidade de H<sup>+</sup> na interface do filme e que possibilita o retorno da atividade da enzima. Os resultados de resposta de corrente em pH 9 ou 10 são 15 vezes mais intensos do que no pH ótimo da enzima livre (pH 6,5).

O equilíbrio das cargas interfaciais também foi discutido por outros autores e trabalhos<sup>80,81</sup>. Os autores Arslan et al.<sup>72</sup> obtiveram um pH ótimo em 9 para um biossensor de PFO imobilizada em filmes de PPI funcionalizado com polidimetilsiloxano, com uma resposta de corrente 80% maior do que no pH ótimo da

enzima livre. Também foram discutidos pelos autores Dejeu et al.<sup>73</sup> a relação de acumulo de um determinado íon ou carga dentro de um filme, feito por *layer by layer* (LBL). A solução na interface do filme terá um pH diferente da solução afastada do eletrodo, causando assim defeitos durante o crescimento de bicamadas por LBL. Assim, estes trabalhos complementam a idéia da necessidade do biossensor de PFO imobilizada sobre o filme de PPI-2-COOH ter o seu pH ótimo deslocado para regiões mais alcalinas.

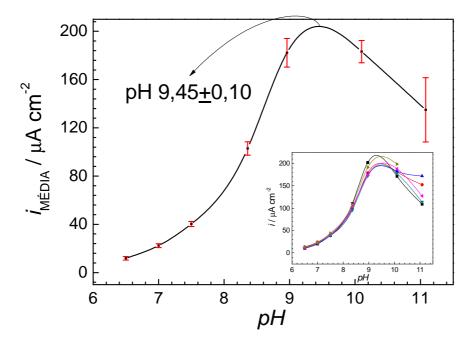


Figura 50. Resposta amperométrica com variação do pH em solução tampão fosfato para um biossensor à base de PFO imobilizada sobre um filme de PPI-2-COOH com injeções de fixas de pirocatecol  $(10^{-3} \text{ mol L}^{-1})$ .

## 3.11 OBTENÇÃO DA TEMPERATURA DE TRABALHO DO BIOSSENSOR

Para a determinação da temperatura ótima de trabalho, foi obtida a resposta amperométrica do biossensor de PFO imobilizada em um filme de PPI-2-COOH pela técnica de CA no potencial de trabalho de 0,1V vs Ag-QRE, com um fluxo de

solução tampão (pH de 9,2) no sistema de FIA e com injeções fixas de pirocatecol (10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup>) para cada temperatura.

A Figura 51 mostra a resposta amperométrica do biossensor em função da temperatura. Observa-se que, com aumento da temperatura, a energia térmica dada ao sistema aumenta a velocidade da biocatálise promovida pela enzima imobilizada. O aumento da cinética da biocatalise é devido à energia de ativação de uma reação química em relação à temperatura. Quanto maior a temperatura, maior será a quantidade de moléculas com energia próxima à energia de ativação, acelerando a velocidade de reação, porém, a temperatura será limitada pela degeneração da enzima. A forma de imobilizar uma enzima poderá expor mais ou menos o seu centro ativo para a solução, de tal forma que a agitação térmica promovida pela variação da temperatura poderá favorecer ou não a exposição deste centro ativo, variando assim a cinética de resposta. Outro fator importante no sistema de FIA proposto é a desnaturação das proteínas após certa temperatura, que é dada pela queda na resposta de corrente após uma determinada temperatura. Os autores Arslan et al.80 obtiveram temperatura ótima de 60 °C para a PFO imobilizada em filme de PPI funcionalizado com polidimetilsiloxano, com uma queda de atividade promovida pela desnaturação das proteínas enzimáticas após esta temperatura. Também se discutiu brevemente que a presença do polidimetilsiloxano permite uma maior atividade enzimática e estabilidade em temperaturas mais altas. Podemos verificar na Figura 51 que a resposta amperométrica do biossensor PPI-2-COOH/PFO tem um comportamento semelhante ao dos trabalhos dos autores citados, porém, será necessária a construção de outro sistema de FIA para se comprovar estes resultados e para se obter a real temperatura ótima deste biossensor.

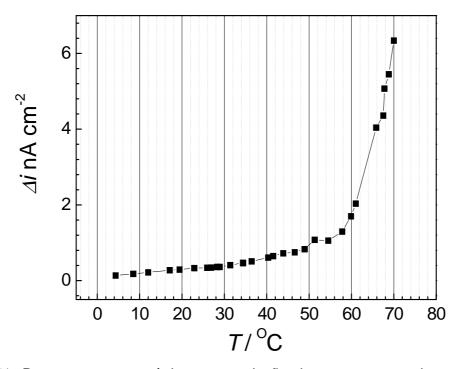


Figura 51. Resposta amperométrica com variação da temperatura sobre o biossensor a base de PFO imobilizada sobre filme de PPI-2-COOH com injeções de fixas de pirocatecol (10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup>) e pH de 9,2.

O sistema de FIA construído apresentou diversos problemas durante a variação de temperatura, sendo os principais:

- Utilização de um termômetro com escala máxima em 70°C.
- Diferença de dilatação térmica entre os materiais usados causou vazamentos durante as medidas.
- Ruídos nas medidas provocados pela proximidade do motor elétrico presente na bomba de água do banho térmico.

Como seria impossível construir outro sistema a tempo de finalizar esse trabalho, não foi possível se determinar a temperatura ótima e nem acompanhar a estabilidade do sensor para cada temperatura, assim, no restante deste trabalho, foi usada a temperatura de 40 °C para se evitar a perda de atividade enzimática durante as medidas.

Na Figura 52 mostra uma proposta para se resolver os problemas do sistema de FIA usado neste trabalho.

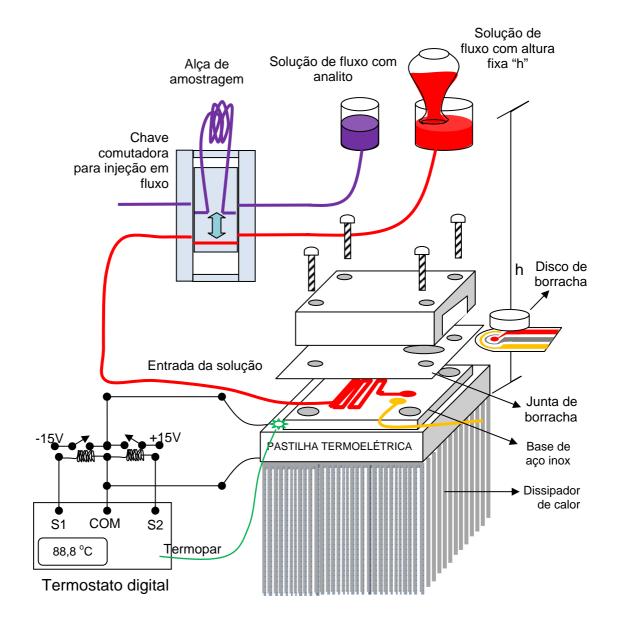


Figura 52. Esquema do sistema de FIA usando uma pastilha termoelétrica e um termostato digital.

A construção de um sistema FIA na superfície de uma pastilha termoelétrica (efeito Peltier) $^{82}$  possibilitaria a variação de temperatura do sistema em relação ao ambiente até  $\pm$  68°C $^{82}$ , o que permite realizar tanto o resfriamento quanto o

aquecimento do fluxo em medidas de variação de temperatura. Outra vantagem seria a fácil estabilização da temperatura com o auxilio de um termostato digital (exemplo: Termostato AutoPID Plus da Full Gauge). A utilização de uma base de aço inox com canais para fluir a solução até o eletrodo possibilitaria o uso de uma serpentina muito menor do que a usada no sistema de FIA deste trabalho, assim, haveria pouca interferência no fluxo causado pela dilatação do capilar.

## 3.12 IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL DE TRABALHO DEFINITIVO DO BIOSSENSOR

Pelo fato do biossensor PPI-2-COOH/PFO apresentar uma grande mudança do pH ótimo para regiões mais alcalinas, foi necessário obter novamente a resposta voltamétrica deste biossensor para se identificar o melhor potencial de trabalho neste pH ótimo.

Inicialmente, foi obtido o voltamograma cíclico do filme de PPI-2-COOH com e sem a PFO imobilizada e no sistema de FIA descrito no item 2.2.1.4 (cela eletroquímica IV), porém, com o fluxo da solução parada. Inicialmente, foi circulada uma solução tampão fosfato (0,05 mol L<sup>-1</sup> com pH 9.4) até encher por completo o sistema de FIA, após esta parte, foi interrompido o fluxo de solução e obtido o voltamograma cíclico de -0,5 até 0,5 V vs Ag/QRE (voltamograma cíclico de referência). Depois, escoou-se a solução tampão fosfato contendo 0,1 mol L<sup>-1</sup> de pirocatecol até ser trocada por total a solução do sistema. O fluxo da solução foi interrompido novamente e foi obtido o voltamograma cíclico para cada filme no mesmo potencial da resposta de referência.

A resposta eletroquímica do filme de PPI-2-COOH (Figura 53) apresentou um processo de oxidação do pirocatecol centrado em +245 mV vs Ag/QRE, com uma menor diferença entre as respostas eletroquímica em uma solução com e sem o pirocatecol localizada em +84 mV vs Ag/QRE. Para o processo catódico, o filme de PPI-2-COOH apresentou três processos de redução em +84, -84 e -497 mV vs Ag/QRE.

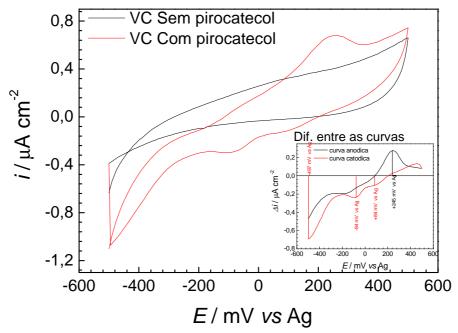


Figura 53. Resposta eletroquímica do filme de PPI-2-COOH em uma solução tampão fosfato pH9,2, com e sem adição de pirocatecol (10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>), de -0,5 até 0,5 V *vs* Ag/QRE, a 40°C e 50 mV s<sup>-1</sup>: (a) voltamograma cíclico e (b) diferença entre as curvas do voltamograma cíclico com e sem pirocatecol na solução.

Na resposta eletroquímica do biossensor (Figura 54) observa-se em sua região anódica a oxidação do pirocatecol em -67 mV, com o máximo entre as diferenças da curva com e sem a presença de pirocatecol na solução em +70 mV vs Ag/QRE. Ao se comparar os resultados obtidos, verificou-se que para o filme com a PFO imobilizada, ocorreu a oxidação de pirocatecol em um potencial onde não há diferenças entre a resposta do filme de PPI-2-COOH com e sem pirocatecol na

solução. Este potencial foi determinado como o potencial ótimo de trabalho para este biossensor com seletividade para pirocatecol, já que a presença da enzima sobre o filme de PPI-2-COOH é a responsável pela catálise do processo de oxidação do pirocatecol neste potencial (+70 mV vs Ag/QRE). Os demais processos presentes nas curvas anódica e catódica com a presença de pirocatecol, não podem ser definidos como processo unicamente catalisados pela enzima, já que nestes potenciais há também a resposta de corrente para o filme de PPI-2-COOH sem a enzima imobilizada.

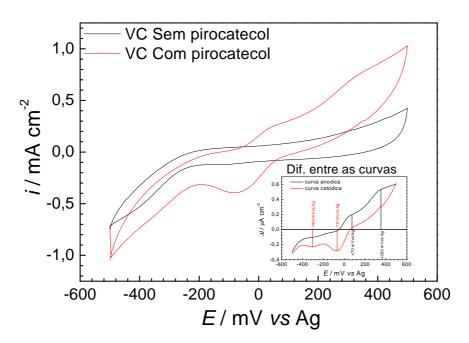


Figura 54. Resposta eletroquímica do biossensor PPI-2-COOH/PFO em uma solução tampão fosfato pH 9,2 com e sem adição de pirocatecol ( $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) de -0,5 até 0,5 V vs Ag/QRE a 40  $^{\circ}C$  e 50 mV s<sup>-1</sup>: (a) voltamograma cíclico e (b) diferença entre as curvas do voltamograma cíclico com e sem pirocatecol na solução.

Assim, o biossensor à base de PFO, que foi imobilizada por ligações covalente sobre o filme de PPI-2-COOH, apresenta o pH ótimo de 9,4 e o potencial ótimo de trabalho em +70 mV vs Ag/QRE em 40 °C.

## 3.13 RESPOSTA AMPEROMÉTRICA DO BIOSSENSOR À BASE DE PFO IMOBILIZADA EM FILMES DE PPI-2-COOH

Neste item foi obtida a resposta amperométrica do biossensor PPI-2-COOH/PFO pela aplicação do potencial de +70 mV *vs* Ag/QRE com a técnica de CA em 40°C.

Os eletrodos miniaturizados foram fixos no sistema de FIA com fluxo constante de 1,55 ml min<sup>-1</sup> (cela eletroquímica IV) de solução tampão fosfato (0,05 mol L<sup>-1</sup>) em pH de 9,4. As injeções sequenciais de analito variaram de 5x10<sup>-6</sup> até 10<sup>-1</sup> mol L<sup>-1</sup> de solução de pirocatecol em pH de 9.4, com intervalo de 3 min entre as injeções de 1 mL de volume. Na Figura 55 observa-se que o biossensor apresenta uma resposta amperométrica em toda região de concentração de analito. Em altas concentrações de analito, ocorre um efeito de saturação do eletrodo, limitando a corrente de resposta do biossensor. Este limite de corrente é devido à limitação da cinética de catalise enzimática, sendo necessária uma maior concentração enzimática para se atingir maiores valores de corrente. Também se pode observar que para cada concentração de analito foram efetuadas duas injeções na mesma concentração. As injeções de mesma concentração possibilitaram checar a estabilidade do biossensor durante a medida, obtendo assim o mesmo nível a cada injeção de mesma concentração.

Depois de repetidas medidas, calculou-se a média e o respectivo desvio padrão para cada concentração de solução de pirocatecol injetados. Assim, obteve-se a Figura 56 com uma linearidade na resposta amperométrica nas concentrações entre 5x10<sup>-4</sup> até 2,5x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup>. O R<sup>2</sup> obtido no ajuste linear entre 5x10<sup>-4</sup> até 2,5x10<sup>-2</sup> foi próximo a 1, o que indica um bom ajuste.

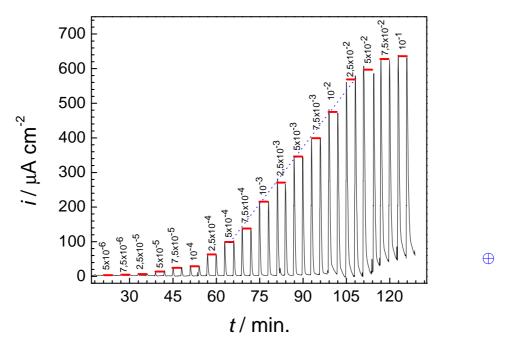


Figura 55. Resposta do biossensor PPI-2-COOH/PFO pela técnica de CA em potencial de +70 mV vs Ag/QRE, com temperatura de trabalho de 40°C e em solução tampão fosfato de pH 9,4 e com injeções em fluxo de solução tampão contendo concentrações de pirocatecol de 5x10<sup>-6</sup> até 10<sup>-1</sup> mol L<sup>-1</sup>.

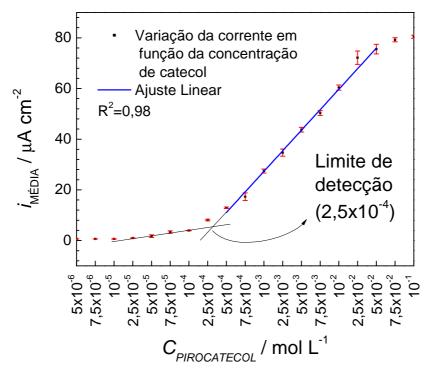


Figura 56. Média e respectivo desvio padrão das respostas do biossensor a base de tirosinase imobilizada por ligações covalente em filme de PPI-2-COOH pela técnica de CA em potencial de +70 mV vs Ag/QRE, com temperatura de trabalho de 40°C e em solução tampão fosfato de pH 9,4 e com injeções em fluxo de solução tampão contendo concentrações de pirocatecol de 5x10<sup>-6</sup> até 10<sup>-1</sup> mol L<sup>-1</sup>.

Com as medidas de variação da densidade de corrente com a concentração de pirocatecol, foi possível se obter a velocidade inicial de reação em função da resposta amperométrica. Para se obter os valores, a Figura 55 foi derivada em função do tempo, obtendo-se assim os picos de máximo no início do tempo de injeção de analito. Desta forma, foram obtidos os valores da velocidade inicial para cada concentração de pirocatecol injetado e gerou-se o gráfico  $v_0$   $v_0$  [S] (Figura 57).

Desta forma, para o patamar máximo de corrente obtido para a curva  $v_0$   $v_0$  [S] (Figura 57), obtém-se o valor aproximado da velocidade máxima da reação ( $v_{MAX}$ ) em 63  $\mu$ A cm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, expressa em aumento da densidade de corrente. E para o valor da concentração, na qual a velocidade de reação é  $v_{MAX}/2$ , obtém-se o valor aproximado de  $k_M$  de 6,25x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>, como determinado na equação 17 e Figura 27.

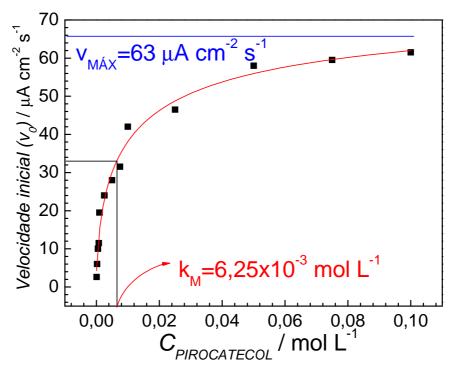


Figura 57. Resultados de velocidade inicial vs variação da concentração do pirocatecol em uma curva típica da equação de Michaelis-Menten limitada pela velocidade máxima de reação.

Da mesma forma como foi obtida a linearidade da equação 18 pela Figura 28, pode-se fazer o gráfico de 1/(velocidade da resposta da reação) vs 1/[S] para os valores obtidos.Com isto, obteve-se a linearidade com inclinação de  $k_M/v_{M\acute{A}X}$  com os valores de 1/ $v_{M\acute{A}X}$  de 0,0157 s cm²  $\mu$ A-¹, ou seja, com valor de  $v_{M\acute{A}X}$  de 63,5  $\mu$ A cm-² s -¹ e o valor obtido para -1/ $k_M$  foi de 1,04x10-⁴ L mol-¹, ou seja, com valor de  $k_M$  foi de 6.62x10-³ mol L-¹.

Estes resultados foram satisfatórios, pois a cinética da reação sobre a superfície do biossensor pode ser expressa pela variação da resposta da densidade de corrente em função do tempo. Foi possível também se verificar que a reação de catálise da enzima imobilizada para o pirocatecol obedeceu a equação de Michaelis-Menten.

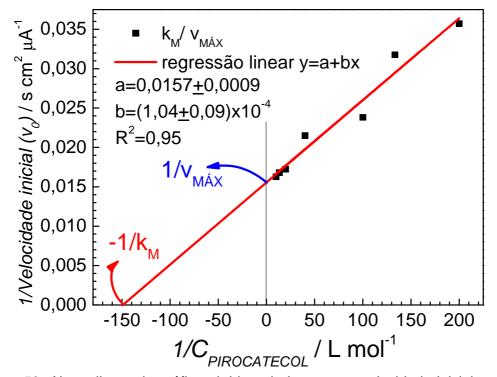


Figura 58. Ajuste linear do gráfico obtido pelo inverso as velocidade inicial *v*s o inverso da concentração de pirocatecol, o qual pode-se determinar facilmente a velocidade máxima e a constante de Michaelis-Menten.

Para o biossensor PPI-2-COOH/PFO a velocidade de retorno de uma porcentagem de enzima ao seu estado oxidativo inicial é lento. Neste caso, após algumas injeções de analito em següência, a sensibilidade de resposta amperométrica deste biossensor diminui, restando apenas a resposta das enzimas cujo retorno ao estado oxidativo é mais rápida. Para confirmar o efeito da demora de uma porcentagem de enzima retornar ao seu estado oxidativo inicilal, o eletrodo foi posto em repouso por 2 horas e com o circuito aberto após uma medida següencial e dentro do sistema de FIA contendo a solução parada de tampão fosfato em pH de 9.4 e temperatura ambiente. Após as 2 horas de repouso, colocou-se novamente o sistema nas condições iniciais de medida (T = 40 °C, fluxo de 1,55 mL min<sup>-1</sup> e aplicação do potencial de +70 mV vs Ag/QRE pela técnica de CA) e injetou-se sequências de solução contendo pirocatecol (10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>) com intervalo de 3 min. Na resposta obtida (Figura 59) vê-se o primeiro pico (t = 3 min) de resposta amperométrica com uma maior intensidade de corrente, a segunda injeção (t = 6 min), com um pico intermediário, e a terceira injeção (t = 9 min), com o pico amperométrico mais fraco. Entre 9 e 17 min, o pico de corrente permanece constante.

Devido à dificuldade de retorno ao estado oxidativo inicial da PFO quando imobilizada sobre o filme de PPI-2-COOH, é necessário um estudo mais aprofundado para se melhorar a resposta deste sistema. Estes estudos deverão priorizar a determinação da temperatura ótima e o uso de mediadores, permitindo se obter uma maior cinética de transporte de carga e de reação química e uma maior sensibilidade para certos analitos.

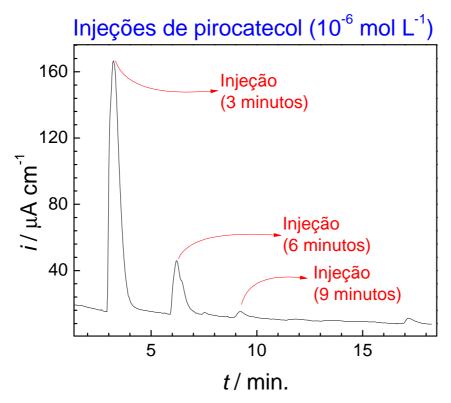


Figura 59. Respostas do biossensor a base de tirosinase imobilizada por ligações covalente em filme de PPI-2-COOH pela técnica de CA em potencial de +70 mV *v*s Ag/QRE, após 2 horas de repouso, com temperatura de trabalho de 40°C e em solução tampão fosfato de pH 9,4 e com injeções em fluxo de solução tampão contendo concentração de pirocatecol de 10°6.

Para aplicação comercial do biossensor, com base na Resolução no. 357 do CONAMA<sup>83</sup>, o valor total máximo de fenóis (substâncias que reagem com 4-aminoantipirina) deve estar abaixo das concentrações máximas encontradas no meio ambiente como estabelecido na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores máximos de fenóis totais baseada na resolução do CONAMA no. 357, de 17 de março de 2005<sup>83</sup>.

	Classe 1 - Máximo de	Classe 3 - Máximo de
Águas doces	0,003 mg L <sup>-1</sup>	0,01 mg L <sup>-1</sup>
Água salina	0,06 mg L <sup>-1</sup>	-
Água salobra	0,003 mg L <sup>-1</sup>	-

Ao se confrontar a resolução 357 do CONAMA com o limite de detecção do biossensor estudado, conclui-se que para estas condições não é possível ainda

utilização deste biossensor em campo antes de se melhorar o seu desempenho, utilizando mediadores, e determinando a sua temperatura ótima de trabalho.

Pela resolução 357 do CONAMA sobre as condições de lançamento de efluentes, o valor máximo de fenóis totais lançados deve ser 0,5 mg L<sup>-1</sup> (4,5x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>). Esse valor ainda está fora da região linear da resposta do biossensor (27,5 mg L<sup>-1</sup> até 2.752 mg L<sup>-1</sup>), porém, mais próximo. Fora da região linear da resposta do biossensor (Figura 55) é possível se obter o limite extremo de 7,5x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> (0,83 mg L<sup>-1</sup>) em medidas sequenciais, porém, não recomenda-se devido ao ruído apresentar intensidade de até 30% da amplitude da resposta amperométrica do biossensor nesta região. Quando se deixa o biossensor em repouso por duas horas é possível se chegar a um limite de detecção muito mais baixo (10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> ou 0,011 mg L<sup>-1</sup>), porém, mesmo que isto possibilitasse alcançar uma sensibilidade desejável, não recomenda-se ainda a sua utilização devido a impossibilidade de se prever se houve ou não o retorno do biossensor ao seu estado inicial.

Os resultados obtidos possibilitam prever se é possível aumentar a sensibilidade do biossensor para se alcançar uma região de concentração desejada, mas, para que isto ocorra será necessário melhorar a resposta do biossensor pela adição de mediadores, utilização da temperatura ótima, modificações de geometria do biossensor (aumento do eletrodo), diminuir a espessura do polímero (diminuir a distância do transporte de carga entre o eletrodo e enzima) e a otimização do tempo de ativação e de imobilização de enzimas sobre a superfície do eletrodo (aumento na quantidade de bioreceptor sem perder atividade enzimática).

## 4 CONCLUSÕES

Apesar de recente, a área de biossensores à base de polímeros tem alcançado um enorme sucesso e desponta hoje como uma área de grande interesse para diagnósticos e controle ambiental. Isto se deve aos resultados animadores que vem sido obtidos e pela real perspectiva destes dispositivos se tornarem comerciais, como no caso do biossensor de glicose já comercializado (glicosímetro). Entretanto, muitas das pesquisas com biossensores estão ainda em fase preliminar no que se refere ao aspecto de produção. Muitos problemas tecnológicos relacionados à eficiência e ao tempo de vida dos biossensores não estão ainda vencidos e a busca por novos materiais, que favoreçam uma maior estabilidade para o biorreceptor, demandam investigações sobre fenômenos de interação das proteínas com a estrutura dos polímeros e preservando o centro ativo do biorreceptor. O baixo custo de muitos biossensores permite utilizá-los de forma descartável. Porém, o tempo de estocagem deste tipo de dispositivo é o maior inimigo quando se deseja preservar a integridade do biorreceptor e a qualidade da resposta. Para isto, muitos autores discutem a melhor forma de se imobilizar um biorreceptor sobre o transdutor e qual deve ser o melhor transdutor usado para cada tipo de biorreceptor.

O presente trabalho pretendeu contribuir para a área de biossensores usando como transdutor amperométrico um novo polímero condutor, que possibilitasse a imobilização do biorreceptor por ligação covalente. O polímero sintetizado e estudado foi o polipirrol-2-ácido carboxílico (PPI-2-COOH). Também foi abordada a fabricação de eletrodos miniaturizados e a construção de celas eletroquímicas para medidas em sistema de analise de injeção em fluxo (FIA).

Uma das contribuições originais desta tese foi a eletrossíntese do PPI-2-COOH e as caracterizações inéditas deste novo material. Outra contribuição foi a fabricação dos eletrodos miniaturizados, que implica na redução dos custos na pesquisa e a fácil manipulação e aplicação a campo. Portanto, o trabalho de pesquisa desta tese pode ser dividido em duas partes. A primeira está relacionada à síntese do filme de PPI-2-COOH possibilitando sugerir um mecanismo de eletropolimerização deste novo material e ao estudo das propriedades estruturais e os efeitos de dopagem nas propriedades intrínsecas deste filme polimérico. A segunda está relacionada à confecção, análise e estudo dos biossensores à base de PFO imobilizada por ligações covalentes sobre o filme de PPI-2-COOH, sintetizado sobre os eletrodos miniaturizados.

Esse estudo usou muitas técnicas experimentais simultaneamente; técnicas necessárias à eletropolimerização e obtenção da resposta eletroquímica do filme de PPI-2-COOH conjuntamente a técnica de microgravimetria para se sugerir um mecanismo de eletropolimerização, eletroatividade e comportamento de entrada de íons no filme polimérico, também como a técnica de absorbância *in*-situ permite estudar mais a fundo os efeitos de dopagem nas propriedades intrínsecas deste polímero. Também foi necessária a técnica de FTIR e modelagem molecular para se explicar e confirmar muitos dos efeitos que aparecem na eletrossíntese do filme de PPI-2-COOH e de caracterização estrutural. Finalmente, várias técnicas foram usadas e adaptadas para a fabricação dos microeletrodos e das celas eletroquímicas. Abrangeu-se, portanto, métodos científicos na área de física, química, bioquímica e engenharia, dando um caráter multidisciplinar a fabricação de um biossensor amperométrico.

Pode-se sumarizar as contribuições deste trabalho com os seguintes itens:

- Síntese eletroquímica de um novo filme polimérico (PPI-2-COOH) em superfícies de diversos eletrodos;
- Sugestão de mecanismo de polimerização eletroquímica para o PPI-2-COOH;
- 3. Estudo de entrada e saída de íons no filme de PPI-2-COOH;
- Estudo das propriedades intrínsecas do filme por medidas de UV-VIS
   in-situ;
- 5. Estudo da estrutura polimérica através de medidas de FTIR;
- Modelagem molecular para previsão do inicio de acoplamento entre monômeros e a propagação na polimerização;
- Modelagem molecular para definir duas conformações possíveis na cadeia polimérica se aproximando simultaneamente a conformação do PPI em estado neutro e oxidado para a transição π →π\*;
- 8. Confecção dos biossensores;
- 9. Obtenção do pH ótimo para o biossensor;
- Obtenção do potencial de trabalho em modo amperométrico com seletividade ao pirocatecol;
- Obtenção da resposta amperométrica do biossensor e seus limites de detecção.

Como resultado da tese submeteu-se um artigo a publicação e outros dois já estão em fase de preparação. Pretende-se incluir num dos artigos a medida de espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS). Para trabalhos futuros com este biossensor sugere-se duas possibilidades: as caracterizações estruturais, elétricas e ópticas do filme de PPI-2-COOH e a otimização do biossensor, utilizando o sistema de FIA sugerido. A otimização do biossensor deverá compreender a obtenção do

valor ótimo de temperatura e a utilização de mediadores catiônicos que aumentarão a cinética da troca de carga entre o eletrodo e a enzima. Desta forma, dever ser obtida uma maior sensibilidade e isto permitirá a sua utilização no monitoramento de efluentes ou de bacias hidrográficas. Este novo polímero também poderá ser utilizado com outros tipos de biorreceptores com emprego em uma outra área de análise clinica ou ambiental.

## **REFERÊNCIAS**

- 1 HULANICK, A.; GEAB, S., INGMAN, F. Chemical sensors definitions and classification. **Pure and Applied Chemistry**, v.63, n.9, p.1247-1250, 1991.
- 2 COSNIER, S. Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films: a review. **Biosensors and Bioelectronics**, v.14, n.5, p.443-456, 1999.
- 3 THÉVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Pure and Applied Chemistry**, v.71, n.12, p.2333-2348, 1999.
- 4 SHAN, D. et al. Development of amperometric biosensor for glucose based on a novel attractive enzyme immobilization matrix: calcium carbonate nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v.22, n.8, p.1612-1617, 2007.
- 5 GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v.17, n.5, p.345-359, 2002.
- 6 LUPETTI, K. O.; RAMOS, L. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistema de análise por injeção em fluxo com extrato bruto de abacate (Persea americana). **Química Nova**, v.26, n.2, p.197-201, 2003.
- 7 ROSATTO, S. S. et al. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v.24, n.1, p.77-86, 2001.
- 8 VIEIRA, I. C. et al. Titulação amperométrica de compostos fenólicos usando polifenol oxidase de vegetal como titulante. **Eclética Química**, v.29, n.2, p.7-14, 2004.

- 9 RAJESH; TAKASHIMA, W.; KANETO, K. Amperometric tyrosinase based biosensor using an electropolymerized PTS-doped polypyrrole film as an entrapment support. **Reactive and Functional Polymers**, v.59, n.2, p.163-169, 2004.
- 10 KIRALP, S.; TOPPARE, L.; YAGCI, Y. Immobilization of polyphenol oxidase in conducting copolymers and determination of phenolic compounds in wines with enzyme electrodes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.33, n.1-3, p.37-41, 2003.
- 11 AMARANTE JR., O. P. et al. Breve revisão de métodos de determinação de resíduos do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). **Quimica nova**, v.26, n.2, p.223-229. 2003.
- 12 ADHIKARI, B.; MAJUMDAR, S. Polymers in sensor applications. **Progress in Polymer Science**, v.29, n.7, p.699-766. 2004.
- 13 FREIRE, R. S. et al. Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.14, n.2, p.230-243, 2003.
- 14 COOPER, J. M.; CASS, A. E. G. **Biosensors:** a practical approach. New York: Oxford University Press, 2004.
- 15 CASTILLO, J. et al. Biosensors for life quality: design, development and applications. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.102, n.2, p.179-194, 2004.
- 16 PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. D. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v.25, n.6, p.1012-1021, 2002.
- 17 DURST, R. A. et al. Chemically modified electrodes: recommended terminology and definitions. **Pure and Applied Chemistry**, v.69, n.6, p. 1317-1324, 1997.

- 18 RAJESH; TAKASHIMA, W.; KANETO, K. Amperometric phenol biosensor based on covalent immobilization of tyrosinase onto an electrochemically prepared novel copolymer poly (N-3-aminopropyl pyrrole-co-pyrrole) film. **Sensors and Actuators B:** chemical, v.102, n.2, p.271-277, 2004.
- 19 CURULLI, A.; PALLESCHI, P. Electropolymerization of pyrrole-2-carboxylic acid and 4,4prime-dihydroxybenzophenone on platinum electrodes. Applications to assemble novel glucose sensors. **Electroanalysis**, v.9, n.14, p.1107-1112, 1997.
- 20 CURULLI, A., et al. Enzyme electrode probes obtained by electropolymerization of monomers with PMS and selected dehydrogenase enzymes. **Talanta**, v.44, n.9, p.1659-1669, 1997.
- 21 CURULLI, A., et al. A new interference-free lysine biosensor using a non-conducting polymer film. **Biosensors and Bioelectronics**, v.13, n.12, p.1245-1250, 1998.
- 22 PALLINI, M., et al. Amperometric nitric oxide sensors: a comparative study. **Electroanalysis**, v.10, n.15, p.1010-1016, 1998.
- 23 STEINEM, C.; JANSHOFF, A. Piezoelectric resonators. in: TOWNSHEND, A.; POOLE, C. F.; WORSFOLD, P. J. (Ed.). **Encyclopedia of Analytical Science**. 2.ed. London: Academic Press, 2004. p. 269-276.
- 24 COOPER, M. A.; WHALEN, C. Profiling molecular interactions using label-free acoustic screening. **Drug Discovery Today:** technologies, v.2, n.3, p.241-245, 2005.
- 25 PIERRE Curie Disponivel em: <a href="http://fr.wikipedia.org/wiki/Pierre\_Curie">http://fr.wikipedia.org/wiki/Pierre\_Curie</a>. Acesso em: 7 nov. 2008.
- 26 FARIA, R. C. Desenvolvimento de instrumentação em microbalança de cristal de quartzo para aplicações em eletroanalítica e biossensores. 2000.

- 174 f. Tese de Doutorado. Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2000.
- 27 O'SULLIVAN, C. K.; GUILBAULT, G. G. Commercial quartz crystal microbalances theory and applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v.14, n.8-9, p.663-670, 1999.
- 28 JANSHOFF, A.; GALLA, H.J.; STEINEM, C. Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors: an alternative to optical biosensors? **Angewandte Chemie**, v.39, n.22, p.4004-4032, 2000.
- 29 VARELA, H.; MALTA, M.; TORRESI, R. M. Técnicas in situ de baixo custo em eletroquímica: a microbalança a cristal de quartzo. **Química Nova**, v.23, n.6, p.664-679, 2000.
- 30 COOPER, M.A.; SINGLETON, V.T. A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions. **Journal of Molecular Recognition**, v.20, n.3, p.154-184, 2007.
- 31 SAUERBREY equation Disponivel em: <a href="http://en.wikipedia.org/wiki/Sauerbrey\_equation">http://en.wikipedia.org/wiki/Sauerbrey\_equation</a>>. Acesso em: 7 nov. 2008.
- 32 OPERATION and service manual: qcm200 quartz crystal microbalance digital controller. Stanford Research Systems 2004. Disponivel em: <a href="http://www.thinksrs.com/downloads/PDFs/Manuals/QCM200m.pdf">http://www.thinksrs.com/downloads/PDFs/Manuals/QCM200m.pdf</a>. Acesso em: 07 nov. 2008.
- 33 YANG, Y. M.; FALES, H. M.; PANNELL, L. Dehalogenation reactions in californium-252 plasma desorption mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.57, n.8, p.1771-1772, 1985.
- 34 KEIJI KANAZAWA, K.; GORDON, J. G. The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with liquid. **Analytica Chimica Acta**, v.175, p.99-105, 1985.

- 35 MECEA, V. M. From quartz crystal microbalance to fundamental principles of mass measurements. **Analytical Letters**, v.38, n.5, p.753 767, 2005.
- 36 DENARO, A. R. **Fundamentos de eletroquímica**. São Paulo: Ed. Bliicher Ltda, 1974. v.1.
- 37 GREEF, R. et al. **Instrumental methods in electrochemistry**. New York: John Wiley and Sons,1985.
- 38 OYAMA, N.; OHSAKA, T. Coupling between electron and mass transfer kinetics in electroactive polymer films: an application of the in situ quartz crystal electrode. **Progress in Polymer Science**, v.20, n.5, p.761-818, 1995.
- 39 VATANKHAH, G. et al. Dependence of the reliability of electrochemical quartz-crystal nanobalance mass responses on the calibration constant, Cf: analysis of three procedures for its determination. **Electrochimica Acta**, v.48, n.11, p.1613-1622, 2003.
- 40 SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2000. v.6. 460 p.
- 41 SMITH, B. C. **Infrared spectral interpretation:** a systematic approach. New York: CRC Press, 1998. 265 p.
- 42 POPE, M. **Electronic processes in organic crystals and polymers**. New York: Oxford University Press, 1999. v.1. 773 p.
- 43 GREENHAM, N. C.; FRIEND, R. H. **Semiconductor device physics of conjugated polymers, solid state physics**: cambridge Academic Press, 1995. 149 p. (Solid State Physics v.49.)
- 44 FRIEDMAN, P. W. A. R. S. **Molecular quantum mechanics.** New York: Oxford University Press Inc, 2001. 545 p.

- 45 FERMÍN, D. J.; TERUEL, H.; SCHARIFKER, B. R. Changes in the population of neutral species and charge carriers during electrochemical oxidation of polypyrrole. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.401, n.1-2, p.207-214, 1996.
- 46 BRÉDAS, J. L.; STREET, G. B. Polarons, bipolarons, and solitons in conducting polymers. **Accounts of Chemical Research**, v.18, p.309-315, 1985.
- 47 BRÉDAS, J. L. et al. Polarons and bipolarons in polypyrrole: evolution of the band structure and optical spectrum upon doing. **Physical Review B**, v.30, n.2, p. 1023-1025, 1984
- 48 BRÉDAS, J. L. et al. Highly conducting polyparaphenylene, polypyrrole, and polythiophene chains: An ab initio study of the geometry and electronic-structure modifications upon doping. **Physical Review B**, v.29, n.12, p.6761-6773, 1984.
- 49 RAPTA, P. et al. In situ EPR/UV-VIS spectroelectrochemistry of polypyrrole redox cycling. **Journal of the Chemical Society Faraday Transactions** v.94, n.24, p. 3625-3630, 1998.
- 50 SON, Y.; RAJESHWAR, K. Potential-modulated ultraviolet-visible and raman spectra of polypyrrole thin films in aqueous electrolytes: combination with voltammetric scanning and the influence of dioxygen on the stability of radical cations and dications of the conducting polymer. **Journal of the Chemical Society Faraday Transactions**, v.88, n.4, p.605, 1992.
- 51 PATIL, A. O.; HEEGER, A. J.; WUDL, F. Optical properties of conducting polymers. **Chemical Reviews**, v.88, n.1, p.183-200, 1988.
- 52 FORD, W. K.; DUKE, C. B.; SALANECK, W. R. Electronic structure of polypyrrole and oligomers of pyrrole. **The Journal of Chemical Physics**, v.77, n.10, p.5030-5039, 1982.

- 53 BARREIRO, E. J. et al. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, v.20, n.3, p.300-310, 1997.
- 54 CIRINO, J. J. V. Cálculo de potenciais de ionização de algumas bases purinas e aza-análogas utilizando o método semi-empírico HAM/3. 1994. 128 f. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 1994.
- 55 ANTUNES, A. et al. Método de Hartree-Fock: dois exemplos analiticamente solúveis. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v.21, n.2, p.221-232. 1999.
- 56 MARTIN, C. H.; BIRGE, R. R. Reparametrizing MNDO for excited-state calculations by using ab initio effective hamiltonian theory: application to the 2,4-pentadien-1-iminium cation. **The Journal of Physical Chemistry A**, v.102, n.5, p.852-860, 1998.
- 57 FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. D. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v.25, n.3 ,p.455-464, 2002.
- 58 NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger principles of biochemistry. California: W H Freeman & Co, 2004. 1119 p.
- 59 MURRAY, R. K. et al. **Harper's illustrated biochemistry**. New York: McGraw-Hill Companics. 2003. 693 p.
- 60 CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. Lippincott's illustrated reviews: biochemstry. Philadelpia: J.B. Lippincott. 1994. 508 p.
- 61 GILBERT, H. F. **Basic concepts in biochemistry:** a student's survival guide. New York: McGraw-hill. 2000. 331 p.
- 62 EICKEN, C.; KREBS, B.; SACCHETTINI, J. C. Catechol oxidase structure and activity. **Current Opinion in Structural Biology**, v.9, n.6, p.677-683, 1999.

- 63 FERNÁNDEZ, I. et al. Some features of the overoxidation of polypyrrole synthesized on austenitic stainless steel electrodes in aqueous nitrate solutions. **Surface and Coatings Technology**, v.191, n.1, p.134-139, 2005.
- 64 SCHLENOFF, J. B.; XU, H. Evolution of physical and electrochemical properties of polypyrrole during extended oxidation. **Journal of The Electrochemical Society**, v.139, n.9, p.2397-2401, 1992.
- 65 GONÇALVES, D.; IRENE, E.A. The protective nature of dodecanethiol self-assembled monolayers deposited on Au for the electropolymerization of 3-methylthiophene. **Electroanalysis**, v.15, n.7, p.652-658, 2003.
- 66 YANO, J. Selective potential response of a poly(*N*,*N*-dimethylaniline)/poly(*o*-chloroaniline) dual-layer coated electrode to dissolved iodide ions. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v.65, n.5, p.1490-1496, 1991.
- 67 HWANG, B. J.; SANTHANAM, R.; LIN, Y. L. Nucleation and growth mechanism of electroformation of polypyrrole on a heat-treated gold/highly oriented pyrolytic graphite. **Electrochimica Acta** v.46, n.18, p.2843-2853, 2001.
- 68 KONTTURI, K. et al. Potential controlled electrosynthesis of poly(thiophene-3-methanol): application of the two-dimensional layer-by-layer nucleation and growth model. **Journal of Electroanalytical Chemistry** v.384,n.1-2, p.67-75, 1995.
- 69 BAKER, C. K.; REYNOLDS, J. R. A quartz microbalance study of the electrosynthesis of polypyrrole. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.251, n.2, p.307-322, 1988.
- 70 GIRARD, F. et al. Polypyrrole film electrodes electrochemically doped with tetrathiomolybdate anions: preparation and characterization. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.334, n.1-2, p.35-55, 1992.

- 71 SABOURAUD, G.; SADKI, S.; BRODIE, N. The mechanisms of pyrrole electropolymerization. **Chemical Society Reviews**, v.29, n.5, p.283-293, 2000.
- 72 LACROIX, J.-C. et al. Modeling the growth and molecular structure of electrically conducting polymers: application to polypyrrole. **Chemistry A European Journal**, v.4, n.9, p.1667-1677, 1998.
- 73 AURBACH, D. **Nonaqueous electrochemistry**. New York: Marcel Dekker, 1999. v.1.
- 74 LI, Y.; QIAN, R. Electrochemical overoxidation of conducting polypyrrole nitrate film in aqueous solutions. **Electrochimica Acta**, v.45, n.11, p.1727-1731, 2000.
- 75 OMNIC Interpretation Guide 1.0 software. [S.I.]: Nicolet Instrument Corporation, 1991.
- 76 CHRISTENSEN, P. A.; HAMNETT, A. In situ spectroscopic investigations of the growth, electrochemical cycling and overoxidation of polypyrrole in aqueous solution. **Electrochimica Acta**, v.36, n.8, p.1263-1286, 1991.
- 77 SALANECK, W. R. et al. X-ray photoelectron spectroscopy of boron fluoride doped polypyrrole. **Synthetic Metals**, v.5, n.2, p.125-139, 1983.
- 78 VIEIRA, I. D.; FATIBELLO, O. Flow injection spectrophotometric determination of total phenols using a crude extract of sweet potato root (Ipomoea batatas (L.) Lam.) as enzymatic source. **Analytica Chimica Acta**, v.366, n.1-3, p.111-118, 1998.
- 79 Z. YANG, A. C. Microstamping of a biological ligand onto an activated polymer surface. **Advanced Materials**, v.12, n.6, p.413-417, 2000.
- 80 ARSLAN, A. et al. Immobilization of tyrosinase in polysiloxane/polypyrrole copolymer matrices. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.35, n.3-4, p.163-167, 2005.

- 81 DEJEU, J. et al. Early steps of the film growth mechanism in self-assembled multilayers of PAH and PSS on silica: Polymer uptake, charge balance and AFM analysis. **Colloids and Surfaces A:** physicochemical and engineering aspects, v.288, n.1-3, p.26-35, 2006.
- 82 DANVIC 2009. Disponivel em: <a href="http://www.efeitopeltier.com.br/intro.asp">http://www.efeitopeltier.com.br/intro.asp</a>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2009.
- 83 BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente CONAMA. Resoluão nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília (DF), mar. 2005.