

Lucas Natálio Chavero

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
PLATAFORMAS NANOESTRUTURADAS DE POLIPIRROL
PARA BIOCENSORES AMPEROMÉTRICOS NÃO
ENZIMÁTICOS E ENZIMÁTICOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Física da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Grau de Doutor em Física
Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Luisa
Sartorelli

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Chavero, Lucas
Desenvolvimento e caracterização de plataformas
nanoestruturadas de polipirrol para biossensores
amperométricos não enzimáticos e enzimáticos / Lucas
Chavero ; orientadora, Maria Luisa Sartorelli -
Florianópolis, SC, 2013.
166 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Física.

Inclui referências

1. Física. 2. Polipirrol. 3. Biossensor. 4.
Nanoestruturas. 5. Espectroscopia de Impedância
Eletroquímica. I. Sartorelli, Maria Luisa. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Física. III. Título.

Dedico este trabalho a duas pessoas que, mesmo longe, sempre estiveram e continuam comigo: tia Laci (a pessoa que me introduziu ao mundo da Física) e tia Noeli (sua força de vontade me serviu de exemplo nos momentos de fraqueza).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC pela possibilidade de utilizar (gratuitamente) o MEV e o FEG.

Agradecer ao professor Xuxa (IFSC-USP) por nos ceder as nanopartículas de platina (NPpt) que foram utilizadas nesse trabalho.

Ao grande Antônio da Pós-Graduação em Física por sua extrema competência e por ter resolvido alguns pepino para mim ao longo desses quatro anos.

A professora Maria Luisa Sartorelli por me aturar e muito me ajudar não somente nesse trabalho, mas ao longo de todos os anos em que trabalhamos juntos.

Ao pessoal do laboratório (TODOS), em especial àqueles com quem convivi boa parte de minha vida e jornada acadêmica.

Gostaria de agradecer a todos os meus amigos de Itapema, Florianópolis, Conchinchina e outros lugares desse mundão onde possam estar espalhados. Deus espalha e o diabo junta de novo...

Ao lado animal da família, Chelsea, Aisha, Pitucha, Juno, Sarney e o impressionante Napoleão, que participou dos principais eventos da minha vida.

A todos os meus familiares do Brasil e da Argentina, que mesmo distantes, em ocasião alguma deixaram de me apoiar.

À minha sweet baby Cami e a minha família (Dani, Ledinha e Morgui) que não preciso nem comentar.

E por fim à Fapesc, Capes e Cnpq pelo apoio financeiro.

Se esqueci de alguém, me desculpem, estou estressado...

“Un deseo profundo vive en mí: ser un día el rostro de una sombra sin imagen alguna, y sin historia. Ser solamente el eco de un canto apenas acorde que señala a sus hermanos: La libertad del espíritu.”

(Atahualpa Yupanqui)

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de plataformas nanoestruturadas de polipirrol (PPy) dopadas com ácido dodecilbenzeno sulfônico (DBSA), adequadas para a imobilização de enzimas ou nanopartículas, que resultem em biossensores de alta sensibilidade, boa estabilidade e alto grau de reprodutibilidade. Estas plataformas são desenvolvidas a partir da técnica de litografia de nanoesferas associada à eletropolimerização, que permite, com facilidade, a obtenção de nanoestruturas muito bem ordenadas em grandes áreas superficiais. Além disso, o controle estrito da carga eletropolimerizada origina diferentes arquiteturas. Análises de microscopia óptica, MEV e FEG associadas a medidas de perfilometria, permitiram traçar uma relação entre a espessura do filme e a carga depositada e observar as tendências de crescimento conformacional dessas estruturas. Medidas de impedanciometria possibilitaram uma rigorosa caracterização elétrica dos eletrodos poliméricos compactos e nanoestruturados. Para a fabricação dos biossensores de catecol e H_2O_2 , foram imobilizadas tirosinase (Ty) e nanopartículas de platina (NPPt), respectivamente. Quanto as medidas amperométricas, para os biossensores de H_2O_2 , os melhores resultados foram obtidos para os eletrodos nanoestruturados no equador de esferas de 535 nm de diâmetro, que mostrou-se linear na faixa de 0,4 – 5 mM com sensibilidade de $0,95 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ e limite de detecção de 0,39 mM. O tempo de resposta característico para esses sensores foi da ordem de 8 s. Para os biossensores de catecol, os melhores resultados foram observados para as nanoestruturas fabricadas a partir de esferas de 250 nm de diâmetro e com nível de preenchimento acima do equador das esferas. A sensibilidade para esses biossensores foi de $1,45 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ numa faixa linear de 1 – 6 μM e limite de detecção de 0,52 μM . O tempo de resposta obtido foi da ordem de 5 s. Esses valores, quando comparados aos da literatura, mostram-se extremamente satisfatórios em relação aos parâmetros investigados, comprovando que essas geometrias, associadas à afinidade do PPy com biomoléculas ativas e nanopartículas, possuem enorme potencial na construção de biossensores eficientes e com as mais diversas funcionalidades.

Palavras-chave: Polipirrol. Biossensor. Nanoestruturas. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.

ABSTRACT

The main purpose of this work is the development of nanostructured polypyrrole (PPy) platforms doped with sodium dodecylbenzenesulfonic sodium salt (DBSA), suitable for enzyme or nanoparticles immobilization that will give biosensors with high sensitivity, good stability and a high degree of reproducibility. These platforms are produced by nanosphere lithography technique and electropolymerization, which allows the fabrication of well ordered nanostructures with a high surface area. Furthermore, the strict control of the electropolymerized charge originates different architectures. Optical microscopy, SEM and FEG associated with profilometry measurements, allowed us to establish a thickness x deposited charge relation and observe the conformational growth trends of these structures. Impedanciometry allowed a rigorous electrical characterization of compact and nanostructured polymeric electrodes. For the fabrication of catechol and H₂O₂ biosensors, respectively, tyrosinase (Ty) and platinum nanoparticles (NPPt) were immobilized. For H₂O₂ biosensors, the best amperometric results were obtained for nanostructured electrodes at the equator of spheres (535 nm in diameter), which has a linear range of 0.4 – 5.0 mM with a sensitivity of 0.95 mA m⁻¹.cm⁻² and detection limit of 0.39 mM. The characteristic response time of these sensors was about 8 s. For catechol biosensors, the best results were observed for the nanostructures made from 250 nm in diameter and fill level above the equator of the spheres. The sensitivity of these biosensors was 1.45 AM⁻¹.cm⁻² with a linear range of 1 - 6 mM and a detection limit of 0.52 mM. The response time obtained was about 5 s. These values, when compared to the literature, tend to be extremely satisfactory in relation to the investigated parameters, proving that these geometries associated with the affinity of PPy with active biomolecules and nanoparticles, have enormous potential in efficient biosensor with many different features.

Keywords: Polypyrrole. Biosensor. Nanostructures. Electrochemical Impedance Spectroscopy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PPy – Polipirrol

Py - Pirrol

Ty – Tirosinase

DBSA – Ácido Dodecil Benzeno Sulfônico

GOx – Glucose Oxidase

Pt – Platina

Z_{real} – Impedância Real

Z_{imag} – Impedância Imaginária

Re – Resistência do Eletrólito

C_{DC} – Capacitância de Dupla Camada

R_{TC} – Resistência de Transferência de Carga

CPE – Elemento de Fase Constante

C_{eff} – Capacitância Efetiva

Si – Silício

PS – Poliestireno

WE – Eletrodo de Trabalho

CE – Contra Eletrodo

RE – Eletrodo de Referência

SCE – Eletrodo de Calomelano Saturado

NPpT – Nanopartículas de Platina

NP - Nanopartícula

PAMAM – Poli (Amido Amina)

EIS – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

V_{pol} – Potencial de Polimerização

F_{carac} – Frequência Característica

SUMÁRIO

1	Introdução.....	21
2	Revisão Bibliográfica e Aspectos Teóricos	24
2.1	Biossensores	24
2.1.1	Conceito.....	24
2.2	Transdutores	25
2.2.1	Tipos de Transdutores.....	26
2.3	Biossensores não enzimáticos de peróxido de hidrogênio.....	30
2.4	Biossensores de compostos fenólicos.....	31
2.4.1	Tirosinase.....	32
2.4.2	Princípio de funcionamento	34
2.5	Polímeros condutores	37
2.5.1	Propriedades	38
2.5.2	Eletropolimerização	43
2.5.3	PPy e aplicação em biossensores	46
2.6	Técnicas de imobilização enzimática	51
2.6.1	Encapsulamento	51
2.6.2	Adsorção	51
2.6.3	Ligação covalente cruzada (Cross-linking).....	52
2.6.4	Imobilização covalente	52
2.7	Litografia de nanoesferas	53
2.7.1	Máscaras coloidais.....	53
2.7.2	Spin-Coating.....	55
2.8	Técnicas eletroquímicas	55
2.8.1	Espectroscopia de impedância eletroquímica	55
2.8.2	Diferentes representações para a impedância.....	59
2.8.3	Cronoamperometria	64
3	Parte Experimental	66
3.1	Máscaras coloidais	66
3.1.1	Preparação do substrato	66
3.1.2	Spin-coating.....	68

3.2	Eletropolimerização	69
3.2.1	Preparação do eletrodo de trabalho.....	70
3.2.2	Célula eletrolítica e eletrólito.....	71
3.2.3	Métodos de deposição	73
3.3	Remoção das esferas de Ps.....	73
3.4	Montagem dos eletrodos de trabalho.....	74
3.4.1	Biossensor para detecção de H ₂ O ₂	74
3.4.2	Biossensor para detecção de catecol	76
3.5	Cronoamperometria.....	77
3.5.1	Célula eletrolítica, eletrólito e incrementos de analito.....	77
3.6	Espectroscopia de impedância eletroquímica.....	78
3.7	Caracterização morfológica dos eletrodos.....	78
3.7.1	Microscopia Óptica.....	79
3.7.2	Perfilometria	79
4	Resultados e discussão	81
4.1	Eletropolimerização do PPy	81
4.2	Confecção de máscaras coloidais	87
4.3	Nanoestruturação do PPy	89
4.4	Análise por espectroscopia de impedância eletroquímica: filmes compactos vs. nanoestruturados.....	96
4.4.1	Determinação dos parâmetros de circuito equivalente.....	112
4.4.2	Análise detalhada das relações de impedância para três séries distintas	118
4.4.3	Modelo de três fases para dois sistemas distintos	123
4.5	Biossensor amperométrico não enzimático de peróxido de hidrogênio.....	129
4.5.1	Medidas amperométricas	129
4.5.2	Influência da geometria	130
4.6	Biossensor amperométrico enzimático de tirosinase para detecção de catecol	137
4.6.1	Medidas amperométricas	141
4.6.2	Forma & mecanismo	149

4.6.3	Estabilidade dos biossensores	150
4.6.4	Comparação com dados da literatura	153
5	Considerações Finais	155
5.1	Conclusões	155
5.2	Perspectivas Futuras	157
6	Bibliografia.....	158
7	Apêndice.....	167
7.1	Estimativas dos parâmetros de circuito equivalente	167

1 INTRODUÇÃO

A importância do desenvolvimento de novos métodos e técnicas analíticas para a determinação e quantificação de espécies de interesse em determinado sistema, está diretamente associada às necessidades de monitoramento decorrentes do contínuo progresso tecnológico. Métodos analíticos clássicos como espectrofotometria e cromatografia gasosa possuem fundamental importância como ferramentas analíticas de monitoramento de diversos compostos, entretanto, ainda são métodos economicamente dispendiosos, demorados e que exigem pré-tratamento amostral (1).

Dentro desse contexto, surgem os biossensores, que são dispositivos analíticos complementares a técnicas analíticas clássicas mais robustas, e que permitem um maior número de análises em menor tempo, aumentando assim a confiabilidade nas informações.

Esses dispositivos têm atraído grande atenção e crescentes investimentos no mundo inteiro em diversas áreas de pesquisa, uma vez que têm resposta rápida em tempo real, baixo custo de fabricação, seletividade e boa reprodutibilidade, sendo utilizados em diagnóstico médico, tecnologia de alimentos, processos industriais e monitoramento ambiental, devido a suas vantagens frente a outros tipos de sensores (2).

Como definição geral, biossensor é um dispositivo analítico que consiste em confinar algum componente biológico conhecido, acoplado a um dispositivo transdutor que converte uma determinada reação bioquímica em um sinal elétrico amplificado (3).

Frente ao progresso tecnológico e industrial, surge a possibilidade de desenvolvimento de novas arquiteturas na construção de biossensores mais eficientes. Diversos materiais nanoestruturados têm sido utilizados, como nanotubos e nanopartículas, associados ou não, assim como técnicas que permitem a nanoestruturação espacial dos vários componentes do biossensor, como deposição por Langmuir-Blodgett (4) e por LbL (do inglês *layer-by-layer*) (5). Além disso, os polímeros condutores também vêm sendo amplamente empregados na fabricação de nanoestruturas com aplicação em biossensores, através de inúmeras técnicas de síntese (6). Devido a suas dimensões e arranjo, essas nanoestruturas possuem características únicas, como o aumento da área superficial do eletrodo e difusão seletiva de analitos, que por sua vez interferem diretamente nas características analíticas do biossensor.

Este trabalho segue a mesma estratégia, pois tem como objetivo principal a fabricação de plataformas nanoestruturadas adequadas para a imobilização de enzimas ou nanopartículas, que resultem em

dispositivos de alta sensibilidade, boa estabilidade e alto grau de reprodutibilidade. Estas plataformas são desenvolvidas a partir da técnica de litografia de nanoesferas associada à eletropolimerização, que permite, com facilidade, a obtenção de nanoestruturas muito bem ordenadas em grandes áreas superficiais. Além disso, o controle estrito da carga eletropolimerizada origina diferentes arquiteturas. Portanto, além de buscar uma resposta otimizada do biossensor, pretende-se também compreender de que forma a arquitetura do dispositivo afeta suas propriedades. As estruturas obtidas são inéditas em relação a outras plataformas utilizadas para a imobilização de enzimas encontradas na literatura e apresentam grande interesse científico e tecnológico, já que uma simples mudança nessa geometria pode acarretar numa enorme melhoria nas características dos dispositivos analíticos utilizados como biossensores.

Como parte da configuração desses dispositivos e com grande importância funcional encontra-se o polímero condutor polipirrol (PPy), que nos últimos anos tem sido amplamente empregado na construção de biossensores na imobilização de moléculas bioativas (7). Este polímero propicia uma rápida transferência de elétrons, fator essencial na construção de eficientes dispositivos biossensores. Além disso, a estrutura química desse material é compatível com muitas das substâncias químicas encontradas na natureza, o que facilita as interações com micromoléculas biológicas.

O nosso grupo conta com grande experiência e domínio das técnicas de litografia de nanoesferas e eletrodeposição para a nanoestruturação dos mais diversos materiais, experiência esta, advinda da produção de diversos trabalhos ao longo dos últimos anos (8) (9) (10) (11).

Todo o processo de investigação e produção desses eletrodos envolve um regime interdisciplinar bastante amplo, desde a concepção teórica até sua materialização em laboratório, abordando diferentes tópicos de física, química, bioquímica e ciência dos materiais, uma vez que o tema em questão envolve a manipulação de diferentes compostos, diferentes processos de fabricação e propriedades físicas e químicas.

O desenvolvimento e corpo deste trabalho contam com a fabricação e estudo de dois dispositivos distintos, mas construídos, de um modo geral, a partir de técnicas e estruturas semelhantes. Esses dispositivos referem-se a um biossensor não enzimático e um biossensor enzimático, ambos construídos a partir das mesmas estruturas poliméricas de polipirrol. Como estratégia de organização da tese, optou-se por tratar os temas de forma conjunta nos capítulos iniciais de

revisão bibliográfica e parte experimental. Já na apresentação dos resultados, os dispositivos foram tratados separadamente, com exceção aos aspectos comuns a ambos os biossensores.

Este trabalho se organiza basicamente em quatro partes. O primeiro capítulo introduz os conceitos que posteriormente serão abordados ou utilizados no desenvolvimento do trabalho, assim como uma revisão do estágio atual da área de biossensores nanoestruturados.

Na sequência, apresenta-se uma descrição detalhada de todos os procedimentos experimentais adotados, partindo da fabricação das máscaras coloidais, eletropolimerização do PPy, remoção das esferas de poliestireno, imobilização das nanopartículas de platina e da enzima tirosinase, culminando com a descrição das técnicas amperométricas utilizadas nas medidas de resposta do sensor, além de todas as outras técnicas utilizadas na caracterização morfológica e elétrica dos eletrodos.

Por fim serão apresentados os resultados obtidos em cada uma das etapas para o desenvolvimento dos biossensores propostos, desde os parâmetros de fabricação das máscaras coloidais, eletropolimerização do PPy nas máscaras de poliestireno e obtenção das plataformas poliméricas, assim como sua caracterização elétrica. Referente às respostas amperométricas, os resultados para as diferentes geometrias estudadas, como sensibilidade, linearidade e tempo de resposta, são apresentados de forma independente para os dois biossensores em questão.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E ASPECTOS TEÓRICOS

2.1 BIOSSENSORES

A revisão bibliográfica que se segue relaciona os diversos aspectos dos biossensores construídos a partir de polímeros condutores e baseou-se, principalmente, nos trabalhos de Gerard *et al.* (7) (*Application of conducting polymers to biosensors*), Ahuja *et al.* (12) (*Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications*) e Singh *et al.* (13) (*Polypyrrole based amperometric glucose biosensors*), além de outros trabalhos, que possuem relevância para esta tese e serão igualmente citados.

2.1.1 Conceito

O biossensor é definido como um dispositivo analítico que possui um componente biocatalítico ativo, acoplado a um transdutor, que tem por finalidade converter algum complexo parâmetro bioquímico em um sinal elétrico amplificado (12) (3) (14).

O sinal elétrico registrado é proporcional à concentração do específico componente químico (analito) ou conjunto de componentes presentes no elemento de análise (7).

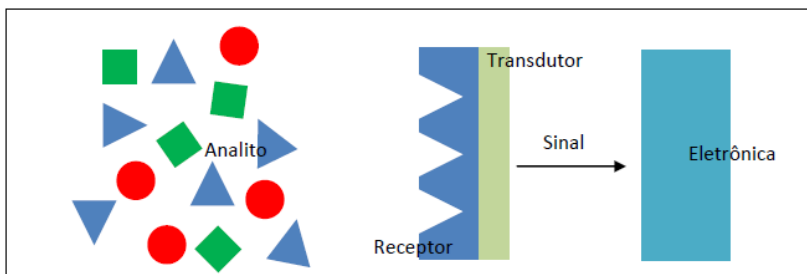
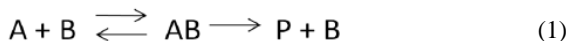


Figura 1: Configuração básica de um biossensor simples.

Para a construção de biossensores faz-se uso de sistemas biológicos em diferentes níveis de integração, a fim de reconhecer e detectar alguma substância que se deseja determinar, sendo que o componente biológico utilizado pode ser composto por enzimas, organelas, tecido animal ou vegetal, antígenos ou anticorpos, ácidos nucleicos, lectina, apoenzimas, entre outros (13) (15).

O primeiro passo nesta integração é a formação de um complexo específico da substância biologicamente ativa imobilizada (B) com o analito (A), e a formação do produto (P), ou seja, consumo do analito e formação do produto, como estão representados na eq. 1:



As mudanças físico-químicas causadas pela formação do complexo como, por exemplo, mudança na espessura da camada iônica no eletrodo, índice de refração, absorção e emissão de luz e carga elétrica podem ser indicados por meio de sensores eletroquímicos, optoeletrônicos, térmicos e piezoeletrônicos (15).

Considerando a arquitetura e função dos biossensores, pode-se traçar a seguinte sequência de processos, que tomam lugar a partir de sua construção:

- a) Reconhecimento específico do analito;
- b) Transdução do efeito físico-químico causado pela interação com o componente biológico em um sinal elétrico;
- c) Amplificação e processamento do sinal.

Esses dispositivos analíticos são em geral específicos, rápidos e fáceis de operar, além de poderem ser facilmente fabricados sem a necessidade de um pré-tratamento da amostra (7). Além do mais, ainda são considerados como maiores atributos de um biossensor, características que explicam sua grande aplicação no mercado, a especificidade, portabilidade, rápido tempo de resposta, possibilidade de operação em soluções opticamente opacas, análise em tempo real sem pré-tratamento e facilidade de uso, o que leva a uma ampla gama de aplicações em diversas áreas, como diagnóstico médico (16) (17) (18), monitoramento ambiental (19) (20), segurança alimentar (21) (22), processos industriais (23), entre inúmeros outros.

2.2 TRANSDUTORES

O componente biológico de um biossensor tem a função específica de reconhecer o analito em questão, e a mudança bioquímica que resulta dessa interação é indicada por um componente chamado de transdutor, que é a peça chave do biossensor, pois é quem irá converter algum complexo parâmetro bioquímico em um sinal elétrico conhecido.

2.2.1 Tipos de Transdutores

Dependendo do tipo de sistema biológico e da natureza da interação bioquímica com que se esteja lidando, existe algum sistema apropriado de transdução que pode ser adaptado a um determinado sensor, sendo que eles podem ser divididos em eletroquímicos, termométricos (24) (25), ópticos (26) e piezoeletrônicos (27). A seguir serão detalhados esses diversos tipos de transdutores.

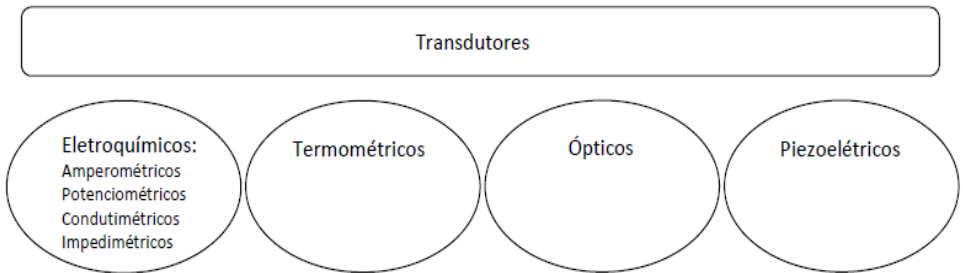


Figura 2: Classificação dos transdutores.

2.2.1.1 Eletroquímicos

A classe de transdutores com indicação eletroquímica é com certeza a mais difundida e utilizada para a construção de biossensores com as mais diversas funcionalidades, prevalecendo sobre quaisquer outros métodos de transdução conhecidos (13).

Dentro dessa classe de transdutores encontram-se os amperométricos (28) (29) e potenciométricos (30) (31), que possuem ampla literatura e são muito conhecidos, além de também possuírem grande apelo comercial. Ainda dentro dessa classe, também são encontrados os transdutores condutimétricos (32) (33) que ainda são pouco difundidos, entretanto, possuem em seu favor algumas qualidades como, a facilidade de preparação e uso (15).

A seguir será feita uma abordagem mais profunda sobre os fundamentos, características e propriedades de cada um desses transdutores, observando as especificidades e aplicações, bem como as vantagens e desvantagens de cada um deles.

2.2.1.1.1 Amperométricos

O princípio de funcionamento dos transdutores amperométricos, certamente os mais utilizados na aplicação em biossensores, refere-se basicamente à detecção da corrente que é drenada pelo eletrodo de trabalho quando algum potencial constante é aplicado. As medidas são referentes à corrente produzida devido à oxidação ou redução de algum produto conhecido, quando submetido a um potencial.

Esse tipo de sensor tem, entre suas principais qualidades, o rápido tempo de resposta na detecção e a boa sensibilidade. Entretanto, sua seletividade fica um pouco aquém das expectativas, fato que deve ser compensado na preparação do eletrodo de forma a evitar que a excelente especificidade do componente biológico seja prejudicada.

O fator mais importante que caracteriza esse tipo de transdutor é a transferência de elétrons entre a molécula biocatalítica, geralmente oxidases ou dehidrogenases, e a superfície do eletrodo, que na maioria das vezes é um mediador ou um polímero condutor (7).

Independente da grande difusão e uso de polímeros condutores como mediadores no processo de detecção amperométrica, os fenômenos envolvidos ainda não são completamente compreendidos e explicados atualmente, e muitas vezes esses polímeros, que são usados para a imobilização das enzimas, podem afetar significativamente a resposta sensitiva dos biossensores para certas espécies utilizadas.

Devido a um aumento do sobrepotencial, ou seja, um deslocamento do potencial redox, a taxa do processo de transferência de carga é aumentada, de modo a modificar a taxa do processo global, a fim de que este seja controlado pela transferência de massa (15). Sob essas condições a corrente de difusão I_d é proporcional à concentração da substância que se quer determinar, S_0 , e pode ser representada pela eq. 2:

$$I_d = \frac{nAFD_s S_0}{\delta} \quad (2)$$

onde δ é a espessura da camada de difusão (sendo constante para um dado valor de convecção), D_s é o coeficiente de difusão, A é área da superfície do eletrodo, n é o número de elétrons trocados e F é a constante de Faraday.

Na Figura 3 é possível observar um esquema que ilustra a transferência de carga de um típico transdutor amperométrico.

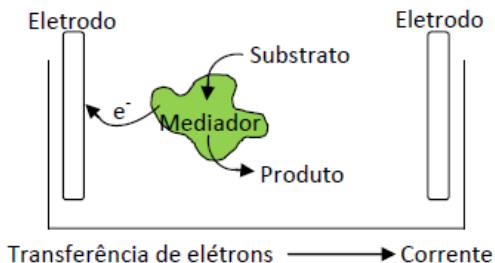


Figura 3: Mecanismo de transdução amperométrica.

2.2.1.1.2 Potenciométricos

Os transdutores potenciométricos detectam as variações no potencial através de alguma membrana localizada na superfície do eletrodo, quando esta entra em contato com íons específicos. A variação desses potenciais, de acordo com a concentração de determinados analitos, é viabilizada pelo uso de eletrodos íons-seletivos que funcionam como transdutores físicos.

Geralmente os biossensores potenciométricos são utilizados juntamente com polímeros condutores, fazendo uso da sensibilidade desses polímeros em relação ao pH das soluções analisadas (7).

Para biossensores que possuem tempo de resposta muito lento, a variação do potencial, em relação aos valores do potencial no estado estacionário, pode ser considerada como um sinal analítico, que é utilizado na quantificação do substrato. Dentre suas principais vantagens é possível citar a alta seletividade e o grande intervalo dinâmico (7).

Na Figura 4, podemos encontrar uma ilustração que representa o acúmulo de carga na superfície do eletrodo (na membrana) e a consequente variação do potencial.

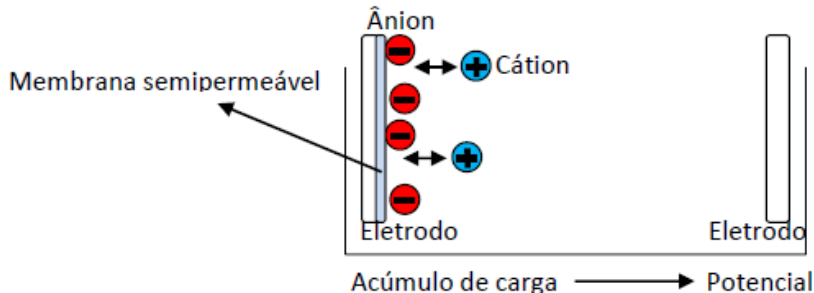


Figura 4: Mecanismo de transdução potenciométrica.

2.2.1.1.3 Condutimétricos

Transdutores condutimétricos detectam as variações na condutância do componente biológico entre um par de eletrodos metálicos, como resultado de alguma reação bioquímica.

Os métodos condutimétricos utilizam-se de correntes não faradaicas, ou seja, uma corrente alternada de baixa amplitude e determinada frequência é utilizada. O sinal que é medido reflete a migração de todos os íons na solução e só pode ser usado em amostras que possuam condutividade idêntica (15).

Na Figura 5 podemos observar a migração dos íons na solução, que geram determinada resistência na difusão e, por conseguinte, variação na condutividade.

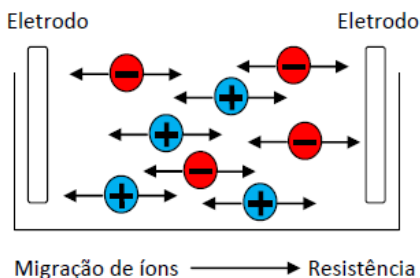


Figura 5: Mecanismo de transdução condutimétrica.

2.2.1.2 Termométricos

Transdutores térmicos são aqueles que medem a variação na temperatura da solução, em relação a alguma reação específica que esteja ocorrendo. O princípio básico por trás desse transdutor é que, toda reação bioquímica envolve uma variação na entalpia que é proporcional à variação de temperatura e será detectada pelo biossensor (7) (15).

A magnitude do sinal de medida ΔT , resulta da variação da entalpia ΔH e do calor específico c_p do dispositivo, e é representado quantitativamente pela seguinte expressão:

$$\Delta T = \frac{n\Delta H}{c_p} \quad (3)$$

onde n é o número de moles do analito.

2.2.1.3 Ópticos

Os transdutores ópticos medem as radiações eletromagnéticas, absorvidas ou emitidas, pelo produto de complexas reações bioquímicas que ocorrem no ambiente analisado.

2.2.1.4 Piezoelétricos

Esse tipo de transdutor tem como base gerar dipolos elétricos, sujeitando um cristal natural anisotrópico ao stress mecânico. Se o eletrodo incorporar (adsorver) alguma quantia do analito, a massa do cristal é incrementada, resultando numa alteração na frequência de oscilação do cristal.

2.3 BIOSSENSORES NÃO ENZIMÁTICOS DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

O peróxido de hidrogênio é um composto comumente encontrado na natureza e que possui grande importância clínica, farmacêutica, ambiental, entre outros. Em organismos vivos o H_2O_2 desempenha um papel fundamental na sinalização de diversos processos biológicos, aparecendo como subproduto de diversas reações bioquímicas catalisadas por enzimas como glucose oxidase (GOx), álcool oxidase (AOx), lactato-oxidase (LOX), colesterol oxidase (ChoOx), lisina oxidase (LyOx), oxalato oxidase (OxaOx) e outras moléculas bioativas.

Devido à grande incidência de peróxido de hidrogênio em sistemas biológicos, como subproduto de diversas reações enzimáticas, o interesse no desenvolvimento de sensores de peróxido de hidrogênio nos últimos anos vem crescendo de forma acelerada. Sua identificação e quantificação podem ser utilizadas para analisar o progresso de determinadas reações bioquímicas.

Para a determinação de H_2O_2 podem ser usadas moléculas bioativas, como enzimas, por exemplo. Entretanto, a utilidade de um sensor enzimático é limitada pela perda gradual de atividade enzimática (34) (35). A falta de estabilidade a longo prazo, resultante da lixiviação da enzima devido a ligações fracas ou dissolução durante o uso, além da natureza intrínseca da enzima, fazem com que novas estratégias de detecção sejam desenvolvidas.

Em vista disso, surgem os biossensores não enzimáticos, que possuem a vantagem de contornar esses problemas de estabilidade

referentes à enzima, e mesmo assim cumprir seu papel na detecção de peróxido de hidrogênio.

Na construção de sensores não enzimáticos são utilizados em geral materiais que possuem propriedades catalíticas para a reação de redução do H_2O_2 . Dentre esses materiais, é possível citar nanopartículas de metais de transição (platina (Pt), paládio (Pd), cobre (Cu), irídio (Ir), ferro (Fe), etc.), azul da Prússia, nanotubos de carbono, entre outros (36). Dentre as principais atribuições desses materiais, encontra-se a grande relação de área/volume, excelente condutividade e extraordinária atividade eletrocatalítica (37) (38).

2.4 BIOSSENSORES DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Uma área de grande importância econômica e ambiental reside no desenvolvimento de biossensores utilizados para a detecção de compostos fenólicos (39), já que um considerável número de poluentes presentes no meio ambiente possui estrutura fenólica.

Esses compostos são largamente encontrados na natureza como componentes naturais da madeira, sendo responsáveis pelas propriedades organolépticas de muitas frutas e flores, e influenciando em muitos casos a qualidade dos alimentos, principalmente sucos e bebidas alcoólicas.

Fenóis e seus derivados são conhecidos por sua considerável toxicidade e persistência no ambiente, sendo comumente encontrados em efluentes industriais como consequência de atividades de produção industrial (40). Esses compostos afetam o gosto e cheiro de águas potáveis e podem contaminar peixes e plantas mesmo em baixas concentrações, devido à facilidade com que penetram na pele e em membranas celulares (40) (41). Em vista disso, podemos encontrar esses componentes catalogados na lista de substância perigosas e poluentes prioritários da Comissão Europeia (42) e da Agência de Proteção Ambiental Americana (43).

Dentro desse contexto, torna-se imprescindível um monitoramento contínuo dos cursos de águas naturais e dos inúmeros efluentes industriais existentes. Entretanto, a maioria das técnicas empregadas nesse monitoramento ainda é muito dispendiosa em termos de tempo e custos. Essa necessidade de métodos alternativos mais versáteis, rápidos e baratos para a determinação analítica de poluentes gera grandes expectativas em relação aos biossensores, ilustrando sua importância como ferramenta para suplementar outras técnicas analíticas.

Biossensores desse tipo podem possuir diversos arranjos, além de utilizar uma grande variedade de componentes biocatalíticos (enzimas, anticorpos, microorganismos, etc.). Na maior parte dos casos esses componentes biológicos são compostos por enzimas, e dentre elas encontra-se a tirosinase (Ty), que possui o papel de catalisar a reação com compostos fenólicos, como por exemplo, catecol, resorcinol, hidroquinona, entre outros, todos formados basicamente por um anel aromático como cadeia principal com uma ou mais hidroxilas ligadas a ele (radicais), como é possível observar na Figura 6.

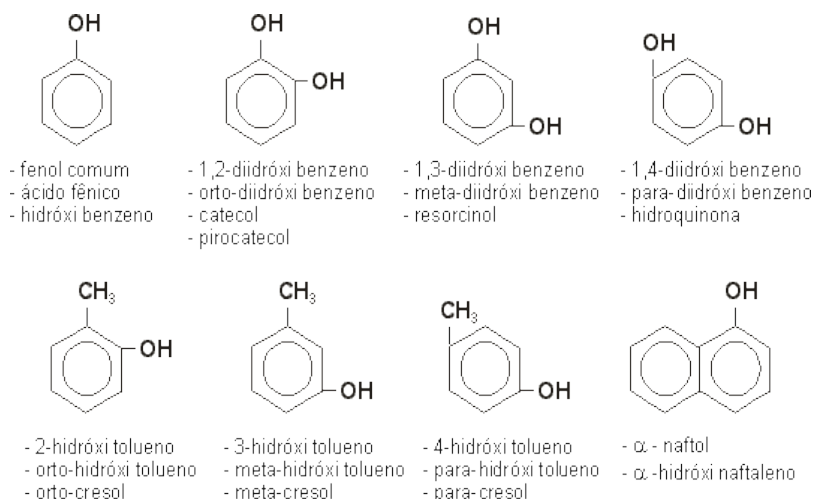


Figura 6: Diferentes espécies de compostos fenólicos.

2.4.1 Tirosinase

Atualmente mais de 3000 enzimas são conhecidas e agrupadas em seis classes, de acordo com o tipo de reação que é catalisada. Entretanto, somente um número limitado de enzimas é utilizado para propostas analíticas em sensores (15). As classes nas quais essas enzimas são classificadas são as seguintes: oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases.

<i>Classe</i>	<i>Nome</i>	<i>Função</i>
1	Oxidoredutases	Catalisam reações de oxirredução. Transferem elétrons, hidretos (H) ou prótons (H ⁺).
2	Transferases	Transferem grupos químicos entre moléculas.
3	Hidrolases	Utilizam a água como receptor de grupos funcionais de outras moléculas.
4	Liases	Formam ou destroem ligações duplas, respectivamente retirando ou adicionando grupos funcionais.
5	Isomerases	Transformam uma molécula num isômero.
6	Ligases	Formam ligações químicas por reações de condensação, consumindo energia sob a forma de ATP.

Tabela 1: Diferentes classes de enzimas.

A tirosinase faz parte da classe das oxidoredutases, que são as enzimas que catalisam as reações de oxidação e redução por transferência de hidrogênio ou elétrons (44). Ainda dentro dessa classe é possível observar uma subdivisão para as enzimas que apresentam importância analítica, sendo elas as dehidrogenases, oxidases, peroxidases e oxigenases. No caso da tirosinase, que faz parte das enzimas do tipo oxidases, a mesma atua em doadores pareados com incorporação de oxigênio molecular. Num caso específico, elas são responsáveis por catalisar, por exemplo, a reação com o catecol, onde os hidrogênios removidos do analito se combinam com o oxigênio molecular para formar água (44).

A tirosinase (EC 1.14.18.1) é extraída a partir de cogumelos. Trata-se de uma enzima tetramérica oxidoredutase com dois sítios ativos por molécula para substratos aromáticos, sendo cada um desses sítios constituídos de dois átomos de cobre coordenados com histidinas, que é o centro redox envolvido na transferência de elétrons, ou seja, o responsável pelas propriedades de redox da enzima (45).

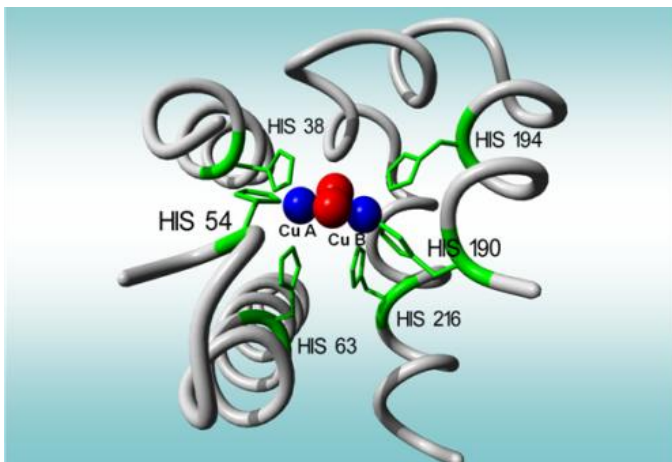
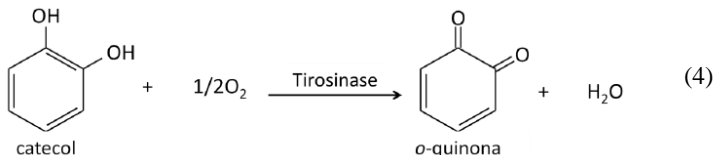


Figura 7: Estrutura molecular e sítios ativos da enzima tirosinase (126).

A tirosinase possui massa molecular de aproximadamente 55 kDa (unidades de massa atômica) em condições naturais, sendo sua densidade da ordem de $1,37 \text{ g/cm}^3$ (46). Considerando esses valores e assumindo que a enzima possui simetria esférica, é possível estimar o volume e, conseqüentemente, o raio de uma tirosinase isolada, que é da ordem de 2,5 nm.

2.4.2 Princípio de funcionamento

Como citado anteriormente, as enzimas do tipo oxidase são caracterizadas por catalisar a transferência de hidrogênio do analito para o oxigênio molecular, sendo dessa forma, possível observar que, como subproduto da reação haverá a produção de água (47).



Analisando a eq. 4 é possível observar que o catecol atua como um analito suicida para a tirosinase, culminando numa inativação da enzima durante a oxidação (48). O catecol, também conhecido como pirocatecol ou 1,2-dihidroxibenzeno, é um composto orgânico com a fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$. Ele é o ortoísômero dos três benzenodióis isoméricos Figura 8.

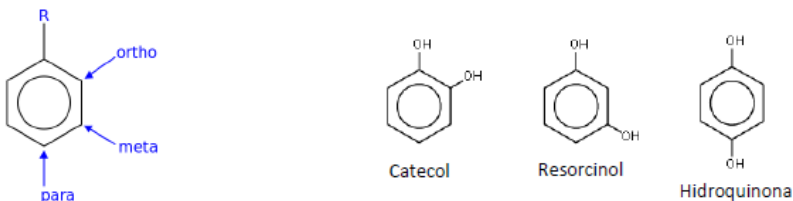


Figura 8: Principais padrões de substituição de arenos e os três benzenodióis isoméricos.

A tirosinase exibe atividade oxidase (difenolase) para *o*-difenóis que são convertidos a *o*-quinonas. Nesse processo o *o*-difenol é oxidado à sua correspondente *o*-quinona (a atividade difenolase da enzima), enquanto que a enzima é oxidada de volta à sua forma nativa pelo oxigênio.

A reação representada pela eq. 4 ocorre via três estados, relacionados com os estados de oxidação dos centros ativos (íons de cobre) da enzima chamados E_{ox} ($Cu^{2+}-O_2-Cu^{2+}$), E_{met} ($Cu^{2+}-OH-Cu^{2+}$) e E_{dox} (Cu^+-Cu^+). O ciclo catalítico da tirosinase está representado na Figura 9 e pode ser representado pelas eq. 5, 6 e 7 (39). Ele ilustra a participação dos íons de cobre na transferência de elétrons e a redução do oxigênio até a formação da água (49).

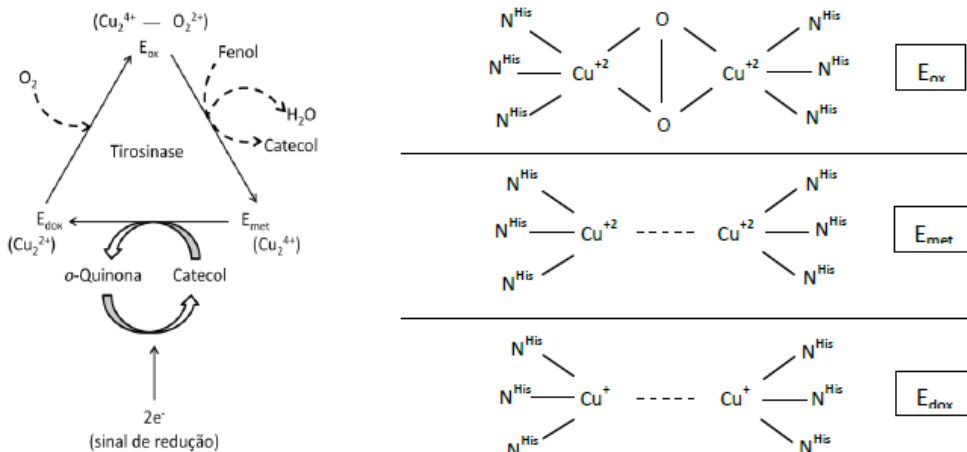
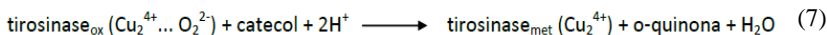
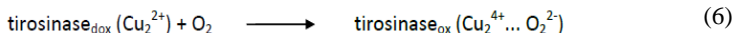
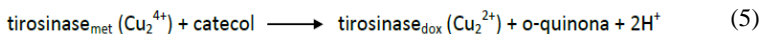


Figura 9: Mecanismo de detecção de catecol através da enzima tirosinase (à esquerda) e os estados dos sítios ativos da enzima durante o processo (à direita).



Na ausência de qualquer analito, mais de 80% da proteína está no estado E_{met} , que representa o estado de “repouso” da tirosinase. Nesse estado os dois átomos de cobre são ligados por íons hidroxila. O estado E_{met} é convertido no estado E_{dox} por uma redução de dois elétrons no qual *o*-quinonas são liberadas (Eq. 5).

A seguir o estado E_{dox} acrescenta reversivelmente O_2 levando ao estado E_{ox} , onde o oxigênio é ligado como um peróxido entre os átomos de cobre (Eq. 6).

No estado enzimático E_{ox} , o *o*-difênol (catecol) é oxidado à sua correspondente *o*-quinona com a formação de H_2O , enquanto que a enzima volta ao estado E_{met} (Eq. 7).

Parte da importância analítica dos biossensores amperométricos vem do fato desses dispositivos aperfeiçoarem o processo de determinação de compostos fenólicos, eliminando diversos problemas que surgem quando se faz uma oxidação eletroquímica direta desses compostos.

Devido a um grande número de reações paralelas que podem ocorrer na oxidação direta desses compostos, pode haver um processo de passivação da superfície do eletrodo, devido à formação de produtos poliméricos. Outro problema atrelado a esse procedimento refere-se à sobrevoltagem necessária no processo, que intensifica de forma sensível o nível de ruído da medida.

Podendo operar em potenciais próximos de 0 V, os biossensores amperométricos reduzem de forma significativa a contribuição de espécies interferentes na medida. A corrente medida nesse contexto é aquela gerada pela reação de oxiredução das espécies eletroativas biocatalisadas pela enzima na superfície do eletrodo.

O processo bioquímico envolvido descreve reações que ocorrem na interface eletrodo/eletrólito onde as moléculas da enzima (nesse caso a tirosinase) imobilizadas na superfície do eletrodo, após serem oxidadas pelo oxigênio molecular, são reduzidas pelos compostos fenólicos (catecol) presentes no eletrólito em questão. Nessa etapa, o catecol é convertido basicamente em *o*-quinonas e/ou radicais livres que podem ser facilmente reduzidos na superfície do eletrodo em potenciais

próximos de zero, reduzindo dessa forma a influência de compostos interferentes que aumentem o nível de ruído na medida.

A corrente de redução detectada no eletrodo é proporcional à concentração de catecol na solução, o que por sua vez possibilita extrair informações qualitativas e quantitativas do sistema. Esse método de detecção amperométrica, através dos subprodutos das reações bioquímicas entre o biocomponente e o analito, além de serem simples de construção e manuseio e baratos, evitam o acúmulo de produtos secundários na superfície do eletrodo, que os tornam passivados e com sua sensibilidade reduzida, além de que trabalham num intervalo de potencial próximo de zero, ótimo para medidas eletroquímicas.

2.5 POLÍMEROS CONDUTORES

Os materiais conhecidos como polímeros intrinsecamente condutores, ou polímeros eletroativos conjugados, vêm atraindo muita atenção devido à sua vasta gama de aplicações e suas interessantíssimas propriedades elétricas, eletrônicas, magnéticas e ópticas (50), as quais anteriormente só eram encontradas em sistemas inorgânicos.

Eletronicamente, os polímeros condutores diferem de toda a família de semicondutores cristalinos inorgânicos, como o silício, em dois importantes aspectos: polímeros são sólidos moleculares por natureza e não possuem ordem de longo alcance. Suas propriedades únicas emergem do fato de possuírem uma conjugação π estendida ao longo de sua estrutura, o que faz com que possuam grande interesse tecnológico e científico (51).

Atualmente é possível encontrar uma grande variedade de artigos científicos sobre polímeros condutores na literatura, sendo que muitos deles têm sido amplamente empregados na construção de biossensores na imobilização de agentes biológicos como enzimas. Dentro dessa nova classe de polímeros pertencentes aos polienos e poliaromáticos, é possível identificar o polipirrol (PPy), polianilina (PANI), poliacetileno (PA), polifenol (PP), politiofeno (PT), poli (*p*-fenileno) (PPP), poli (*p*-fenileno vinileno) (PPV), entre outros (12) (13).

Na Figura 10 é possível observar a estrutura química dos principais polímeros condutores estudados atualmente na forma reduzida e não dopada.

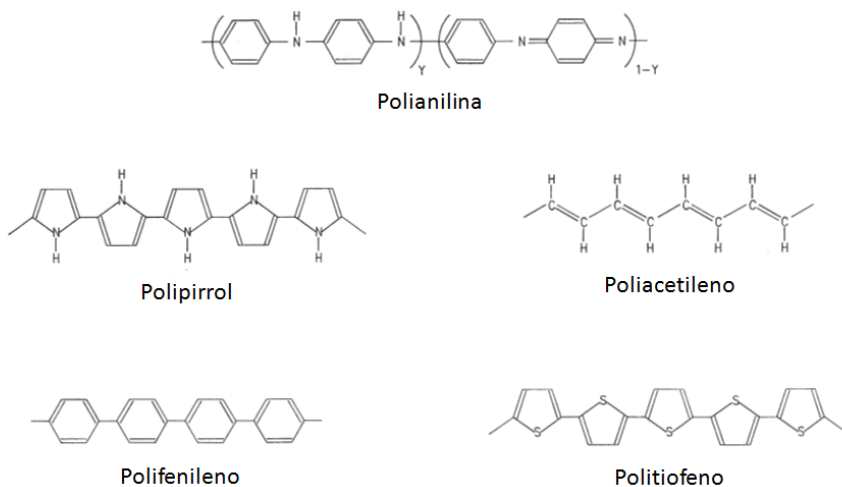


Figura 10: Estrutura química dos principais polímeros condutores estudados na forma reduzida e não dopada.

A base de muitas das aplicações desses polímeros condutores reside na notável capacidade desses materiais alternarem estados condutores oxidados (dopados, onde ânions são incorporados) e isolantes reduzidos (desdopados, polímero neutro), podendo apresentar intervalo de condutividade típica de um semicondutor até condutor. Entre as principais aplicações é possível ressaltar dispositivos eletrônicos, telecomunicações, sistemas de armazenamento eletroquímico, eletrônica molecular e sensores (52) (53) (54) (55).

Dentre as diversas aplicações desses materiais, aquela que mais interessa ao desenvolvimento desse trabalho está relacionada com a habilidade que os polímeros condutores possuem de transferir eficientemente carga elétrica produzida por reações bioquímicas para circuitos eletrônicos (56). Essa propriedade, juntamente com a possibilidade de imobilizar enzimas em filmes de polímero condutor, está no alicerce da fabricação de biossensores amperométricos.

2.5.1 Propriedades

As características singulares dos polímeros condutores, como suas propriedades eletrônicas, condutividade elétrica, energia óptica de transição, baixo potencial de ionização e alta afinidade eletrônica,

devem-se à sua estrutura de elétrons π conjugada. Esses materiais muitas vezes são chamados de “metais sintéticos” devido ao fato desses polímeros orgânicos possuírem valores bastante altos de condutividade elétrica e fazerem parte de uma classe de polímeros que possui características de semicondutores tipo- p (com lacuna de energia de 2,2 eV).

Os polímeros condutores possuem uma estrutura que é formada basicamente por longas cadeias orgânicas com ligações simples (C-C) e duplas (C=C) alternadas (Figura 10), que são conhecidas como sistemas conjugados. Esse tipo de configuração decorre da hibridização sp^2 dos átomos de carbono (57), onde há a formação de três orbitais sp^2 num mesmo plano e um orbital p perpendicular a este plano (Figura 11) (11).

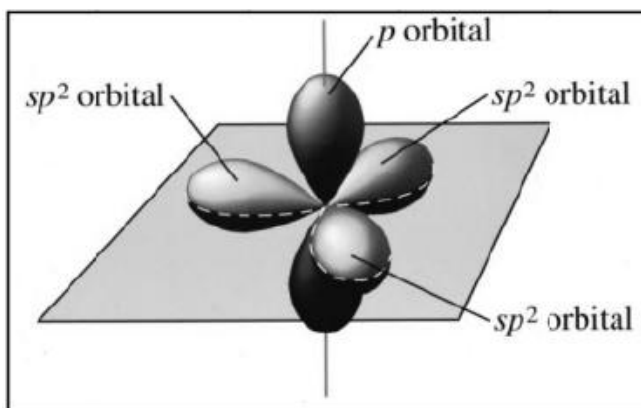


Figura 11: Representação dos orbitais do átomo de carbono na hibridização sp^2 .

Nessa configuração, três dos elétrons de valência do átomo de carbono ocupam os orbitais sp^2 , sobrepondo-se aos orbitais sp^2 dos átomos vizinhos e formando ligações σ com os mesmos. As ligações σ são caracterizadas por serem ligações químicas fortes e unirem os átomos de carbono na cadeia principal. O quarto elétron de valência do átomo de carbono ocupa o orbital p , sendo que, dois orbitais p de átomos de carbono vizinhos interagem entre si através de ligações π , ligações mais fracas e espacialmente estendidas (58) (59).

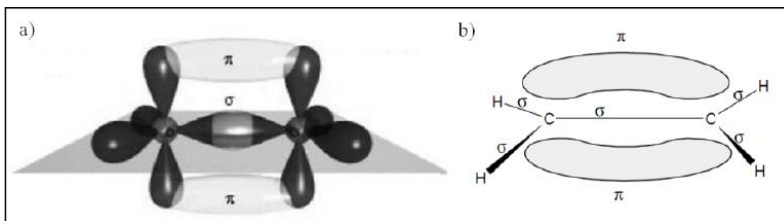


Figura 12: a) Esquema que representa as ligações σ e π entre dois átomos de carbono e ilustra como a ligação π é espacialmente estendida. b) Exemplo das ligações σ e π de uma molécula de etileno (C_2H_4). Nesse caso os carbonos fazem duas ligações simples (σ) com os átomos de hidrogênio e uma ligação dupla (σ e π) com o outro átomo de carbono.

As ligações simples são formadas basicamente por ligações σ , ao passo que as ligações duplas dos átomos de carbono são uma combinação de ligações σ e π (Figura 12), onde um dos elétrons da ligação dupla é compartilhado por dois átomos e fica parcialmente deslocalizado na cadeia polimérica.

As ligações simples e duplas diferem também em seu tamanho, já que os átomos de carbono ligados por uma ligação simples estão mais afastados que aqueles ligados por ligações duplas, o que faz com que os elétrons deslocalizados na ligação π não fiquem totalmente livres para se mover na cadeia polimérica (60) Dessa forma, a estrutura conjugada dos polímeros condutores impede, em princípio, a condução eletrônica. Para que esse tipo de material efetivamente obtenha caráter condutor é necessário que haja uma variação parcial de cargas, que depende do nível de dopagem do polímero.

A importância da ligação π nesses materiais reside no fato de originar orbitais moleculares ocupados π e vazios π^* , denominados HOMO (*highest occupied molecular orbital*) e LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*), respectivamente, e análogos às conhecidas bandas de valência (BV) e de condução (BC) dos semicondutores inorgânicos (61) (62). A diferença de energia entre HOMO e LUMO, chamada gap π - π^* , determina as propriedades elétricas dos polímeros conjugados, sendo que em sua forma não dopada essa energia é maior que 1,5 eV. Nesse caso os polímeros são intrinsecamente isolantes ou semicondutores.

Devido ao fato das ligações π possuírem baixo potencial de ionização, os elétrons desses orbitais são fracamente ligados e podem ser facilmente removidos do orbital π (oxidação polimérica), ou adicionados ao orbital π^* (redução polimérica), sem comprometer as

ligações σ , que possuem a função de unir os monômeros na cadeia principal.

A remoção ou adição de elétrons torna o polímero positivamente ou negativamente carregado, respectivamente, tornando-se necessária a introdução de um ânion ou cátion no sistema, de forma que seja mantida a neutralidade de cargas. Esse processo é conhecido como dopagem, e aos íons incorporados no sistema, é dado o nome de dopantes, que podem ser agentes oxidantes (dopagem tipo-p) ou agentes redutores (dopagem tipo-n) (62).

Existem algumas diferenças relevantes entre os processos de dopagem polimérica e dos semicondutores inorgânicos que devem ser consideradas. No caso da dopagem de um polímero os dopantes (que podem chegar a 50% em massa (63)) são introduzidos nas vizinhanças da cadeia polimérica, enquanto que no caso dos semicondutores inorgânicos, as “impurezas” (da ordem de parte por milhão - ppm) são introduzidas nas próprias cadeias, sendo que em ambos os casos a estrutura do material não se altera.

A condutividade dos polímeros condutores pode ser estudada com base no modelo teórico desenvolvido por Brédas e Street. Esse modelo será discutido a seguir considerando o comportamento do polímero condutor polipirrol (PPy) (62).

Como pode ser observado na Figura 13, o PPy na forma neutra possui uma estrutura aromática, ao passo que, na forma ionizada sua estrutura está na forma quinóide.

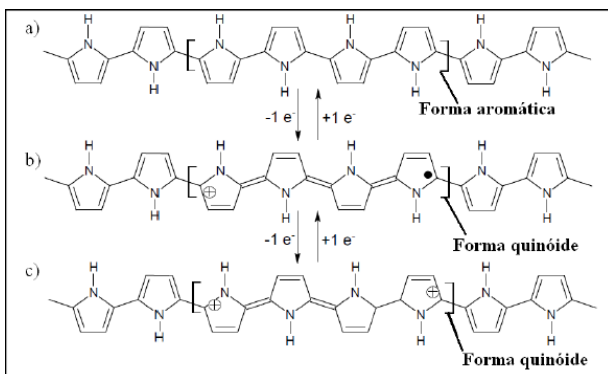


Figura 13: Estrutura do polipirrol (PPy) em seu estado: a) neutro (forma aromática), b) oxidado, com a formação de polaron e conseqüente deformação local (forma quinóide) e c) com maior nível de oxidação e formação do bipolaron (forma quinóide).

Com a saída de um elétron do polímero (oxidação da cadeia polimérica), há o surgimento de uma vacância em sua estrutura, que leva inicialmente à formação de um radical catiônico. Entretanto, como o movimento dessa vacância está limitado a apenas algumas cadeias do monômero, aproximadamente quatro anéis pirrólicos (Figura 13), ocorre uma deformação local devido ao surgimento do radical catiônico que é denominado polaron, que estabiliza-se polarizando o meio ao seu redor (deformação da rede). Esse polaron possui valor de spin igual a $\frac{1}{2}$ e leva, conseqüentemente, ao surgimento de estados eletrônicos dentro do gap de energia (8).

O fato de aumentarmos a dopagem do sistema resulta num número maior de elétrons arrancados em regiões distintas e, por conseguinte, a criação de mais polarons, ou ainda, o elétron desemparelhado devido à criação do primeiro polaron pode ser removido. Nesse tipo de sistema podem surgir novos níveis de energia no meio da banda proibida, o que resulta no chamado dicátion ou bipolaron. O bipolaron é definido como um par de cargas iguais associado a uma forte distorção da rede local, que possui spin igual a zero. O sistema, quando fortemente dopado, têm seus níveis sobrepostos, formando bandas estreitas dentro do gap, denominadas bandas bipolarônicas (Figura 14).

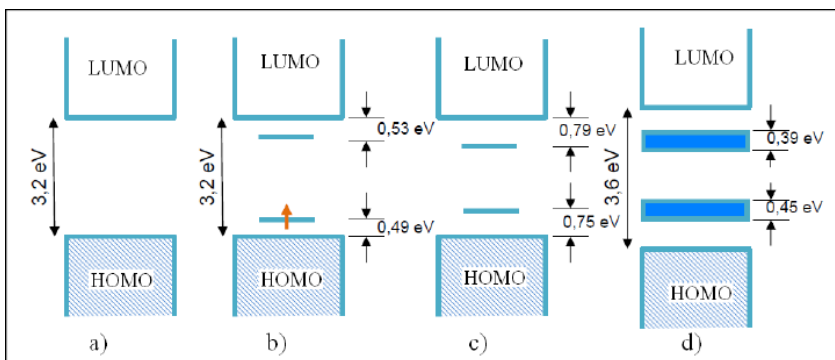


Figura 14: Evolução das bandas de energia do PPy com a variação do nível de dopagem: a) polímero neutro, b) polímero fracamente dopado (formação de polaron), c) polímero com médio nível de dopagem (formação do bipolaron) e d) polímero fortemente dopado, acima de 30% em massa (formação de bandas bipolarônicas).

A energia gasta para a formação de dois polarons é praticamente a mesma para se ter um bipolaron. Entretanto, o bipolaron tem a vantagem de ser termodinamicamente mais estável, devido à diminuição no valor da energia de ionização do polímero.

A notável capacidade desses materiais alternarem estados condutores e isolantes por meio de processos eletroquímicos representa uma grande vantagem e a base para muitas de suas aplicações. No caso do PPy, o processo de oxidação é atingido quando há a introdução de ânions, que podem ser, entre outros, de ClO_4^- , Cl^- ou dodecilbenzenossulfonato (DBSA) e o polímero torna-se condutor. Dessa forma, elétrons são retirados, deixando-o positivamente carregado, sendo que o ânion se incorpora ao material atingindo a neutralidade de cargas (8).

2.5.2 Eletropolimerização

Uma das principais vantagens da eletropolimerização frente a outras técnicas de síntese do PPy reside no fato de que, na primeira, há um maior controle dos parâmetros de produção do polímero, sendo possível controlar precisamente a espessura dos filmes depositados. Nesse processo, o polímero é oxidado devido a um potencial aplicado na célula eletroquímica, sendo que os contra-íons são incorporados (dopagem) para neutralizar a carga.

É possível encontrar na literatura diversos mecanismos que têm sido propostos para a polimerização de monômero pirrol, sendo o mais provável a formação de um radical catiônico, acoplamento do radical e deprotonação (64) (65) (66). Esse mecanismo de eletropolimerização é conhecido como mecanismo de Diaz, sendo ele o mais comentado na literatura.

O polipirrol é preparado por oxidação anódica do monômero para potenciais específicos. O processo de polimerização eletroquímica do monômero leva à formação do PPy dopado, de acordo com o esquema que está representado abaixo:

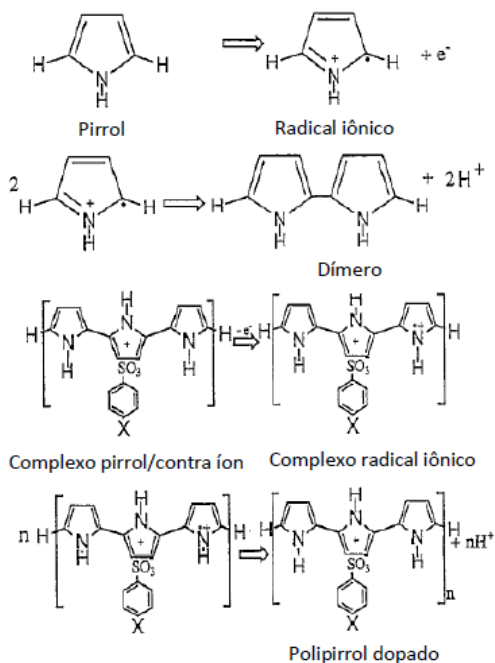


Figura 15: Processo de polimerização eletroquímica do monômero pirrol e a posterior formação de PPy dopado.

Como se observa no esquema representado pela Figura 15, primeiramente o monômero de pirrol é oxidado na superfície do eletrodo, culminando então na formação de um radical catiônico extremamente reativo (67). Devido ao potencial aplicado, praticamente todos os monômeros perto do eletrodo são oxidados, resultando numa alta concentração de radicais catiônicos. Em seguida, esse radical pode reagir com outro radical catiônico monomérico, um radical catiônico oligomérico ou um monômero neutro, para formar um radical catiônico dimérico ou dímero dicatiônico.

A partir desse ponto, devido a uma transferência de carga, o dímero catiônico perde dois prótons (H^+) das posições 2 e 5 dos anéis pirrólicos para formar dímeros ou oligômeros (etapa de estabilização), os quais são predominantemente um acoplamento α - α' (situação onde a conjugação entre as ligações simples e duplas é maximizada).

Os oligômeros e dímeros formados têm um potencial de oxidação menor que os próprios monômeros, de forma que, nessa etapa,

a oxidação ocorre preferencialmente no dímero, indicando que a formação do PPy envolve um passo de nucleação e a formação do polímero leva a uma propagação em cadeia, culminando na precipitação do polímero policatiônico na superfície do eletrodo.

Essa deposição do polímero condutor na superfície do eletrodo ocorre somente quando as cadeias poliméricas se tornam “pesadas demais” e superam o limite de solubilidade específica do polímero no meio eletrolítico (64) (68) (69) (70) (71). A cadeia polimérica final não se encontra na forma neutra, pois ela não passa pelo estágio de liberação de prótons, e por isso é positivamente carregada (polication). Nessa configuração, uma unidade de carga positiva é distribuída para cada 3 ou 5 unidades de pirrol, sendo contrabalanceada pela incorporação de um ânion presente no eletrólito, que é a chamada dopagem polimérica.

A eficiência da eletropolimerização do pirrol pode ser determinada por análises conjuntas de coulometria (onde o número de elétrons envolvidos na reação é determinado) e perfilometria (que fornece informações referentes à espessura do depósito). Durante a eletropolimerização do pirrol, dois elétrons e dois átomos de hidrogênio são liberados para cada unidade de pirrol formar as ligações C – C nas posições 2 e 5 do anel pirrólico (67). A eficiência da eletropolimerização anódica pode ser estimada a partir da seguinte relação.

$$\eta = \frac{m_{exp}}{m_{teo}} \quad (8)$$

onde η é a eficiência da eletropolimerização, m_{exp} está relacionado com a massa de polipirrol eletropolimerizada no processo e medida experimentalmente, e m_{teo} a massa prevista teoricamente.

O número de elétrons envolvidos na eletropolimerização é registrado na forma de corrente elétrica em função do tempo. Calculando a área sobre a curva, por integração, é possível obter a carga total depositada. Sabendo o número de elétrons envolvidos, utiliza-se a carga para encontrar um valor teórico para o número de unidades pirrólicas envolvidas no processo de eletropolimerização. Isso é feito usando a seguinte relação:

$$m_{teo} = \frac{Q}{(2\delta + 1).F} \quad (9)$$

onde Q é a carga total representada por unidade de Coulomb (C), δ é o número de unidades pirrônicas por unidade de contra ânion incorporado no processo e F é a constante de Faraday representada por C/mol. O valor 2 na eq. 9, refere-se ao fato de 2 elétrons serem transferidos para cada unidade pirrônica incorporada no polímero. A unidade que é somada no denominador refere-se ao fato de que os elétrons transferidos para o eletrodo não são exclusivamente advindos da polimerização do pirrol, mas também da incorporação de um contra íon no polímero. O número de unidades de pirrol para cada contra íon incorporado pode ser obtido a partir de análises elementares, sendo que, para o DBSA, esse valor é de aproximadamente três unidades de pirrol para cada contra íon incorporado (Figura 16).

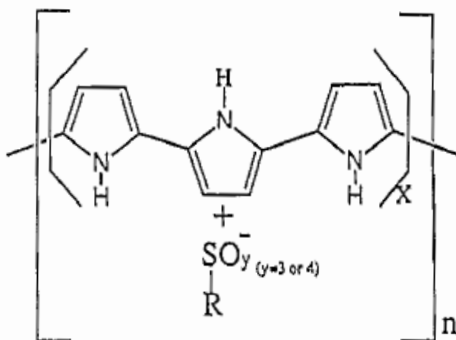


Figura 16: Proporção unidade pirrônica/contra íon incorporado do eletrólito de suporte.

R = Tolueno, dodecilbenzeno ou H.

X = 3 para o DBSA e 5 para o H₂SO₄.

2.5.3 PPy e aplicação em biossensores

Na área de química analítica, o problema da seletividade em baixíssimas concentrações do analito e a interferência de outras substâncias presentes na solução são de extrema importância (7). Dentro desse contexto, os polímeros condutores têm sido utilizados com muito sucesso como matrizes na imobilização de diversas enzimas, sendo aproveitados para aumentar a velocidade, sensibilidade, seletividade e versatilidade dos biossensores, principalmente em diagnóstico médico e monitoramento ambiental (72).

O polipirrol tem sido até o momento o polímero condutor mais investigado e utilizado na construção de biossensores amperométricos (13), fato este que se atribui às seguintes características:

- Boa aderência do PPy em uma ampla gama de materiais, que podem ser utilizados como eletrodos;
- A possibilidade de introdução de grupos funcionais;
- Aumento da área superficial do eletrodo, devido a uma rede polimérica ramificada;
- Habilidade de controlar as propriedades do filme de polímero condutor, variando as condições durante a polimerização eletroquímica;
- Estabilidade em condições ambiente;
- Possibilidade de preparação a partir de soluções aquosas neutras, fato que possibilita a imobilização de um grande número de enzimas sem comprometer sua atividade catalítica;
- O monômero é facilmente oxidado, solúvel em água e tem boas propriedades redox;
- Camadas de PPy previnem a lixiviação para fora da camada biocatalítica;
- Condutividade que lhe garante a função de retransmissora de elétrons.

Dentro desse contexto, é possível encontrar na literatura inúmeros trabalhos que, além de utilizar o PPy como parte da configuração dos eletrodos, ainda buscam explorar geometrias diferenciadas para a otimização dos parâmetros de detecção amperométrica.

Na Figura 17a, observa-se um eletrodo onde Tirosinase (Ty) foi imobilizada em filmes de PPy, formados a partir da eletropolimerização galvanostática do monômero sobre uma superfície de carbono vítreo (73). Esse tipo de sensor apresentou boa linearidade para concentrações entre 5,6 e 74,3 mM, com sensibilidade de $70,2 \text{ mA} \cdot \text{mM}^{-1}$ (Figura 17b) e tempo de resposta entre 40 e 75 s.

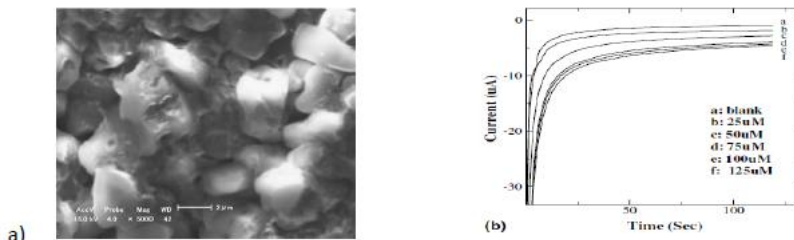


Figura 17: Referência: Rajesh et al. Reactive & Functional Polymers 59 (2004) 163-169. a) Estrutura de PPy e Ty. b) Relação da corrente com os acréscimos de catecol.

No próximo exemplo (Figura 18a e Figura 18b), são apresentados microestruturas de PPy crescidas a partir de diversas etapas eletroquímicas, sobre suportes de platina e aço inoxidável (74). Nesses eletrodos é imobilizada a enzima GOx, e medidas amperométricas são realizadas para os sensores microestruturados e compactos (Figura 18c e Figura 18d).

Os eletrodos microestruturados PPy/GOx apresentaram linearidade que varia de 0 a 17 mM e tempo de resposta de 20 s. A sensibilidade desses eletrodos é de aproximadamente $660 \text{ nA} \cdot \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$, o dobro da sensibilidade medida para eletrodos compactos.

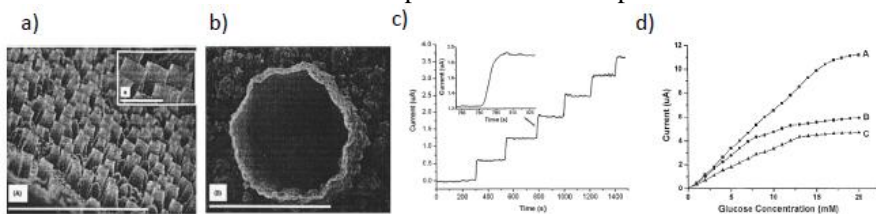


Figura 18: Referência: M. Ma et al. J. Appl. Polym. Sci. 98, (2005) 2550–2554. a) Microestrutura de PPy e b) maior magnificação dessas estruturas. c) Cronoamperometria típica para esses eletrodos. d) Respostas amperométricas para os eletrodos microestruturados de PPy/GOx/Pt (A), PPy/GOx/Aço (B) e compactos de PPy/GOx/Pt (C), todos com GOx.

No exemplo a seguir, observa-se mais uma vez a utilização de nanotubos de carbono na fabricação dos eletrodos (75). Esses eletrodos foram produzidos por síntese eletroquímica, onde o PPy foi eletropolimerizado a partir de um eletrólito contendo nanotubos de carbono, sobre um suporte de carbono vítreo.

Medidas foram realizadas para os eletrodos com e sem a enzima GOx, para termos de comparação. As respostas amperométricas foram otimizadas para os eletrodos de PPy/nanotubos de carbono/GOx, com sensibilidade em relação a glicose da ordem de $95 \text{ nA} \cdot \text{mM}^{-1}$, linearidade acima de 4 mM e tempo de resposta em torno de 8 s.

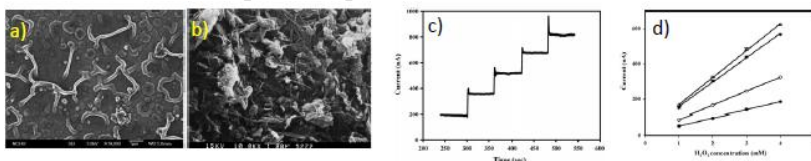


Figura 19: Referência: Y. C. Tsai et al. Biosensors and Bioelectronics 22 (2006) 495–500. a) Filme de PPy e b) PPy/Nanotubos de carbono, ambos sobre um suporte de carbono vítreo. c) e d) respostas amperométricas para adições de H₂O₂.

A nanoestrutura da Figura 20a foi obtida a partir de uma membrana de alumina nanoporosa, onde foi incorporado PPy via polimerização eletroquímica (76). A imobilização da enzima (horseradish peroxidase) ocorre por *drop coating* da solução com a enzima. A detecção de H_2O_2 foi realizada para diferentes potenciais aplicados e apresentou valores de sensibilidade bastante altos, entre 1 e $3,8 A.M^{-1}.cm^{-2}$. A região linear do sensor fica entre 10 nM e 25 μM com um tempo de resposta da ordem de 5 s.

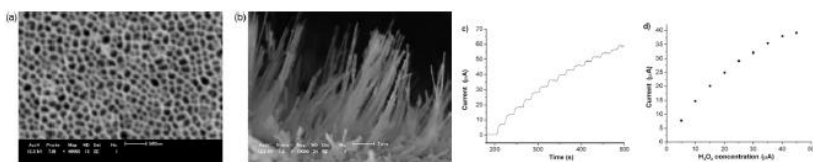


Figura 20: Referência: E.M.I.M. Ekanayake et al. Sensors and Actuators B 132 (2008) 166–171. a) Micrografias de um sensor de alumina/Pt/PPy. b) Estrutura do PPy nanoporoso após a remoção da alumina. c) e d) Respostas amperométricas do sensor com a adição de H_2O_2 .

O próximo trabalho (Figura 21) apresenta um eletrodo produzido por litografia tradicional, onde uma máscara foi colocada sobre um polímero fotossensível que em seguida é exposto à radiação UV (77). Dessa forma ocorre a formação de diversos pilares de carbono com diferentes alturas e espaçamentos (da ordem de micrômetros). Os pilares são então revestidos, via eletropolimerização, com PPy e GOx.

As respostas amperométricas para a sensibilidade desses eletrodos variam entre 1,02 e $2,02 A.M^{-1}.cm^{-2}$. O tempo de resposta é de aproximadamente 20 s com linearidade entre 0,5 e 20 mM.

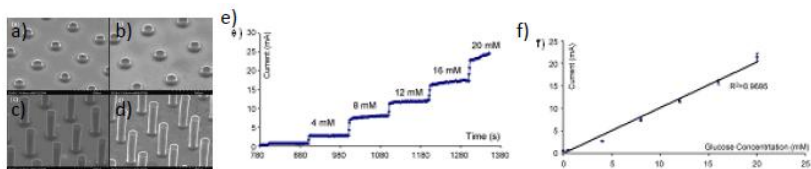


Figura 21: Referência: H. Xu et al. Biosensors and Bioelectronics 23 (2008) 1637–1644. a) e c) microestruturas de carbono produzidas por litografia. b) e d) As mesmas microestruturas de carbono com revestimento de PPy e GOx. e) e f) respostas amperométricas típicas para esse eletrodo.

O exemplo a seguir (Figura 22a) ilustra a eletropolimerização do PPy na presença de Ty e nanotubos de carbono em carbono vítreo. No decorrer do processo, o polímero incorpora a Ty e os nanotubos (78). Das medidas amperométricas é possível evidenciar a eficiência desses eletrodos na detecção de dopamina (Figura 22b) e sua seletividade, quando são acrescentadas quantidades de ácido ascórbico. A melhor sensibilidade apresentada por esses eletrodos é de $467 \text{ mA.M}^{-1}\text{cm}^{-2}$, com tempo de resposta de 5 s e linearidade que prevalece até 50 mM.

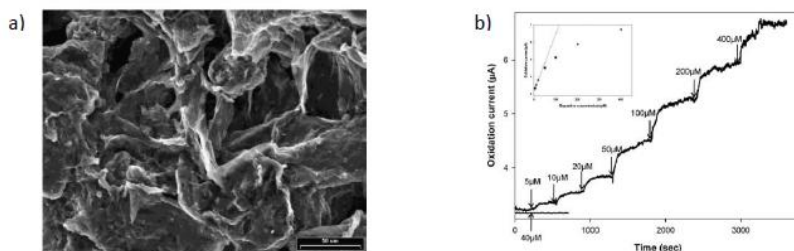


Figura 22: Referência: K. Min et al. Talanta 80 (2009) 1007–1011. a) Micrografia da superfície de um eletrodo de PPy/Nanotubos de carbono/Ty e b) respostas amperométricas dos eletrodos de PPy/ Nanotubos de carbono/Ty para acréscimos graduais de dopamina e ácido ascórbico.

A Tabela 2 relaciona as características dos diferentes biossensores citados anteriormente, todos eles fabricados a partir de PPy mas com diferentes geometrias e aplicações.

Estrutura	Analito	Sensibilidade	Tempo de resposta (s)	Linearidade (mM)	Ref.
Carbono vítreo/PPy /Ty	Catecol p-chlorophenol Fenol	$70,2 \text{ mA.mM}^{-1}$	40 e 75	5,6 – 74,3	(73)
Microestruturas de PPy/GOx/Pt	Glicose	$660 \text{ nA.mM}^{-1}\text{.cm}^{-2}$	20	0 - 17	(74)
PPy/nanotubos de carbono/GOx	Glicose	95 nA.mM^{-1}	8	acima de 4	(75)
Pt/PPy nanoporoso	H_2O_2	$1 \text{ e } 3,8 \text{ A.M}^{-1}\text{.cm}^{-2}$	5	10×10^{-6} e 25×10^{-3}	(76)
Pilares de carbono/PPy/GOx	Glicose	$1,02 \text{ e } 2,02 \text{ A.M}^{-1}\text{.cm}^{-2}$	20	0,5 e 20	(77)
PPy/Nanotubos de carbono/Ty	Dopamina Ácido ascórbico	$467 \text{ mA.M}^{-1}\text{cm}^{-2}$	5	até 50	(78)

Tabela 2: Características de diferentes biossensores construídos a partir de PPy.

2.6 TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A imobilização enzimática consiste numa etapa crítica e necessária na construção de um biossensor. Existem diversas maneiras de imobilizar uma enzima em algum transdutor, dependendo da finalidade e do sistema em questão. Dentro desse contexto é possível definir quatro procedimentos básicos para a imobilização enzimática: encapsulamento, adsorção, ligação covalente cruzada e imobilização covalente (79).

2.6.1 Encapsulamento

O método de encapsulamento consiste em confinar o elemento biocatalítico em uma membrana, localizada na superfície do eletrodo de forma uniforme em todo o filme. Nesse processo, enzima, mediadores e outros componentes podem ser simultaneamente depositados na superfície do eletrodo, sem mudança significativa em sua atividade biológica. Esse método é muito simples, e possui a seu favor o fato de dar ao biossensor uma maior estabilidade de armazenamento (evitando desnaturação) e aumento nos atributos operacionais do mesmo. Dentre as principais desvantagens, é possível citar a dificuldade de difusão do analito e seus subprodutos pelo filme, devido à formação de barreiras de difusão.

2.6.2 Adsorção

O método de imobilização enzimática por adsorção física representa a maneira mais simples e rápida de imobilização. Esse procedimento consiste em dissolver a enzima em uma solução, e em seguida colocá-la em contato com a superfície do eletrodo por um determinado período de tempo. Logo depois, o material excedente, não adsorvido, é removido após ser enxaguado. O mecanismo de ligação ocorre através de interações fracas do tipo de Van der Waals, eletrostáticas ou hidrofóbicas. Além de ser uma técnica rápida, barata e fácil, ainda causa mínima inativação da enzima mantendo sua atividade próxima do natural. Como pontos negativos, é possível ressaltar a fácil desnaturação da enzima e a pouca estabilidade de armazenamento, além do baixo controle de imobilização.

2.6.3 Ligação covalente cruzada (Cross-linking)

A ligação covalente cruzada envolve a utilização de um agente externo no procedimento de imobilização, que tem como função fazer uma rede rígida entre as enzimas, aumentando a interação entre elas e o eletrodo. A interação ocorre entre os grupos funcionais da enzima e a superfície do eletrodo. Uma das vantagens dessa técnica é que ela cria uma interação enzima-enzima mais sólida evitando a lixiviação da mesma, entretanto, por essa mesma razão barreiras de difusão podem ser criadas, aumentando o tempo de resposta do eletrodo.

2.6.4 Imobilização covalente

Esse tipo de imobilização envolve a ligação entre grupos reativos localizados na superfície do eletrodo e grupos funcionais encontrados na estrutura proteica. O processo ocorre após um tratamento prévio da superfície do eletrodo, quando seus grupos funcionais são ativados. Em seguida são colocados em contato com a enzima, sob condições ideais, de modo que as interações covalentes entre o eletrodo e a enzima se estabeleçam. Dentre as vantagens dessa técnica é possível citar a sólida interação entre a enzima e o substrato e a fácil interação entre enzima e analito, devido à localização superficial da biomolécula. Quanto às desvantagens, pode ocorrer perda de atividade catalítica da enzima devido a sua forte interação com o substrato, além de possíveis degradações devido à utilização de determinados reagentes no processo.

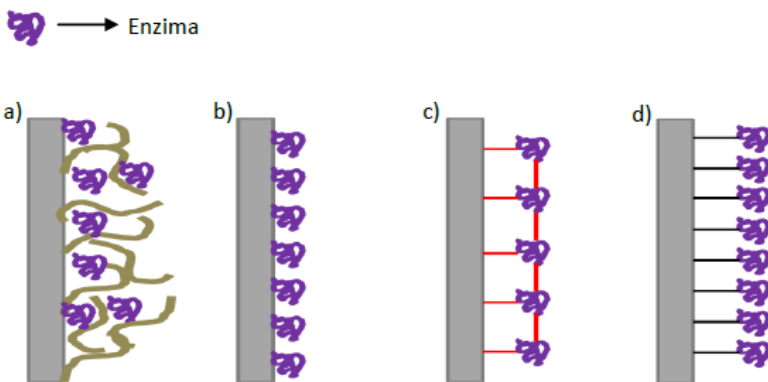


Figura 23: Técnicas de imobilização enzimática mais conhecidas. a) Encapsulamento, b) adsorção, c) ligação covalente cruzada e d) imobilização covalente.

2.7 LITOGRAFIA DE NANOESFERAS

2.7.1 Máscaras coloidais

Máscaras coloidais são estruturas periódicas e ordenadas em duas ou três dimensões formadas a partir de uma solução contendo esferas sub-micrométricas de poliestireno (PS), polimetilmetacrilato (PMMA) ou sílica (SiO_2) (80) (81) (82) (83) (84) (85). Essas estruturas são obtidas pelo auto-ordenamento das esferas devido à evaporação do solvente em que se encontram e podem ser fabricadas sobre uma variedade de substratos. São usadas como moldes na nanoestruturação de metais (86) (87), polímeros (88) ou cerâmicas (89) (90) (91), através de técnicas como eletrodeposição, eletrossíntese, eletropolimerização, evaporação, *sputtering* (92) e sol-gel (93). Essas estruturas têm sido extensivamente estudadas devido a suas importantes aplicações tecnológicas, principalmente por suas características fotônicas (94) (95), além de inúmeras outras aplicações em áreas tão diversas como catálise (96), filtragem (97), nanoreatores (98) ou gravação magnética (99). Originalmente essas esferas encontram-se dispersas em uma solução, geralmente aquosa, e em concentrações que variam de 1 a 10% em massa.

A estrutura da máscara coloidal assemelha-se, por sua geometria ordenada, a um “cristal”, e por analogia, o processo de ordenamento será também chamado neste trabalho de processo de cristalização. Os “cristais” formados, por outro lado, são chamados de cristais coloidais (ou máscaras coloidais) devido à sua origem, cristais opalescentes, por sua aparência, ou fotônicos, pela sua propriedade de difratar a luz visível.

Devido ao fato das esferas possuírem carga negativa, a força de repulsão eletrostática entre as esferas em uma solução aquosa é maior ou igual à força atrativa de van der Waals ali existente (80) (84) (85). Isso resulta na estabilidade coloidal e evita que as esferas se aglomerem enquanto estiverem em suspensão na solução, fator imprescindível para a fabricação de máscaras coloidais de boa qualidade e sem defeitos.

Quanto ao mecanismo de cristalização de máscaras coloidais em duas dimensões, observou-se que, para uma solução coloidal em meio aquoso, tanto a interação eletrostática quanto a força de van der Waals existentes exercem pouca influência no processo de cristalização das esferas (100). As interações que regem o processo de cristalização são basicamente constituídas por forças capilares entre as esferas, levando a

um movimento convectivo na solução e induzindo o ordenamento das esferas sobre o substrato.

Enquanto as partículas encontram-se intermediadas pelo fluido sobre o substrato, a fase líquida forma uma ponte de capilaridade entre duas ou mais partículas, que pode ser atrativa ou repulsiva dependendo se o formato dessas pontes é côncavo ou convexo, respectivamente.

O fator responsável pela formação de cristais bidimensionais consiste na evaporação gradativa do solvente presente na solução coloidal, podendo ser separado em dois estágios (100):

1) Formação de núcleos de cristalização devido à diferença de pressão hidrostática entre a fase gasosa e líquida;

2) Crescimento do cristal devido à evaporação do solvente e relacionada com a curvatura do menisco.

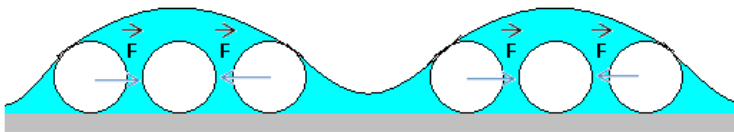


Figura 24: Ação entre partículas localizadas em um determinado domínio.

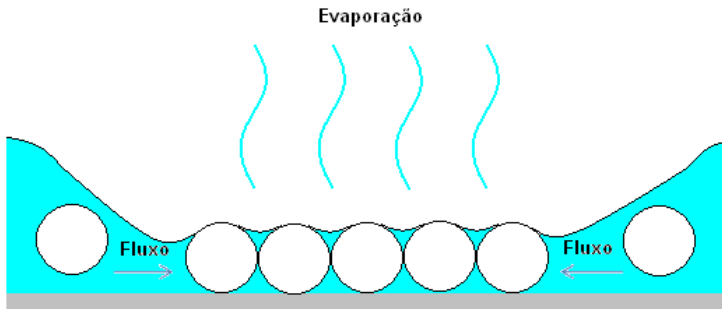


Figura 25: Fluxo hidrodinâmico devido ao processo de evaporação.

Esse tipo de ordenamento, regido por forças capilares de imersão e forças de arraste hidrodinâmico, pode ser chamado de ordenamento convectivo, sendo que os cristais constituídos por monocamadas de esferas podem ser fabricados controlando-se apenas a forma da interface ar/líquido e a taxa de evaporação do solvente da solução coloidal utilizada para a fabricação dos cristais.

Para a obtenção desses cristais coloidais, existem diversos métodos bastante difundidos e bem estabelecidos, sendo alguns mais ou menos eficientes, dependendo do tipo de cristal que se deseja fabricar, como sedimentação gravimétrica, sedimentação inclinada, deposição vertical, *spin-coating* (que será discutido mais detalhadamente logo adiante) além de outros que envolvem soluções coloidais em meios não aquosos (101) (102).

2.7.2 Spin-Coating

Spin-coating é uma técnica versátil e relativamente simples, utilizada na fabricação de filmes finos, películas ou cristais coloidais. Nesse método, o substrato é posicionado sobre um disco girante (*spin-coater*), onde será pipetada a solução desejada. Em seguida, o equipamento é acionado e inicia sua rotação, espalhando o material por todo o substrato. No caso da utilização de soluções coloidais, a formação do cristal ocorre devido à perda de solvente por evaporação (caso o solvente seja volátil) e perda de soluto e solvente por centrifugação, sendo o material descartado pelas bordas do substrato.

A qualidade e espessura do filme nesse método dependem dos parâmetros de aceleração angular, velocidade angular e tempo de rotação do *spin-coater*, além da natureza e viscosidade do solvente, concentração do soluto e temperatura e umidade locais, que têm influência direta sobre a taxa de evaporação e viscosidade da solução (103) (104). A grande vantagem dessa técnica é que, uma vez estabelecido o protocolo ideal de fabricação, podem-se obter cristais compactos e de boa qualidade, de maneira muito mais rápida que as outras técnicas (da ordem de minutos) e com alta reprodutibilidade.

2.8 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS

2.8.1 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica é uma técnica muito poderosa capaz de fornecer um grande número de informações superficiais e interfaciais a partir de um único experimento.

Essa técnica consiste na aplicação de uma perturbação, seja de potencial ou de corrente, no sistema a ser estudado e observar a resposta resultante. Essa perturbação ocorre aplicando um sinal de excitação senoidal de pequena amplitude sobreposta a um potencial contínuo (potencial central), o que torna possível a investigação de fenômenos

eletroquímicos próximos ao estado de equilíbrio (105) (106). A frequência da perturbação senoidal é variada continuamente, o que permite isolar e distinguir fenômenos físicos e químicos com diferentes tempos característicos, que governam o sistema para um dado potencial aplicado.

A resposta do sistema, em relação à aplicação de um potencial senoidal, é uma corrente de natureza senoidal (Figura 26), sendo as relações entre potencial aplicado e corrente medida definidas pela impedância do sistema, que é uma quantidade complexa com magnitude e ângulo de fase (defasagem da corrente em relação ao potencial aplicado) que dependem da frequência do sinal.

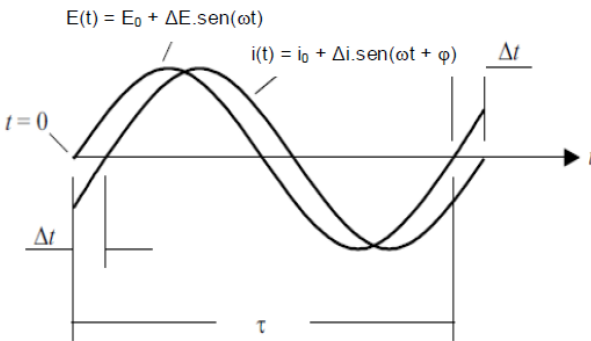


Figura 26: Relações entre potencial aplicado e corrente medida em um sistema.

A impedância do sistema pode ser calculada usando a Lei de Ohm como:

$$Z(\omega) = \frac{E(\omega)}{i(\omega)} \tag{10}$$

A grandeza $Z(\omega)$ pode ser representada em coordenadas polares,

$$Z(\omega) = |Z(\omega)|e^{j\varphi\omega} \tag{11}$$

onde $|Z(\omega)|$ é a magnitude da impedância e φ é a defasagem.

Também pode ser representado em coordenadas cartesianas,

$$Z(\omega) = Z_{real}(\omega) - j \cdot Z_{imag}(\omega) \quad (12)$$

onde $Z_{real}(\omega)$ é a parte real da impedância e $Z_{imag}(\omega)$ é a parte imaginária da impedância.

As representações gráficas dessas grandezas podem ser realizadas na forma do diagrama de Nyquist (ou Argand), que fornece informações sobre a natureza dos elementos que compõem a impedância total do sistema ou diagrama de Bode, que relaciona o módulo da impedância total do sistema e a defasagem com a frequência, ambos ilustrados na Figura 27.

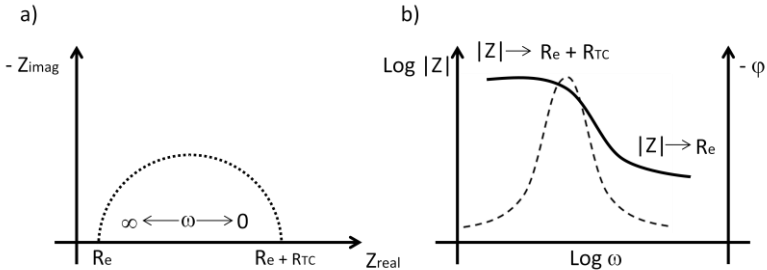


Figura 27: a) Diagrama de Argand e b) gráfico de bode para medidas de impedanciometria.

Em posse dessas informações e mediante a utilização de circuitos equivalentes e modelos matemáticos, é possível estudar e avaliar fenômenos de transporte de carga e de massa, condutividade dos filmes, capacitâncias faradaicas e de dupla camada, coeficientes de difusão, entre outros.

A utilização de circuitos elétricos para a descrição de sistemas eletroquímicos se deve à similaridade de comportamento entre ambos. Na Figura 28 observa-se uma analogia típica entre um sistema eletroquímico simples e um circuito elétrico (circuito de Randles) (107).

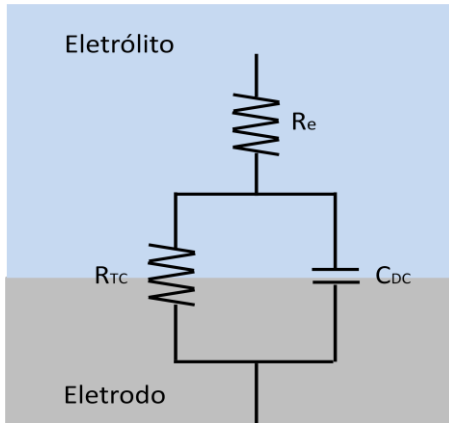


Figura 28: Analogia entre circuitos elétricos e sistemas eletroquímicos.

A resistência à transferência de carga na interface eletrodo/eletrólito pode ser aproximado a um resistor (R_{TC}), assim como a presença da dupla camada elétrica (dupla camada de Helmholtz) pode ser associado a um elemento de capacitância (C_{DC}). Essa aproximação possibilita a descrição da interface através de uma associação em paralelo entre um resistor (R_{TC}) e um capacitor (C_{DC}), devido às contribuições de processos faradaicos e capacitivos simultâneos. O elemento capacitivo (C_{DC}) é o responsável por gerar um atraso no sinal. Como a corrente que atravessa a interface eletrodo/eletrólito depende da migração de íons na solução, esta pode ser representada por um resistor R_e (devido à resistência do eletrólito ou resistência de solução).

Outros fenômenos ainda podem ocorrer em processos eletroquímicos mais complexos, como em reações limitadas por difusão, e que podem ser modeladas por um elemento denominado impedância de Warburg (W), que está associado ao tipo de difusão que ocorre no sistema. Além disso, ainda podem surgir elementos indutivos (L), referentes à adsorção de espécies na interface eletrodo/eletrólito ou a presença de materiais de natureza magnética.

As interfaces de sistemas reais apresentam, em geral, propriedades elétricas não homogêneas decorrentes da rugosidade superficial, porosidade, variações de composição, ou mesmo da desordem dinâmica associada à difusão (108) (109). Essas inhomogeneidades resultam em uma distribuição de tempos de relaxação, que pode ser eletricamente descrito pelo chamado elemento de fase constante (CPE), que é equivalente a uma capacitância ou pseudocapacitância. A impedância associada a um CPE é dada por:

$$Z = \frac{1}{Q(i\omega)^n}$$

onde Q possui unidade de capacitância (F) e n é o coeficiente do CPE, sendo que, para $n = 1$, o CPE apresenta o comportamento de um capacitor ideal, e para $n = 0$, o CPE apresenta o comportamento de um resistor ideal.

Quando $n = 0,5$, o CPE apresenta um comportamento típico de um elemento de Warburg (W), como pode ser observado na Tabela 3, que associa cada um dos elementos discutidos anteriormente a sua respectiva impedância em função da frequência (105).

Elemento	Símbolo	Parâmetro	Impedância
Resistência	R	R	$Z = R$
Capacitância	C	C	$Z = \frac{-j}{\omega C}$
Indutância	L	L	$Z = j\omega L$
Elemento de fase constante	CPE	Q, n	$Z = \frac{1}{Q(i\omega)^n}$
Warburg	W	Q, n	$Z = \frac{1}{Q(i\omega)^{\frac{1}{2}}}$

Tabela 3: Relação entre elementos de um circuito elétrico e suas impedâncias.

2.8.2 Diferentes representações para a impedância

O comportamento da impedância em função da frequência pode ser representado em diferentes formatos que ressaltam uma característica em particular do sistema investigado. No caso de processos simples, como é o caso de uma reação de oxi-redução em eletrodo plano as diferentes representações são redundantes. Em processos mais complexos, no entanto, as diferentes representações permitem a extração de alguns dos parâmetros característicos do sistema, que podem auxiliar no modelamento do mesmo.

A fim de compreender quais informações podem ser extraídas dos dados de impedância, vamos analisar dois casos limite: um circuito

bloqueante (Figura 29a), representado por uma resistência R_e (resistência do eletrólito) em série com um capacitor, que descreve uma interface puramente capacitiva, e um circuito reativo (Figura 29b), representado por uma resistência R_e (resistência do eletrólito) em série com uma associação em paralelo de um resistor (resistência à transferência de carga) com um capacitor (dupla-camada).

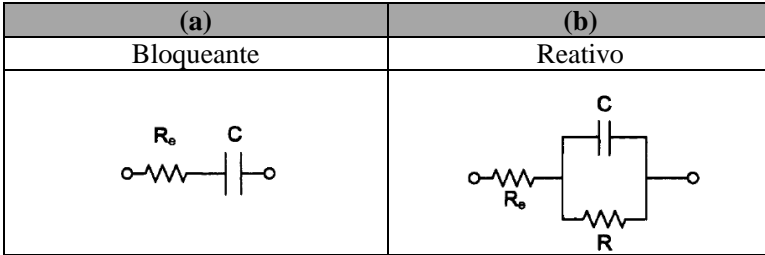


Figura 29: Circuitos de um sistema bloqueante (a) e reativo (b).

Em cada uma das representações a seguir, o circuito bloqueante será representado por linhas trastejadas, enquanto que o circuito reativo será representado por linhas contínuas (105).

2.8.2.1 Representação de Argand

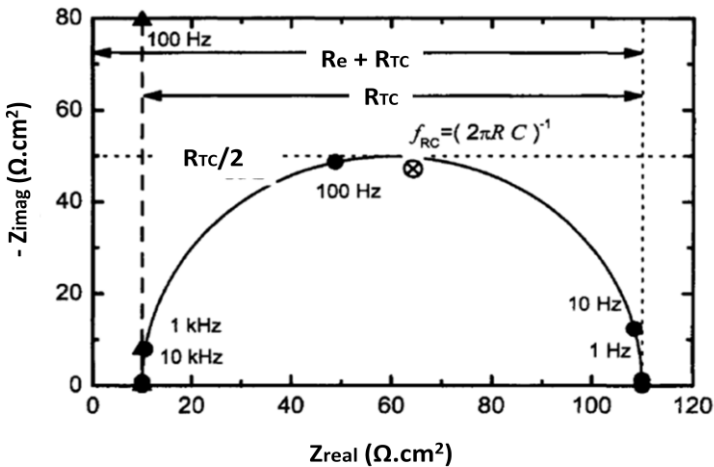


Figura 30: Representação de Argand para a impedância, onde $R_e = 10 \Omega\text{cm}^2$, $R_{TC} = 100 \Omega\text{cm}^2$ e $C = 20 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Referência (105).

A representação de Argand (ou diagrama de Argand) é utilizada para representar a impedância no plano complexo (parte real e parte imaginária), sendo que cada medida é efetuada em um determinado valor de frequência que está implícita na representação. Uma das desvantagens dessa representação é que a dependência da frequência não é explícita, fato que pode ser contornado com a indicação de algumas frequências características no gráfico. Sendo assim, a frequência sempre deve ser indicada, para que ocorra uma melhor compreensão das constantes de tempo do fenômeno em questão.

Para um circuito bloqueante (Figura 30) a parte real da impedância não varia com a frequência e é igual à resistência do eletrólito para todos os valores de frequência, enquanto que a parte imaginária fica cada vez mais negativa quando as frequências tendem a zero.

Num circuito reativo, o limite assintótico da parte real da impedância para altas frequências é igual à R_e e para baixas frequências igual a $R_e + R$. A frequência característica do sistema pode ser encontrada quando a parte imaginária da impedância atinge seu valor de máximo.

Nessa representação, um semicírculo perfeito indica a existência de um processo simples descrito por um circuito reativo. Um semicírculo achatado indica um processo mais complexo, ou a presença de elementos distribuídos (CPE). Múltiplos semicírculos ou inflexões indicam que mais de uma constante de tempo são requeridas para descrever o processo.

2.8.2.2 Representação de Bode

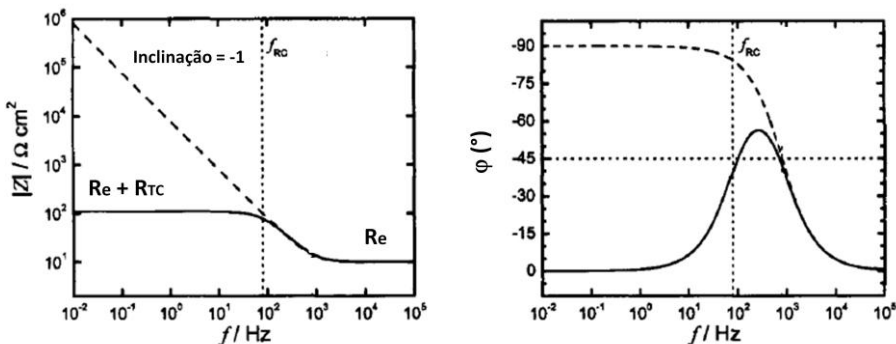


Figura 31: Representação de Bode, onde $R_e = 10 \Omega\text{cm}^2$, $R_{TC} = 100 \Omega\text{cm}^2$ e $C = 20 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Referência (105).

Outra representação muito utilizada é a de Bode, que relaciona o módulo da impedância total e o ângulo de fase com a frequência. Ao contrário da representação de Argand, neste caso a dependência da frequência é explícita.

Conforme se verifica na Figura 31 o gráfico log-log do módulo da impedância em função da frequência, em baixas frequências, serve para diferenciar processos reativos de processos bloqueantes. No caso de processos bloqueantes, a assíntota da curva em baixas frequências indica se o processo é descrito por um capacitor ideal (quando a inclinação é igual a -1) ou se pode ser descrito por um CPE (quando a inclinação é menor que um e invariante com a frequência). No caso de processos reativos, a assíntota horizontal em baixas frequências indica a resistência total do circuito. Em ambos os casos, a assíntota horizontal em altas frequências fornece a resistência do eletrólito. Por outro lado, a representação do ângulo de fase em função da frequência, no caso de sistemas eletroquímicos, não é representativa da interface investigada, pois o menor dos elementos resistivos do sistema (que costuma ser a resistência do eletrólito) se torna o elemento dominante em altas frequências, mascarando os outros parâmetros. Apesar disso, esse gráfico pode ser utilizado para se identificar, pelo número de máximos, o número de processos envolvidos. No entanto, a posição dos mesmos não representa as frequências características dos processos observados.

2.8.2.3 Representação das componentes real e imaginária da impedância em função da frequência

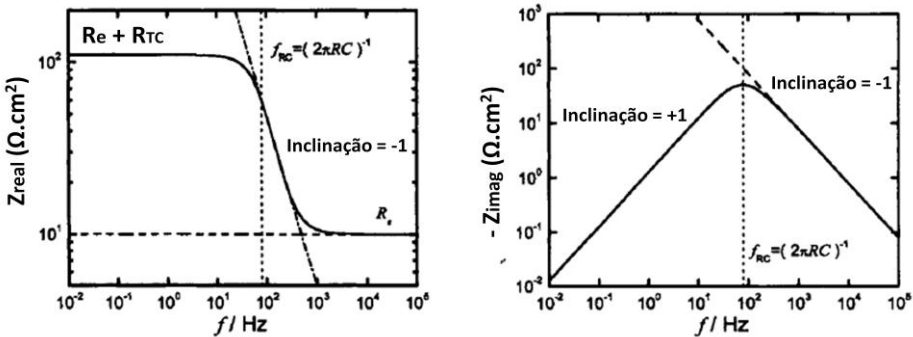


Figura 32: Representação da parte real e parte imaginária da impedância em função da frequência. $R_e = 10 \Omega cm^2$, $R_{TC} = 100 \Omega cm^2$ e $C = 20 \mu F/cm^2$. A frequência característica é dada por $f_{RC} = (2\pi RC)^{-1}$. Referência (105).

Essa representação de impedância separa as componentes real e imaginária da impedância em função da frequência. Os parâmetros que podem ser extraídos do gráfico não são mascarados pela resistência do eletrólito. Para processos reativos, as assíntotas horizontais na representação da parte real da impedância indicam os valores da resistência do eletrólito, em altas frequências, e da resistência total do processo, em baixas frequências, enquanto que máximos no gráfico da impedância imaginária identificam as frequências características de processos reativos. Além disso, as assíntotas em torno de cada máximo indicam o valor de n para o CPE que descreve o esse processo reativo.

2.8.2.4 Representação da capacitância efetiva

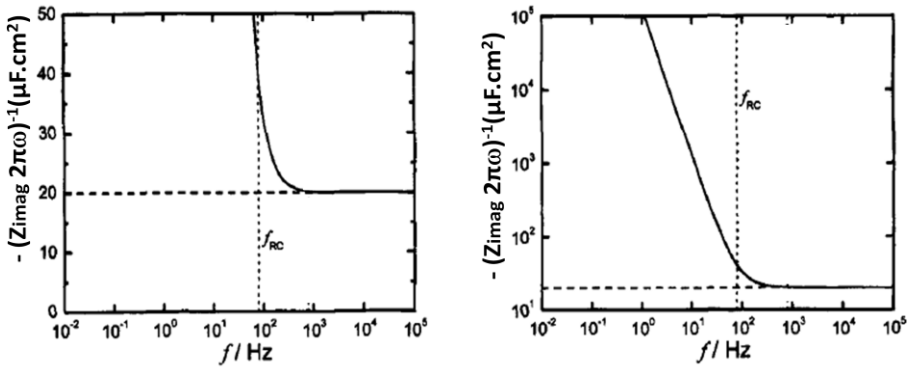


Figura 33: Representação da capacitância efetiva como função da frequência. $R_e = 10 \Omega\text{cm}^2$, $R_{TC} = 100 \Omega\text{cm}^2$ e $C = 20 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. As frequências características são dadas por $f_{RC} = (2\pi RC)^{-1}$. Referência (105).

A parte imaginária da impedância pode ser utilizada para se estimar a capacitância efetiva de um sistema eletroquímico de acordo com a eq. 13:

$$C_{eff} = \frac{-1}{\omega Z_{\text{imag}}} \quad (13)$$

As assíntotas em alta frequência fornecem os valores de capacitância, tanto de processos bloqueantes como de processos reativos.

2.8.3 Cronoamperometria

Na área de eletroquímica, a técnica de cronoamperometria relaciona a corrente que flui através do eletrodo de trabalho, em função do tempo de aquisição para um determinado potencial constante aplicado.

O fluxo de corrente é representado quantitativamente por meio da equação de Cottrell (110), eq. 14, que relaciona a variação na corrente medida, com o comportamento redox das espécies presentes no eletrólito.

$$I_t = \frac{nFAC_o D_o^{1/2}}{\pi^{1/2} t^{1/2}} = bt^{-1/2} \quad (14)$$

onde I_t é a corrente registrada a um tempo t , que é representado em segundos, n é o número de elétrons utilizados para oxidar ou reduzir uma molécula de analito, F é a constante de Faraday (96,485 C/mol), A é a área do eletrodo em cm^2 , C é a concentração das espécies oxidadas em mol/cm^3 e D é o coeficiente de difusão das espécies oxidadas em cm^2/s .

Essa corrente é muito grande no início, mas rapidamente decai quando o analito próximo do eletrodo é consumido, e um sinal transiente é observado (Figura 34). Essa relação é válida para um eletrodo planar e a corrente é devida somente à difusão de espécies eletroativas através do eletrodo.

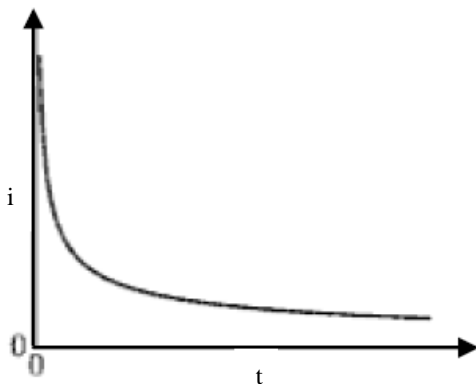


Figura 34: Curva característica de uma medida de cronoamperometria.

A curva característica obtida pela técnica de cronoamperometria aplicada a sensores pode ser observada na Figura 35.

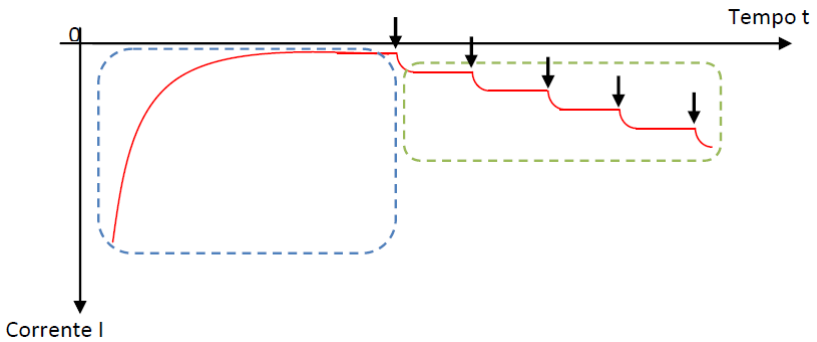


Figura 35: Curva característica de uma medida amperométrica aplicada a sensores.

A curva representada acima pode ser dividida em duas partes, de acordo com as etapas do processo, que estão delineadas pelas linhas tracejadas em azul e verde.

Na primeira parte (linha tracejada em azul) a corrente diminui rapidamente até atingir um valor estacionário. Na segunda parte (linha tracejada em verde), começa a haver o acréscimo de analito, espécies que serão oxidadas na superfície do eletrodo, como está representado pelas setas acima da curva da corrente pelo tempo. É possível observar que, para cada acréscimo de analito há um salto da corrente, que está relacionado com a maneira como as espécies são consumidas no eletrodo. O aumento incremental na concentração do substrato gera uma curva de corrente em forma de patamares. Nos instantes subsequentes ao acréscimo do substrato, as espécies são rapidamente consumidas, ocasionando o salto de corrente; em seguida, a taxa de consumo das mesmas se torna limitado por difusão e passa a ser constante, o que se reflete num novo valor estacionário de corrente, e assim sucessivamente.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MÁSCARAS COLOIDAIS

O processo de fabricação das máscaras coloidais ou cristais coloidais é realizado através da técnica de spin-coating, onde uma solução aquosa composta por esferas submicrométricas de poliestireno é depositada sobre um substrato de silício previamente tratado. Em seguida, o mesmo é posto em rotação, gerando forças de cisalhamento e evaporação do solvente, que promovem o auto-ordenamento das esferas sobre o substrato de silício, dando origem a uma monocamada de esferas ordenadas em arranjo hexagonal compacto.

3.1.1 Preparação do substrato

Os substratos utilizados no processo de fabricação das amostras foram silício tipo *p* (100), dopados com boro, com resistividade 5 – 15 Ω .cm. O silício adquirido comercialmente (WRS Materials) vem na forma de lâminas com 10 cm de diâmetro e espessura de 0,05 cm, com um dos lados polidos e o outro lado rugoso. Para a fabricação dos substratos, as lâminas de silício originais são clivadas com uma caneta diamantada em quadrados com arestas de 1,5 cm (Figura 36).

Antes da utilização dos substratos, os mesmos são posicionados num porta-amostra de teflon com capacidade para nove unidades, e deixados por quinze minutos em ultra-som com água destilada deionizada, para que se removam quaisquer resquícios de sujeira, como por exemplo, alguma poeira remanescente do momento em que a lâmina de silício foi clivada e dividida em partes menores.

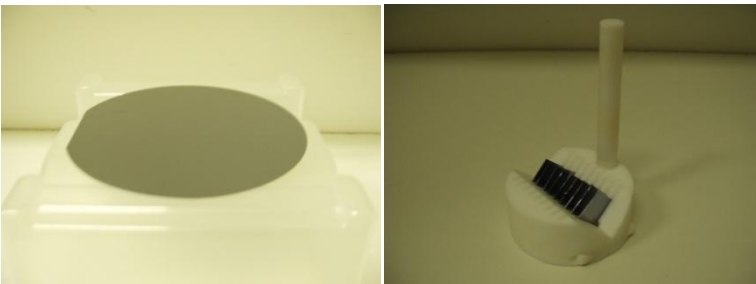


Figura 36: À esquerda temos uma lâmina de silício inteira. À direita, pequenos pedaços de silício clivado e posicionado em um suporte de teflon.

As lâminas de silício possuem um óxido natural que as tornam levemente hidrofílicas, entretanto, para melhorar ainda mais a interação entre a solução coloidal e a superfície do substrato, se faz necessária a utilização de um tratamento químico que aumente a camada de óxido da superfície, tornando-a ainda mais hidrofílica (Figura 37). O processo de oxidação consiste em imergir os substratos de silício previamente limpos numa solução contendo 20 ml de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Vetec), 20 ml de hidróxido de amônio (NH_4OH) (Synth) e 100 ml de água bidestilada deionizada, deixando-os em “banho-maria” (Nova Técnica, modelo NT 245) durante 1h a $82^\circ C$ em temperatura controlada (Figura 38). Em seguida os substratos são colocados num béquer com água destilada para retardar a degradação da camada de óxido. A partir do término do processo de oxidação é aconselhável que os substratos sejam utilizados o mais rápido possível, pois foi constatado que depois de 2 h o grau de hidrofiliicidade das amostras diminui sensivelmente.

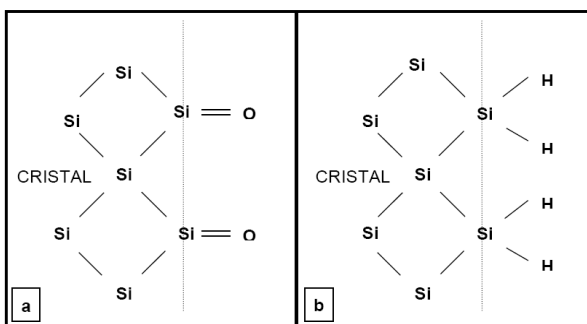


Figura 37: Superfície do silício, a) oxidada e hidrofílica (região onde foi realizado o tratamento químico) e b) passivada e hidrofóbica (região sem o tratamento).



Figura 38: “Banho-maria” com o béquer contendo a solução de hidrofiliização e os substratos.

3.1.2 Spin-coating

O processo de spin-coating permite a obtenção de máscaras bastante uniformes em curto intervalo de tempo com alto nível de reprodutibilidade. A técnica consiste em rotacionar o substrato de silício com a solução coloidal de modo que, dependendo da velocidade e tempo de rotação e devido a forças de cisalhamento e evaporação, ocorra a formação do cristal coloidal na superfície do substrato.

Para a fabricação das máscaras coloidais são utilizadas soluções de esferas submicrométricas de poliestireno (PS) (Micro Particles GmbH) com diâmetros de 250 nm, 476 nm, 535 nm, 600 nm e 756 nm, sendo que a concentração das esferas na solução é de 10% em massa.

Após a limpeza e oxidação do substrato, o mesmo é posicionado sobre um spin-coater (Laurell Technologies Corporations, modelo WS-400B-6NPP/LITE/10K) (Figura 39) localizado no Laboratório de Sistemas Nanoestruturados (LabSiN), Departamento de Física, UFSC, espalhando-se sobre ele 15 μ l da solução coloidal que será utilizada.

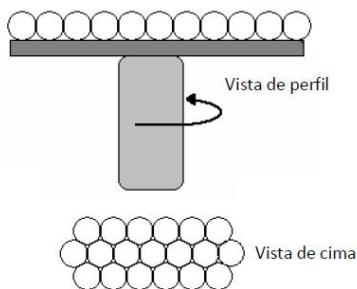


Figura 39: Spin-coater e formação do cristal coloidal (arranjo hexagonal compacto).

As máscaras são fabricadas em dois ou três passos diferentes, com velocidades e tempos de rotação distintos. O primeiro passo possibilita o ordenamento efetivo das esferas, enquanto que o segundo (geralmente com velocidade de rotação muito maior) é responsável por eliminar o excesso de solvente do substrato.

Um protocolo de fabricação típico está exemplificado na Figura 40, onde o auto-ordenamento é realizado entre os tempos t_1 e t_2 .

Quando este é atingido, aumenta-se a velocidade a fim de eliminar o solvente excedente, tempos t_3 e t_4 .

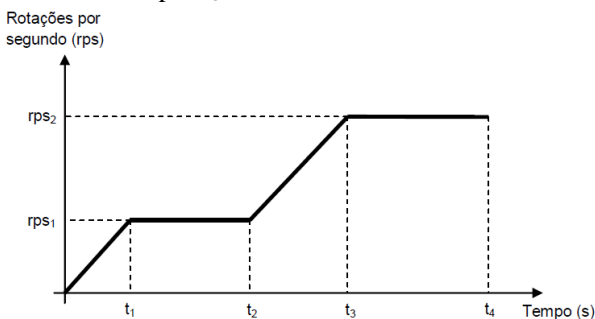


Figura 40: Gráfico que exemplifica os parâmetros de formação do cristal.

Os parâmetros utilizados na fabricação de algumas das máscaras são apresentados na Tabela 4.

Diâmetro (nm)	V_1 (rpm)	t_1 (s)	V_2 (rpm)	t_2 (s)	Volume (μ l)
535	1350	120	4000	20	15
476	1500	120	4000	20	15

Tabela 4: Acima estão representados os parâmetros para a fabricação de algumas das máscaras coloidais.

É importante ressaltar que esses parâmetros são fortemente influenciados pelas condições do ambiente, principalmente umidade e temperatura, que influenciam a taxa de evaporação do solvente. Torna-se, portanto, muito importante o controle desses parâmetros para que se possa alcançar reprodutibilidade nas amostras.

Logo após as máscaras coloidais estarem prontas, elas são deixadas em um forno a $80\text{ }^\circ\text{C}$ com temperatura controlada durante 24 h, a fim de secá-las completamente, consolidando o arranjo ordenado das esferas e aumentando sua adesão ao substrato.

3.2 ELETROPOLIMERIZAÇÃO

O processo de eletropolimerização do PPy foi realizado em substratos planos de silício ou substratos recobertos com as máscaras coloidais descritas anteriormente. Neste último caso, a eletropolimerização do PPy ocorre nos interstícios das máscaras, preenchendo as cavidades vazias entre as esferas. A partir do controle de

carga depositada é possível controlar o grau de preenchimento e espessura do filme polimérico resultante.

No processo eletroquímico utilizou-se uma célula eletrolítica típica de três eletrodos conectados a um potenciostato (Figura 41). O substrato de silício com a máscara coloidal de PS atua como eletrodo de trabalho (WE), onde ocorrerá a eletropolimerização do PPy. Como contra-eleto (CE) utilizou-se uma folha de platina, pelo fato desta ser inerte no intervalo de potencial utilizado. Como eletrodo de referência (RE) foi utilizado um eletrodo de calomelano saturado (SCE).

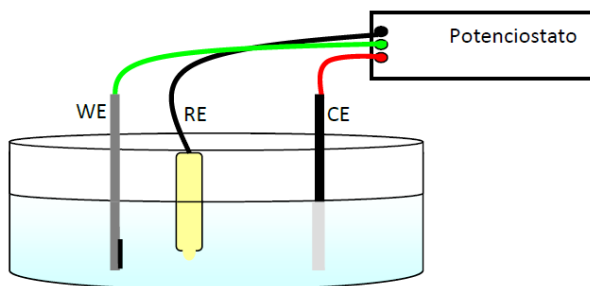


Figura 41: Cuba eletrolítica com o eletrodo de trabalho (WE), contra eletrodo (CE) e eletrodo de referência (RE). Os três eletrodos são conectados a um potenciostato.

3.2.1 Preparação do eletrodo de trabalho

Após a secagem da máscara no substrato por 24 h a 80 °C, procede-se à fixação da mesma numa haste metálica (de inox), que propicia o contato elétrico com o potenciostato.

Primeiramente espalha-se sobre a haste metálica de inox, de aproximadamente 3 cm de largura e 10 cm de comprimento, no local onde o substrato de silício será fixado, uma liga de gálio-índio que tem como finalidade eliminar a barreira Schottky que impede o fluxo de elétrons na interface metal-semicondutor. O mesmo é feito com a face rugosa do substrato de silício (lado oposto ao da máscara), que foi previamente limpa em solução de 2 % de HF (Merck) diluído em água. A liga é composta de 70% de gálio e 30% de índio, o que propicia um contato ôhmico entre a haste e o silício. Estabelece-se dessa maneira uma conexão elétrica entre o semicondutor e a célula eletroquímica, garantindo que toda a corrente que flui do eletrodo passe pela superfície do silício.

A seguir cola-se uma fita dupla face sobre a máscara coloidal, a fim de isolar o conjunto e delimitar uma área circular de interesse onde se deseja eletropolimerizar o PPy, a área eletroativa (Figura 42).

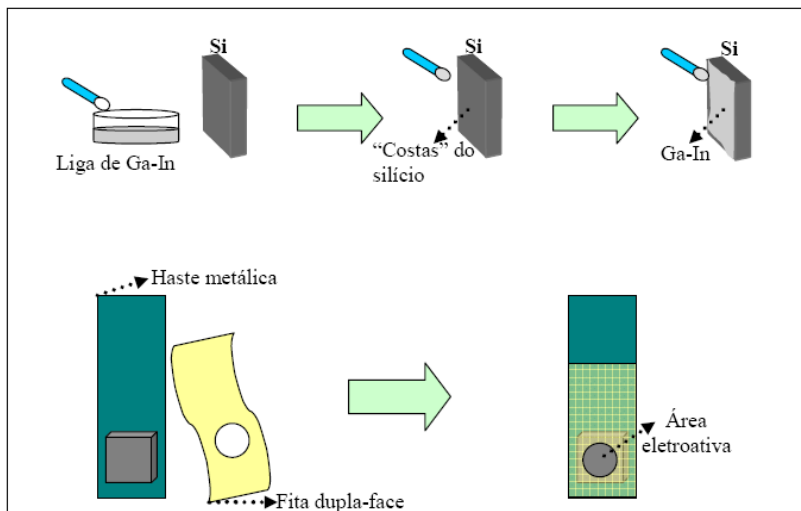


Figura 42: Representação esquemática do procedimento para preparação do eletrodo de trabalho.

3.2.2 Célula eletrolítica e eletrólito

A célula eletrolítica utilizada possui basicamente três eletrodos conectados a um potenciostato.

Como contra-eletródo foi utilizado uma folha de platina de 1,5 cm de largura por 3 cm de comprimento presa a uma haste metálica. A área do contra eletrodo é muito maior que a área delimitada no eletrodo de trabalho (área delimitada pela fita dupla-face sobre a amostra), de forma que a taxa da reação de oxidação que ocorre no contra eletrodo não se torne o fator limitante do processo de eletropolimerização.

A folha de platina do contra eletrodo é previamente em uma solução piranha composta de 50% de água bidestilada deionizada, 25% de ácido clorídrico (HCl) (Sigma) e 25% de ácido nítrico (HNO₃) (Sigma). Em seguida a haste é copiosamente lavada com água destilada para eliminar os resquícios da solução “piranha” e evitar qualquer tipo de contaminação do eletrólito.

Como eletrodo de referência utilizou-se calomelano saturado (SCE). Para sua limpeza foi utilizada água destilada deionizada. Com o intuito de evitar seu ressecamento, o eletrodo é armazenado em uma solução à base de NaCl quando não está sendo utilizado.

O potenciostato utilizado neste trabalho é um Autolab PGSTAT302N localizado no LabSiN. Para os processos de eletropolimerização do PPy a célula eletrolítica é colocada dentro de uma cabine de alumínio fechada e escura, que funciona como uma gaiola de Faraday, além de evitar processos de fotoeletrodeposição, já que o silício utilizado é do tipo p (Figura 43). O software utilizado foi o GPES.



Figura 43: Potenciostato e caixa metálica onde se encontra a célula eletroquímica.

O eletrólito utilizado na eletropolimerização do PPy/DBSA é composto de 0,7 ml de monômero pirrol (Py) (Sigma-Aldrich, 98%) e 0,44 g de DBSA ($C_{18}H_{29}NaO_3S$, ácido dodecil benzeno sulfônico de sódio) (Aldrich) (Figura 44) para 50 ml de solução em meio aquoso. A composição molar do eletrólito corresponde a $0,2 \text{ mol/dm}^3$ de Py e $0,025 \text{ mol/dm}^3$ de DBSA.

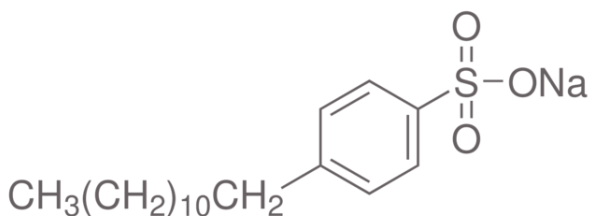


Figura 44: Fórmula estrutural do sal DBSA.

3.2.3 Métodos de deposição

Os métodos de deposição mais comumente utilizados na técnica de eletrodeposição são o galvanostático, onde a corrente elétrica que passa pelo sistema é mantida constante durante o tempo em que durar a deposição, e o potenciostático (Figura 45), em que o potencial é mantido constante durante o tempo de deposição. Este último foi o método utilizado ao longo deste trabalho.

Durante o processo de deposição, registra-se a evolução da corrente (ou do potencial) ao longo do tempo, para o caso de deposição potenciostática (ou galvanostática). Essa curva é chamada transiente de corrente (ou de potencial).

Em ambos os casos a espessura do filme pode ser controlada através do cálculo da carga depositada, que, para o caso da deposição potenciostática, corresponde à integral do transiente de corrente (Figura 45b).

Ao se analisar os transientes de corrente no método potenciostático ou transientes de potencial no método galvanostático, pode-se obter informações importantes quanto ao processo de nucleação e crescimento do filme na interface eletrodo/eletrólito.

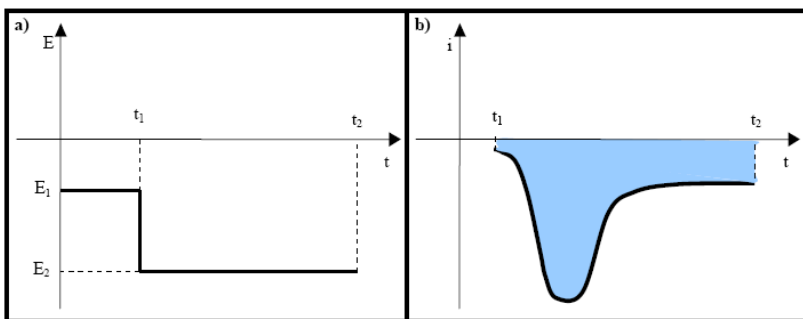


Figura 45: a) Comportamento do potencial (deposição potenciostática). b) Transiente de corrente.

3.3 REMOÇÃO DAS ESFERAS DE PS

Logo após o término do processo eletropolimerização do PPy, com o consequente preenchimento dos interstícios da máscara, as esferas de PS devem ser removidas de modo que a estrutura resultante seja um filme nanoestruturado de PPy. Para remover as esferas, retira-se a fita utilizada para delimitar a área de deposição, e mergulha-se a

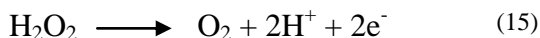
máscara em tolueno (Synth) durante 1h a fim de que ocorra a total dissolução das esferas sem prejuízo à integridade da estrutura de PPy. Por fim a amostra é enxaguada com etanol, para eliminar quaisquer resíduos de tolueno, e seca com gás nitrogênio.

3.4 MONTAGEM DOS ELETRODOS DE TRABALHO

As estruturas de polipirrol descritas anteriormente (compactas e nanoestruturadas) serão utilizadas na fabricação de dois biossensores distintos, um para a detecção de H_2O_2 e outro para a detecção de catecol, sendo que no primeiro caso serão imobilizadas nanopartículas de platina (NPpt) e no segundo caso a imobilização será da enzima tirosinase.

3.4.1 Biossensor para detecção de H_2O_2

Para a fabricação dos biossensores de H_2O_2 , houve a necessidade de imobilizar nanopartículas de platina na superfície das estruturas poliméricas. As nanopartículas de platina, bem como de outros metais de transição, possuem propriedades catalíticas na reação de redução do peróxido de hidrogênio (111) e importante papel na amplificação da resposta da corrente elétrica observada nas medidas amperométricas. Na Eq. 15 observa-se a reação de oxidação do H_2O_2 (onde o mesmo atua como agente redutor). A Eq. 16 ilustra a reação de redução do H_2O_2 (onde agora ele está atuando como agente oxidante).



Antes da incorporação das nanopartículas de platina sobre a estrutura de PPy, é necessário que a área do polímero seja novamente delimitada, desta vez numa área um pouco menor ($0,135 \text{ cm}^2$) que aquela utilizada na eletropolimerização do PPy.

Esse procedimento é adotado para que o filme fique bem aderido à superfície do substrato e não seja arrancado futuramente, quando exposto a condições de fluidos turbulentos (agitação magnética) nas medidas amperométricas, devido ao fato de suas bordas estarem expostas.

O procedimento para delimitar a área (fita dupla-face) e estabelecer os contatos na haste de inox (gálio-índio), é análogo ao

descrito anteriormente, quando da eletropolimerização do PPy, e deverá ser repetido na preparação das amostras, antes da imobilização das nanopartículas de platina.

Finalmente a amostra está pronta para receber as nanopartículas que serão incorporadas nos filmes compactos ou nas cavidades do filme nanoestruturado de PPy, onde antes encontravam-se as esferas de PS. A imobilização das nanopartículas é realizada pelo processo de *drop-casting*, que consiste em pingar a solução de nanopartículas sobre a plataforma de PPy, deixando o solvente evaporar. A interação do filme de PPy com as nanopartículas de Pt ocorre eletrostaticamente, o que garante que as nanopartículas permaneçam bem aderidas na estrutura de PPy quando das medidas amperométricas posteriores.

As nanopartículas de Pt possuem diâmetro de aproximadamente 10 nm e estão dispersas no dendrímero poli (amido amina) (PAMAM), onde permanecem estáveis e não se aglomeram. Já a concentração molar de nanopartículas de Pt na solução utilizada é de 0,33 mmol/L. Essas NPPT estabilizadas em PAMAM foram produzidas no Laboratório de Biofísica Molecular no IFSC da USP (112).

A escolha desse diâmetro de nanopartículas deve-se ao fato de que partículas menores, como pôde ser verificado, não apresentam resultados tão animadores no que diz respeito a medidas eletroquímicas, que é justamente o caso deste trabalho, e contribuem pouquíssimo na intensificação do sinal amperométrico.

O volume de solução nanopartículas/PAMAM depositadas no filme é de 20 μ l. O eletrodo é então deixado num forno a 80°C durante 24h para que o solvente da solução evapore, restando as nanopartículas e PAMAM (Figura 46) sobre o filme nanoestruturado (Figura 47) ou compacto (Figura 48) de PPy.

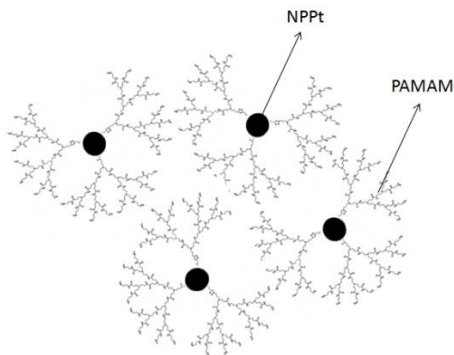


Figura 46: Nanopartículas de Platina (NPPT) englobadas por PAMAM.

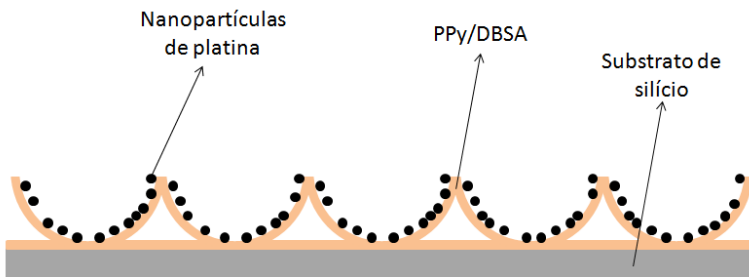


Figura 47: Plataforma polimérica nanoestruturada de PPy com nanopartículas de Pt.

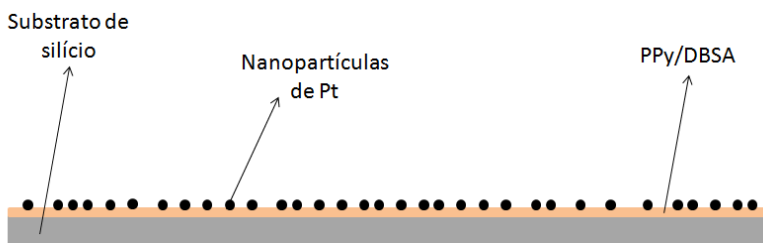


Figura 48: Plataforma polimérica compacta de PPy com nanopartículas de Pt.

3.4.2 Biossensor para detecção de catecol

Todas as soluções dessa etapa foram produzidas num volume excedente àquele que será utilizado, sendo que o material restante foi armazenado em baixa temperatura e protegido da luz.

A solução tampão fosfato de potássio foi produzida a partir de concentrações apropriadas de fosfato de potássio dibásico anidro (K_2HPO_4) (Vetec) e fosfato de potássio monobásico anidro (KH_2PO_4) (Vetec) e água bidestilada deionizada numa concentração de 50 mmol.l^{-1} e pH 6,5.

A solução de catecol para armazenamento possui concentração de $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ de catecol (Sigma-Aldrich, 99%, cristalino) em solução tampão. Já a solução da enzima tirosinase (Sigma, 3610 unidades/mg sólida) está numa proporção de 2 mg/ml, também em solução tampão.

Tirosinase (EC 1.14.18.1) foi imobilizada sobre as plataformas poliméricas de PPy (nanoestruturadas e compactas) pelo procedimento de *drop-casting*. Nessa etapa, foi pingado 50 μl de solução de tirosinase (2 mg/ml de tirosinase em solução tampão fosfato de potássio 50 mmol.l^{-1} e pH 6,5) sobre as plataformas compactas e nanoestruturadas (após a remoção das esferas de PS como descrito anteriormente) e em seguida, os substratos foram deixados em ambiente de baixa pressão para a evaporação do solvente da solução, restando apenas a enzima tirosinase imobilizada sobre a plataforma polimérica (Figura 49).



Figura 49: Método de imobilização da enzima e plataforma polimérica nanoestruturada de PPy com tirosinase.

3.5 CRONOAMPEROMETRIA

As medidas cronoamperométricas para cada experimento registram um valor de corrente como função do tempo, sendo o valor do potencial fixado em 0 V/SCE. Geralmente a variação da corrente registrada está relacionada com alguma alteração no eletrólito ou interface do eletrodo de trabalho.

3.5.1 Célula eletrolítica, eletrólito e incrementos de analito

A célula eletrolítica utilizada nas cronoamperometrias tem o mesmo arranjo que aquela utilizada na eletropolimerização do PPy e descrita anteriormente, sendo composta por três eletrodos conectados a um potenciostato. Entretanto, utiliza-se nesta etapa o software Nova 1.5 que permite dividir as medidas em duas etapas distintas, antes e após os incrementos de H_2O_2 ou catecol, e tratá-los de forma independente.

A solução onde serão feitas as medidas amperométricas para o biossensor não enzimático é composta de H_2SO_4 (Sigma-Aldrich) 0,1 mol.l^{-1} em meio aquoso (pH 1). Já para o biossensor enzimático a

solução utilizada para a realização das medidas de cronoamperometria é a solução tampão fosfato de potássio 50 mmol.l^{-1} (pH 6,5). O eletrodo de trabalho é conectado ao potenciostato junto com os outros eletrodos e então mergulhado em 50 ml dessa solução.

Com o auxílio de um agitador magnético, que será responsável pela homogeneização da solução após cada adição do analito em questão, e com o potencial fixado em 0 V/SCE, aguarda-se 1800 segundos, a fim de que a corrente de fundo estabilize, antes de iniciar a adição incremental de analito. Após a corrente atingir um valor estacionário, acréscimos fixos de analito são realizados na solução receptora em intervalos de tempo fixos de 100 segundos durante 1200 segundos, sendo que para cada amostra são feitos aproximadamente 12 acréscimos (esses parâmetros podem ser mudados dependendo do tipo de eletrodo ou medida que se deseja fazer).

Cada acréscimo de analito para o caso acima equivale a um incremento fixo na solução total e representa uma elevação na corrente proporcional ao acréscimo de analito realizado, atingindo a partir daí um novo patamar estacionário de corrente e assim sucessivamente para os acréscimos subsequentes (Figura 35).

3.6 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA

As propriedades elétricas dos eletrodos foram caracterizadas pela técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica, que fornece uma resposta elétrica após a aplicação de uma perturbação no sistema.

Os experimentos foram realizados numa cuba eletrolítica com três eletrodos conectados a um potenciostato. O software utilizado foi o FRA (Frequency Resonance Analyser).

Todas as medidas foram realizadas utilizando como eletrólito de suporte uma solução tampão fosfato de pH 6,5. Os intervalos de frequência utilizados variam entre 100 kHz até 10 mHz e a amplitude do potencial é de 10 mV. Já os potenciais fixos foram escolhidos dependendo de sistema em questão e do objetivo da medida.

3.7 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ELETRODOS

Os métodos de caracterização utilizados estão relacionados com as diversas etapas do trabalho e vão desde o controle de qualidade das máscaras coloidais até a caracterização das estruturas poliméricas de PPy.

3.7.1 Microscopia Óptica

A técnica de microscopia óptica foi utilizada no controle de qualidade e reprodutibilidade das máscaras coloidais produzidas antes de sua utilização na eletropolimerização do PPy. As máscaras coloidais atuam como cristais fotônicos que difratam a luz incidente sobre elas. Pequenas alterações na espessura e ordenamento do cristal coloidal se traduzem em intensas variações na coloração da máscara, que são facilmente detectáveis por microscopia óptica. Dessa forma o padrão de cores observado para amostras semelhantes (mesmo número de camadas e mesmo diâmetro de esferas) é sempre igual.

O microscópio óptico utilizado nessas caracterizações é um Leica modelo DM4500 P, localizado no Departamento de Física da UFSC e de caráter multiusuário (Figura 50). O software para a aquisição de dados é o IM50 da Leica.



Figura 50: Microscópio óptico.

3.7.2 Perfilometria

Outra técnica empregada para a caracterização morfológica dos eletrodos foi a perfilometria, que permite identificar gradientes de espessura ao longo da amostra, associando-os aos valores de carga depositada.

Para a realização dessas medidas, é realizada uma varredura em determinada região da amostra onde exista uma parte do substrato exposto (sem filme depositado) e outra parte com o filme depositado. O perfil é traçado em forma de degrau, do filme depositado para o substrato exposto (Figura 51). O perfilômetro utilizado neste trabalho é um Bruker (modelo Dektak XT) de caráter multiusuário e encontrado no Departamento de Física da UFSC.

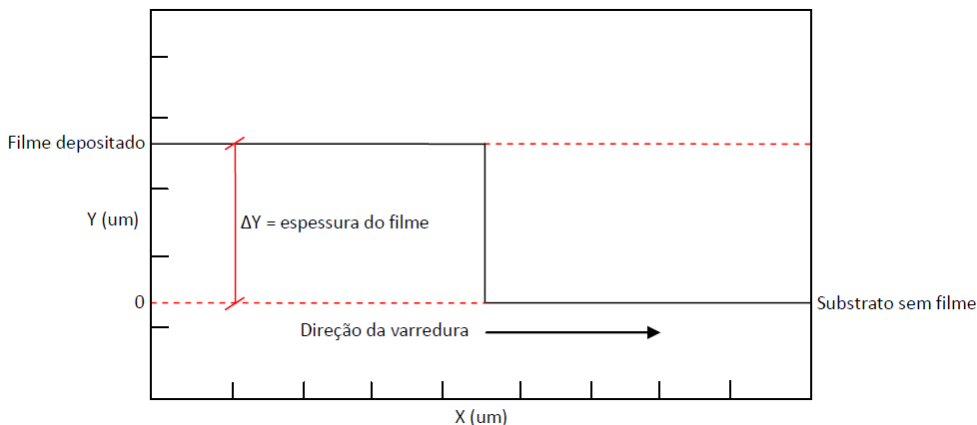


Figura 51: Típica curva de perfilometria para a determinação das espessuras de filmes finos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, serão apresentados os resultados obtidos em relação ao desenvolvimento, caracterização e estudo de um biossensor não enzimático, para detecção de peróxido de hidrogênio, e um biossensor enzimático de tirosinase, para detecção de catecol, propostos neste trabalho. O capítulo está dividido, basicamente, em quatro partes distintas. A primeira aborda a fabricação das máscaras coloidais e plataformas poliméricas compactas e nanoestruturadas de PPy; segue-se a análise, por espectroscopia de impedância, das plataformas fabricadas. Em seguida são apresentadas as medidas amperométricas relacionadas com a detecção do peróxido de hidrogênio para o biossensor não enzimático, que envolvem a determinação da sensibilidade, linearidade, tempo de resposta e estabilidade do eletrodo, assim como caracterizações elétricas. Por fim são apresentados os resultados obtidos para o biossensor enzimático de catecol, em relação às medidas amperométricas, com a enzima tirosinase já imobilizada na estrutura polimérica de PPy.

O objetivo principal deste trabalho envolve o desenvolvimento e fabricação de uma estrutura polimérica nanoestruturada, onde sua nova geometria, possa vir a ser um diferencial para a otimização de dispositivos na aplicação em biossensores.

4.1 ELETROPOLIMERIZAÇÃO DO PPy

Inicialmente, diferentes potenciais de eletropolimerização foram testados a fim de verificar se a formação de depósito ocorria a contento tanto nos substratos planos como nos substratos recobertos com o cristal coloidal. A Figura 52 mostra os transientes de densidade de corrente obtidos em substratos planos. Para cada curva a densidade de corrente registrada em $t = 0$ foi subtraída dos dados, a fim de realçar a escala vertical. A dependência entre o patamar de densidade de corrente (sem subtrair a corrente registrada para $t = 0$) e o potencial aplicado é mostrada no detalhe da Figura 52 onde é possível observar uma dependência linear entre o aumento do potencial de eletropolimerização e a densidade de corrente registrada. Além disso, verificou-se que os depósitos eletropolimerizados em baixos valores de potencial apresentaram baixa adesão e homogeneidade. No potencial de 1,8 V/SCE as amostras nanoestruturadas apresentaram boa qualidade, sendo esse, portanto, o potencial selecionado para a fabricação das amostras.

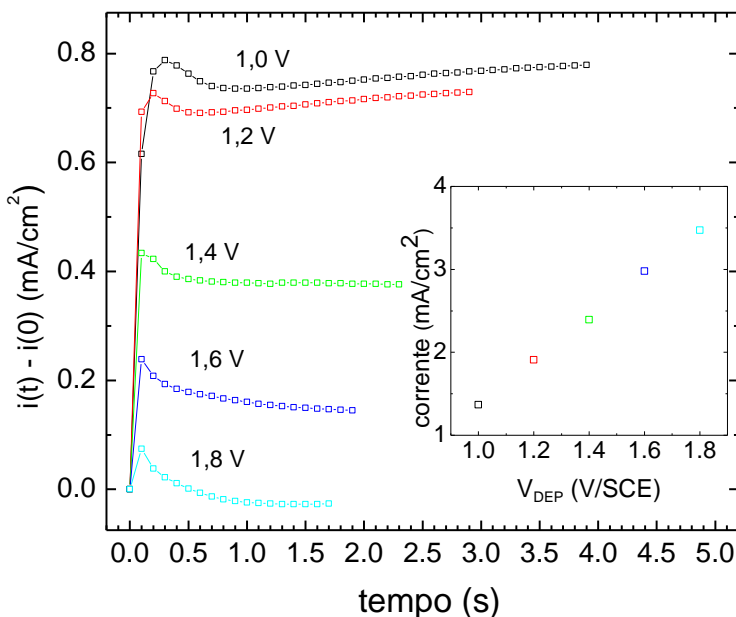


Figura 52: Transientes de corrente do processo de eletropolimerização do PPy.

No processo de eletropolimerização de filmes compactos sobre Si tipo p, é possível observar que o polímero cresce sobre o substrato a partir dos limites da área eletroativa, ou seja, a partir das bordas da área delimitada para a eletropolimerização. Dessa forma, o filme possui ao longo de sua superfície, um gradiente de espessura na direção radial, com as maiores espessuras nas bordas dos filmes e as menores no centro do filme. Apesar do gradiente de espessura das bordas, a área central do filme tem espessura homogênea. Para as etapas de imobilização da enzima e realização das medidas amperométricas, delimita-se no filme uma área central ligeiramente menor, a fim de contornar o problema das bordas.

A seguir (Figura 53a e Figura 53b) estão representadas caracterizações por microscopia óptica. O gradiente de espessura é indicado pela mudança gradativa da cor do filme (relacionadas com a espessura do mesmo).

Medidas de perfilometria foram realizadas para determinar a relação entre a espessura do filme e carga polimérica depositada, além de estimar o grau de variação da espessura ao longo da superfície do filme. Essas medidas foram realizadas para todas as cargas utilizadas nesse trabalho, e apresentaram ótima reprodutibilidade para todas as amostras. As figuras a seguir relacionam as imagens de microscopia óptica (Figura 53a e Figura 53b) e medidas de perfilometria (Figura 53c e Figura 53d), para as mesmas regiões de uma mesma amostra, sendo os filmes eletropolimerizados com uma carga de 5 mC.

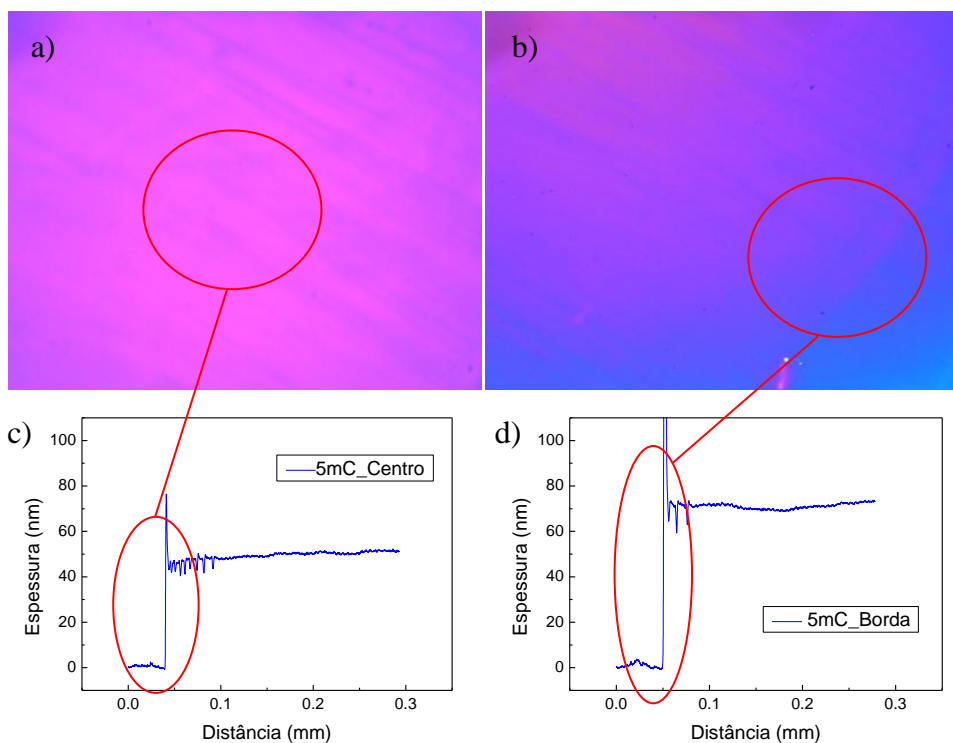


Figura 53: Imagens de microscopia óptica dos filmes compactos de PPy com carga de 5 mC a) no centro da amostra e b) na borda da amostra. Ampliação de 50x. c) Medida de perfilometria no centro e d) na borda.

Das medidas de perfilometria acima, é possível observar que o polipirrol possui uma rugosidade muito baixa, em toda a superfície. Na Tabela 5 estão relacionados os valores de carga depositada, numa área de $0,28 \text{ cm}^2$, com as respectivas espessuras medidas por perfilometria no centro e na borda das amostras. Os mesmos dados são mostrados na Figura 54, que mostra uma relação linear entre a espessura do filme e carga eletropolimerizada, tanto no centro como na borda da amostra. Para as medidas realizadas no centro da amostra observa-se que nos primeiros estágios de crescimento a razão entre altura de filme e carga eletropolimerizada, de $(12,4 \pm 0,9) \text{ nm/mC}$, é um pouco menor que nos estágios posteriores, quando aumenta ligeiramente para $15,2 \pm 0,3) \text{ nm/mC}$ para espessuras acima de 9 nm. Pode-se considerar que nos estágios iniciais ocorre o crescimento de uma estrutura mais compacta, resultante do processo de nucleação do polímero sobre o substrato de Si. O ajuste linear de todos os pontos dá um valor médio de $(14,8 \pm 0,2) \text{ nm/mC}$.

Carga (mC)	Espessura centro (nm)	Espessura borda (nm)
1	6	12
3	25	33
5	50	72
7	77	103
9	90	125
11	135	190
20	260	385
30	410	470
40	560	760
50	730	885

Tabela 5: Relação entre as cargas depositadas e espessuras dos filmes. A área de deposição utilizada é de $0,28 \text{ cm}^2$.

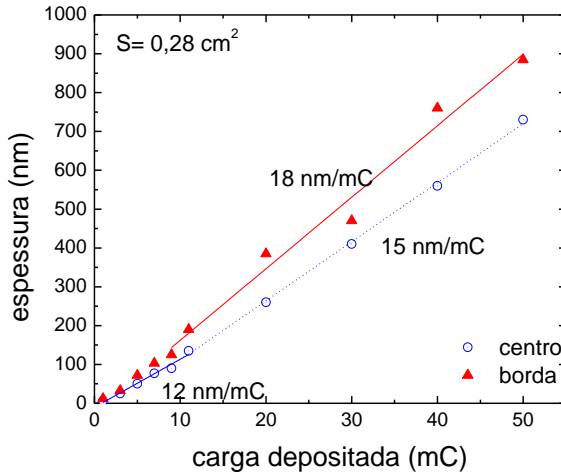


Figura 54: Espessura de filmes compactos de PPy medida por perfilometria em função da carga nominal de eletropolimerização. Medidas realizadas no centro da amostra (círculos abertos azuis) e na borda (triângulos fechados vermelhos). As linhas sólidas e tracejadas são ajustes realizados para determinar a taxa de crescimento, conforme indicado nas legendas.

O mecanismo de polimerização proposto no Capítulo 2 envolve 2,33 elétrons (n) por unidade pirrólica, cuja massa molar M_{mol} é 67,09 g/mol. Assumindo um valor médio para a densidade ρ do polipirrol de 1,46 g/cm³ pode-se calcular a relação entre a espessura h do depósito e a carga nominal Q de eletropolimerização:

$$h[nm] = \frac{Q[mC]M_{mol}}{S \rho N_A n e} = 7,3 \quad (17)$$

O valor médio experimental de 14,8 nm/mC está um fator 2 acima da previsão teórica. Pelo menos dois fatores podem estar contribuindo para a discrepância. Por um lado, nas medidas de perfilometria não se tomou nenhum cuidado específico quanto ao processo de secagem da amostra, que pode ainda conter moléculas de

água incorporadas que diminuem a densidade efetiva do depósito. De outro, é necessário considerar que a eletropolimerização foi efetuada em potencial anódico de 1,8 V/SCE. Neste potencial, reações paralelas de oxidação (do eletrólito, por exemplo) podem ocorrer, liberando prótons que acidificam o meio e promovem a polimerização química do pirrol (113). Neste caso, o valor n “efetivo” de elétrons transferidos por unidade pirrólica seria menor. A concordância com os dados experimentais, neste caso, resultaria num n “efetivo” de 1,15, em concordância com valores encontrados na literatura (113).

As medidas de perfilometria também indicam que com o aumento da espessura, ocorre um aumento progressivo da rugosidade do depósito polimérico, conforme se depreende da Figura 55, que mostra a superposição do perfil de rugosidade das amostras com 5, 30 e 50 mC de carga.

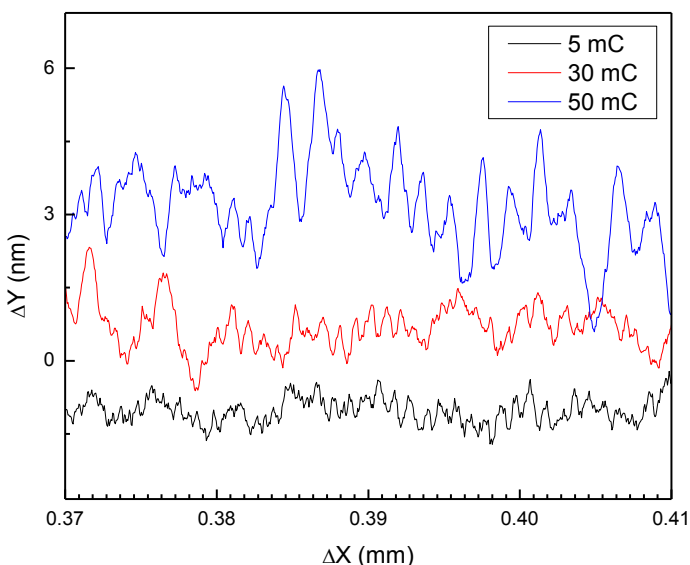


Figura 55: Rugosidade dos depósitos compactos de polipirrol para diferentes cargas de eletropolimerização.

4.2 CONFEÇÃO DE MÁSCARAS COLOIDAIS

Uma vez que um dos objetivos deste trabalho consiste em se determinar como a geometria da nanoestruturação do polímero influencia na resposta do biossensor, é imprescindível que as máscaras coloidais sejam bem ordenadas e tenham espessura homogênea, a fim de que o subsequente processo de nanoestruturação também ocorra de forma homogênea.

A Figura 56 exibe, a título de contra-exemplo, imagens de microscopia óptica de máscaras coloidais com espessura não homogênea. Os fenômenos de interferência com luz visível que ocorrem em uma máscara coloidal com ordenamento periódico permitem distinguir muito claramente as regiões de monocamada, bicamada, etc, das regiões com o substrato a descoberto. Em (a) vê-se, por exemplo, uma máscara com recobrimento incompleto: as áreas brancas correspondem ao substrato de silício e a área laranja corresponde à presença de uma monocamada ordenada de esferas. Em (b) observa-se a formação de uma segunda camada incompleta (mais escura) sobre a região de monocamada (mais clara). Regiões com diferentes espessuras têm taxas de polimerização distintas, resultando em filme com morfologia irregular. Por isso, somente máscaras de espessura homogênea foram utilizadas neste trabalho.

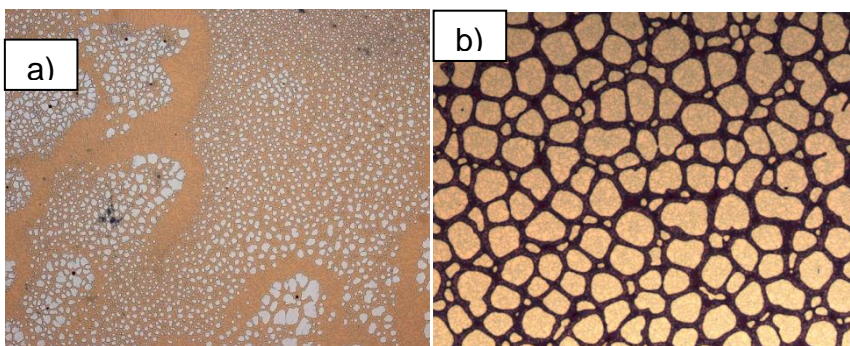


Figura 56: Imagens de microscopia óptica de máscaras coloidais de péssima qualidade com a) regiões com o substrato descoberto e b) formação de uma segunda camada incompleta.

A Figura 57, Figura 58 e Figura 59 mostram imagens de microscopia óptica das máscaras coloidais utilizadas na fabricação dos dois biossensores propostos neste trabalho. As imagens referem-se a máscaras produzidas a partir de esferas de poliestireno, com diâmetros de 476 nm, 535 nm, 600 nm, 250 nm e 756 nm, respectivamente. As condições do microscópio são as mesmas para todas as amostras.

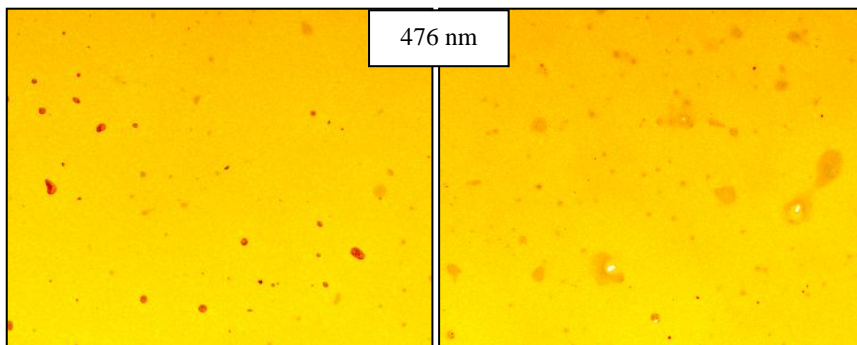


Figura 57: Imagens de microscopia óptica das monocamadas de esferas de poliestireno com 476 nm de diâmetro. Ampliação de 50x.

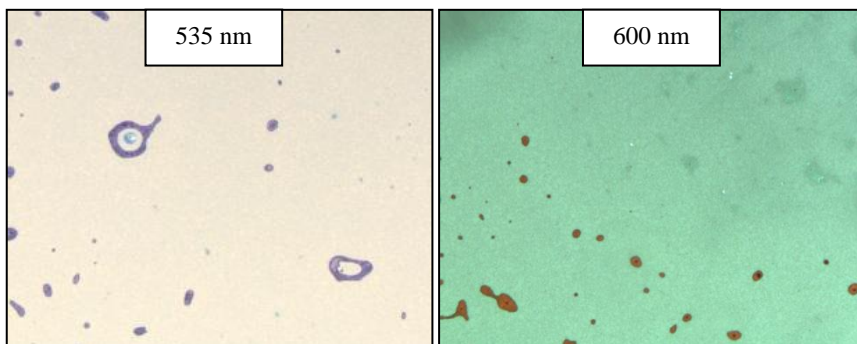


Figura 58: Imagens de microscopia óptica das monocamadas de esferas de poliestireno com 535 nm e 600 nm de diâmetro. Ampliação de 50x.

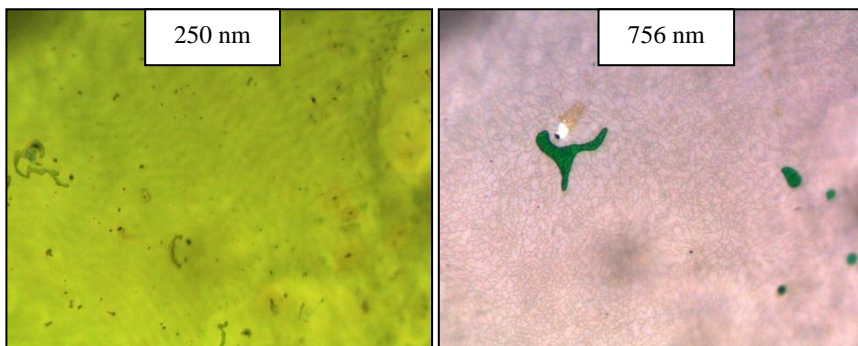


Figura 59: Imagens de microscopia óptica das monocamadas de esferas de poliestireno com 250 nm e 756 nm de diâmetro. Ampliação de 50x.

Das imagens anteriores, é possível observar que as máscaras apresentam homogeneidade muito boa em grande parte da amostra. A diferença de cores das imagens, das máscaras com esferas de diferentes diâmetros, deve-se a fenômenos de interferência, que são sensíveis à periodicidade da rede (relacionadas ao diâmetro das esferas). Esse é um bom método para analisar a qualidade das máscaras, utilizando apenas um microscópio óptico e considerando o padrão de cores refletido. As regiões com cores diferentes indicam a presença das chamadas “ilhas” ou buracos. Chamamos de “ilhas”, as regiões onde ocorre a formação de uma segunda camada de esferas. Buracos são regiões de falhas no ordenamento, que deixam o substrato de silício exposto. Máscaras de boa qualidade são aquelas onde as regiões com ilhas e buracos representam menos de 10 % da área.

4.3 NANOESTRUTURAÇÃO DO PPy

As monocamadas coloidais foram utilizadas como substrato na eletropolimerização do pirrol, resultando em plataformas nanoestruturadas com diferentes espessuras, ou seja, diferentes morfologias. As estruturas de PPy resultantes apresentam ótima qualidade para todos os diâmetros de esferas utilizados. Observa-se que as estruturas possuem ordenamento hexagonal, sendo que as mesmas foram obtidas em grandes áreas. Nota-se, além disso, a inexistência dos efeitos de borda que haviam sido observados no caso do eletrodo plano. De fato, este deveria ser um fato esperado quando se considera que as esferas de poliestireno atuam como inclusões isolantes, da mesma forma

que a fita isolante que delimita a área eletroativa. Portanto, para o eletrodo nanoestruturado a “concentração” de linhas de campo que ocorre na interface isolante/metal, e que é responsável pelo efeito de borda, está homoganeamente espalhada por todo o substrato.

Para este trabalho selecionamos basicamente três tipos de morfologia, correspondendo a (i) $h < R$; (ii) $h \sim R$; (iii) $h < 2R$. O controle da morfologia é realizado pelo controle da carga de eletropolimerização. Subsequentemente as esferas de PS são seletivamente removidas por dissolução em tolueno.

A caracterização em detalhes da morfologia das estruturas foi realizada com o microscópio eletrônico de varredura de alta resolução (FEG-SEM) (JEOL, modelo JSM-6701F) do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC, que permite maior profundidade de foco.

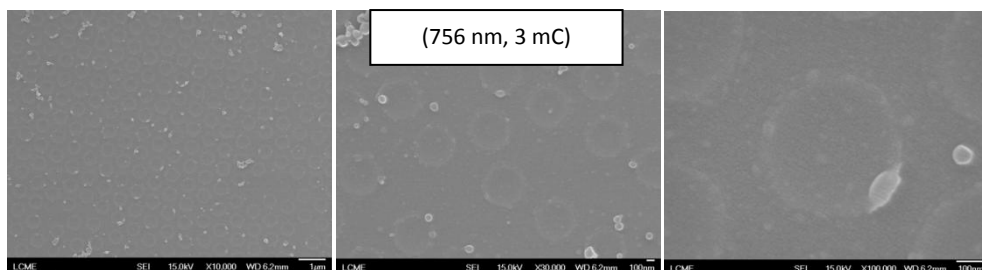


Figura 60: Imagens de FEG com diferentes magnificações das nanoestruturas de PPY produzidas a partir de esferas de 756 nm de diâmetro e carga de 3 mC.

As micrografias da Figura 60 são referentes a nanoestruturas produzidas a partir de esferas de 756 nm de diâmetro e carga depositada de 3 mC, com nível de preenchimento muito abaixo do equador das esferas, no início do crescimento polimérico. É possível observar que o polipirrol recobre homoganeamente o substrato de silício e também começa a formar uma membrana que cresce ao redor de cada esfera (calota). A partir das imagens da Figura 60 é possível medir a periodicidade efetiva das esferas, em torno de 718 nm, ou seja, cerca de 95% do diâmetro nominal das esferas. O anel mais claro que circunda as mesmas permite estimar a espessura da calota esférica pirrólica, em torno de 30 nm. Além disso, seu diâmetro indica que a calota esférica tem uma altura de 93 nm, ou seja, 0,26R. A partir dessas dimensões pode-se estimar o volume de pirrol que está nanoestruturado em forma

de calotas. Assumindo que a taxa inicial de crescimento do polipirrol é de 12,4 nm/mC, infere-se o volume total de pirrol eletropolimerizado. Ao descontar deste o volume de material em forma de calota, chega-se a uma estimativa da espessura da camada de pirrol que reveste o silício, que também é de 30 nm. Conclui-se, portanto, que o pirrol começa a crescer a partir do substrato de silício passando depois a envolver as esferas com uma camada de espessura homogênea que se estabiliza em torno de 30 nm. Esse modelo de crescimento está esquematizado na Figura 61. Trabalho anterior (11) já havia mostrado que o pirrol cresce de forma conformacional, envolvendo as esferas com uma calota com espessura de dezenas de nanômetros. No entanto, não foi possível à época, obter dados quantitativos. Graças ao uso do microscópio FEG-SEM, podemos, agora, determinar com boa precisão o mecanismo de crescimento do depósito.

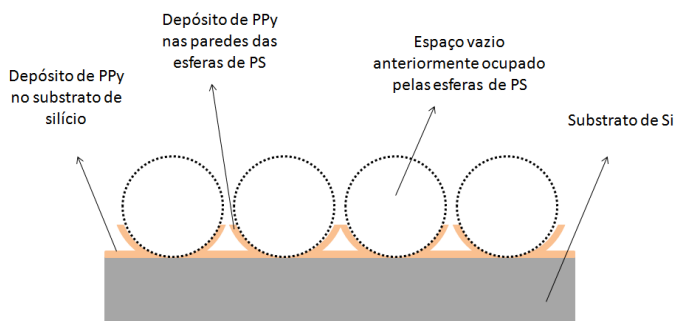


Figura 61: Modelo de crescimento conformacional para o polipirrol.

Na Figura 62 a máscara coloidal é preenchida com 5 mC. Fica evidente a alta homogeneidade das plataformas, e a alteração da morfologia dos alvéolos de polipirrol, que assumem uma geometria hexagonal. A periodicidade efetiva da estrutura fica em torno de 737 nm, ou seja, 97% do diâmetro nominal das esferas. A espessura das paredes pirrônicas é de (26 ± 6) nm. Pelas dimensões dos hexágonos infere-se que calota alcançou 272 nm de altura, ou 0,74R. A diferença entre o volume total de pirrol eletropolimerizado e o volume das calotas permite inferir que a espessura do depósito que recobre o silício aumentou para 49 nm.

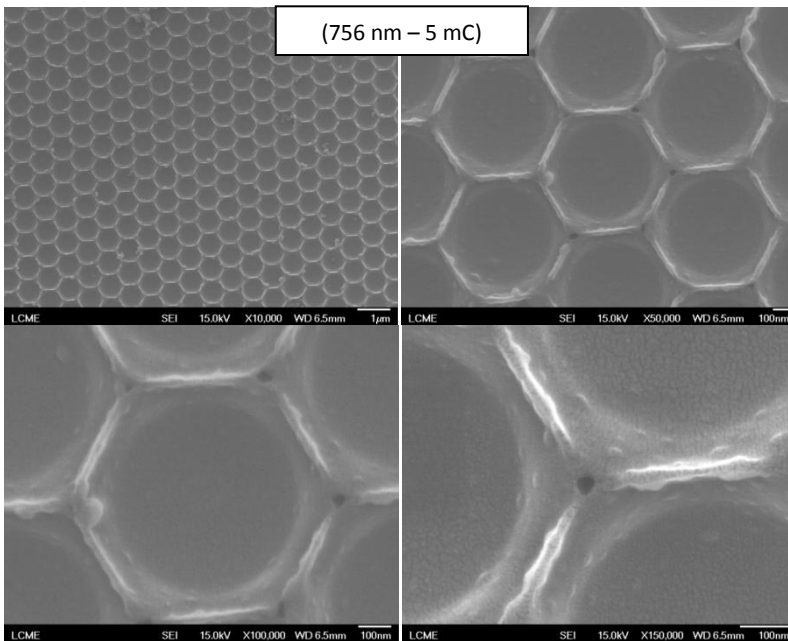


Figura 62: Imagens de FEG com diferentes magnificações das nanoestruturas de PPy produzidas a partir de esferas de 756 nm de diâmetro e carga de 5 mC.

Na Figura 63 as amostras com carga depositada de 7 mC, para esferas de 756 nm de diâmetro, representam um depósito até aproximadamente o equador das esferas. A periodicidade medida é de 726 nm, que representa 96% do diâmetro nominal das esferas. A espessura das paredes fica em torno de (19 ± 2) nm e a altura da calota corresponde a 0,87R, ou seja 316 nm. Nesse nível, é possível observar o surgimento de pequenos vãos entre as esferas, que estão relacionados com o crescimento conformacional do pirrol.

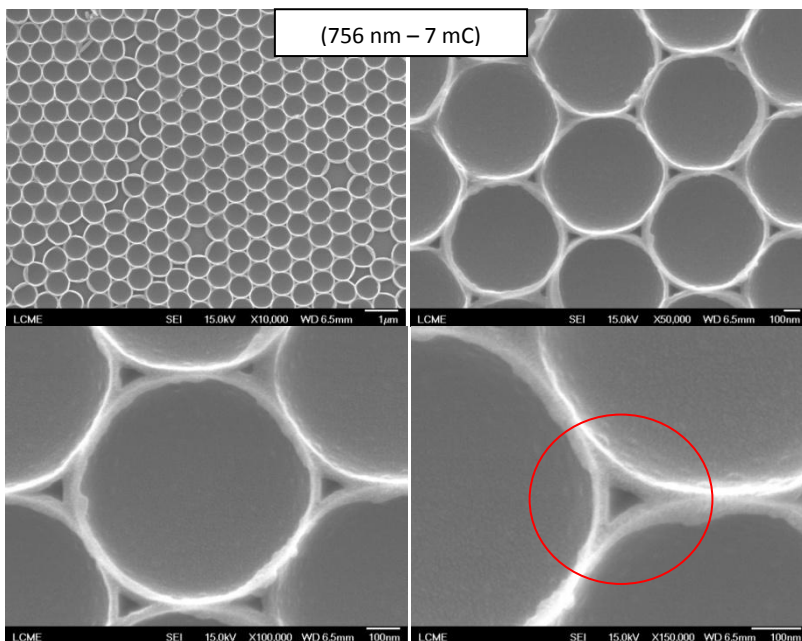


Figura 63: Imagens de FEG com diferentes magnificações das nanoestruturas de PPy produzidas a partir de esferas de 756 nm de diâmetro e carga de 7 mC.

As micrografias a seguir representam, analogamente às anteriores, diferentes níveis de preenchimento para esferas de 476 nm de diâmetro.

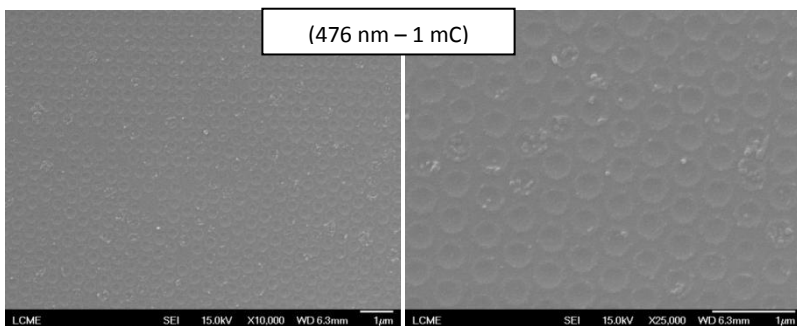


Figura 64: Imagens de FEG com diferentes magnificações das nanoestruturas de PPy produzidas a partir de esferas de 476 nm de diâmetro e carga de 1mC.

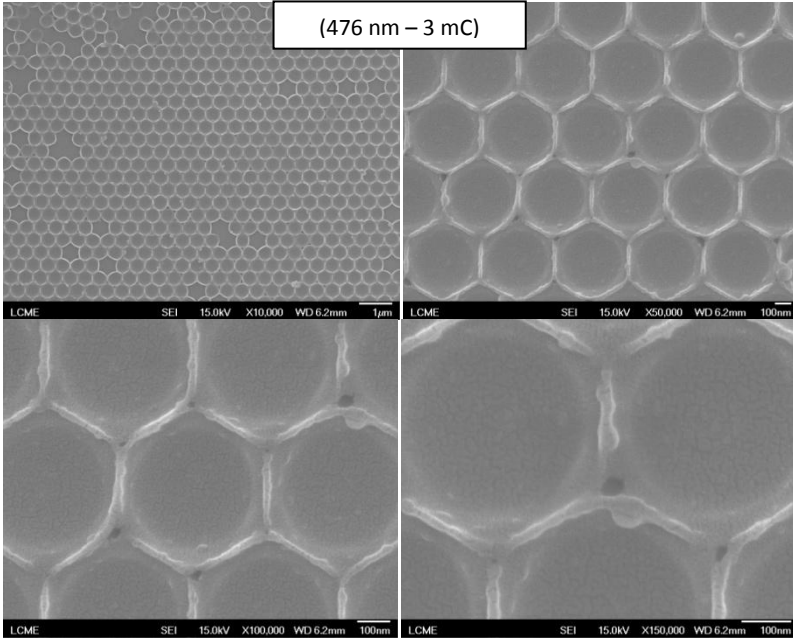


Figura 65: Imagens de FEG com diferentes magnificações das nanoestruturas de PPy produzidas a partir de esferas de 476 nm de diâmetro e carga de 3 mC.

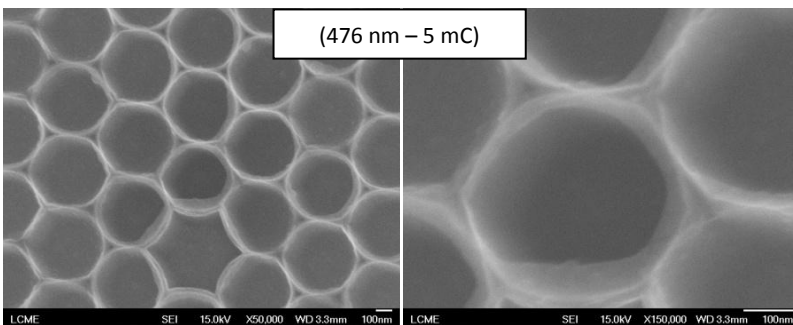


Figura 66: Imagens de FEG com diferentes magnificações das nanoestruturas de PPy produzidas a partir de esferas de 476 nm de diâmetro e carga de 5 mC.

A Figura 67 ilustra uma amostra onde, o crescimento polimérico ocorreu até acima do equador das esferas. Observa-se que a abertura das esferas fica bastante reduzida e que a estrutura interna dessas plataformas é oca. A morfologia já não apresenta a mesma regularidade das estruturas anteriores.

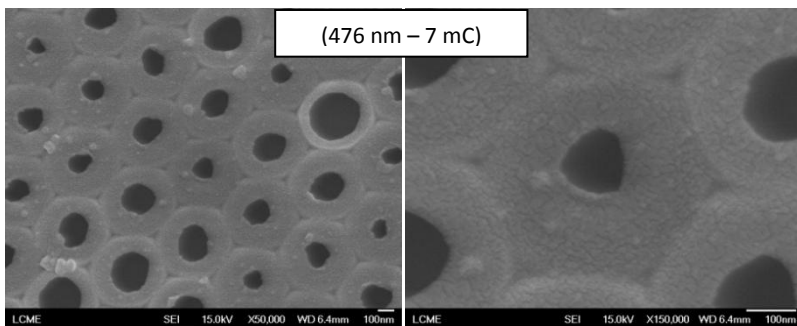


Figura 67: Imagens de FEG com diferentes magnificações das nanoestruturas de PPy produzidas a partir de esferas de 476 nm de diâmetro e carga de 7 mC.

4.4 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA: FILMES COMPACTOS VS. NANOESTRUTURADOS

Medidas de impedância eletroquímica (EIS) foram realizadas com o intuito de investigar como as diferentes morfologias afetam as propriedades elétricas das plataformas poliméricas. Durante as medidas de impedanciometria observou-se que as propriedades elétricas das amostras evoluem no tempo, devido ao processo de envelhecimento do pirrol, fenômeno já relatado na literatura (114). Portanto, para cada parâmetro que foi variado, tomou-se o cuidado de se manter as mesmas condições de preparo e tempo decorrido entre a fabricação do substrato e a tomada de dados. Os conjuntos de medida abaixo elencados apresentam, portanto, consistência interna, mas não cabem comparações entre grupos diferentes de medidas, visto que o tempo decorrido entre fabricação e a medida pode ser diferente.

A influência dos seguintes parâmetros foi investigada:

- A) influência da voltagem de eletropolimerização em filmes compactos com 5 mC de carga nominal;
- B) influência da espessura em filmes compactos com carga nominal variando entre 5 e 35 mC, eletropolimerizados em 1,8 V/SCE;
- C) influência da espessura em filmes compactos com carga nominal variando entre 1 e 9 mC, eletropolimerizados em 1,8 V/SCE;
- D) influência do nível de preenchimento em filmes nanoestruturados a partir de esferas de 476 nm de diâmetro, com carga nominal variando entre 1 e 9 mC, eletropolimerizados em 1,8 V/SCE;
- E) influência da espessura em filmes compactos sem nanopartículas de Pt com carga nominal variando entre 1 e 9 mC, eletropolimerizados em 1,8 V/SCE;
- F) influência da espessura em filmes compactos com nanopartículas com carga nominal variando entre 1 e 9 mC, eletropolimerizados em 1,8 V/SCE.
- G) Influência da adição de nanopartículas de Pt em filmes nanoestruturados a partir de esferas de 476 nm de diâmetro (1 mC).

Vale lembrar que para as séries A, B, C e D foram medidas em solução tampão fosfato de potássio, enquanto que as séries E, F e G foram medidas em eletrólito de H_2SO_4 .

As figuras a seguir trazem um panorama geral de todos os conjuntos de medidas, representados na forma de gráficos de Bode, ou seja, módulo da impedância (primeira coluna) e ângulo de fase (segunda coluna) em função do logaritmo da frequência. Os gráficos de ângulo de fase mostram claramente que existem dois processos de transporte ocorrendo em diferentes faixas de frequência: um processo lento, na faixa de 0,1 a 10 Hz e outro processo rápido em frequências acima de 1kHz. Ambos são caracterizados por máximos do ângulo de fase, bem resolvidos no domínio das frequências, que podem ser descritos, cada qual, por uma combinação em paralelo de um resistor R e um elemento capacitivo Q. A fim de identificar a origem de cada um desses processos, vamos analisar cada série de medidas em separado.

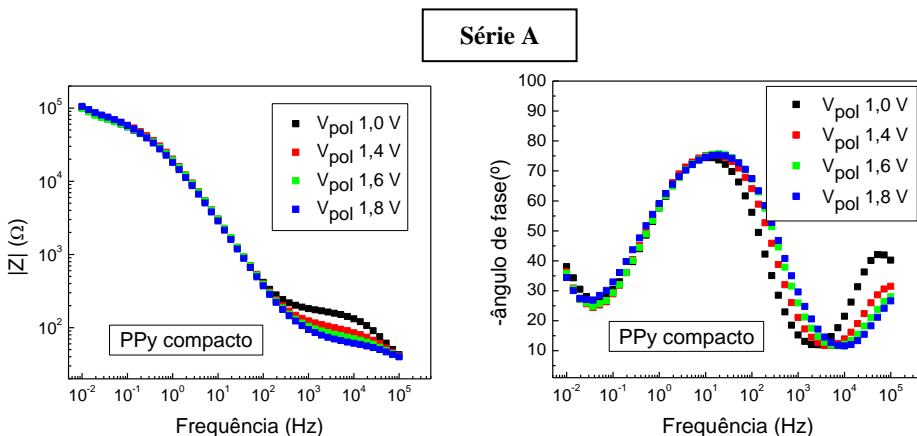


Figura 68: Série A: Filmes de PPy compacto de mesma espessura ($Q = 5 \text{ mC}$) eletropolimerizados em diferentes potenciais.

Série B

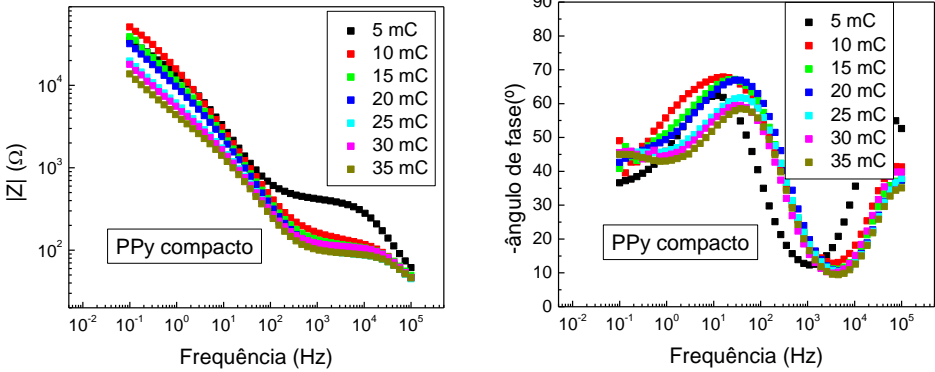


Figura 69: Série B: Filmes de PPY compacto com diferentes espessuras eletropolimerizados em potencial 1,8 V.

Série C

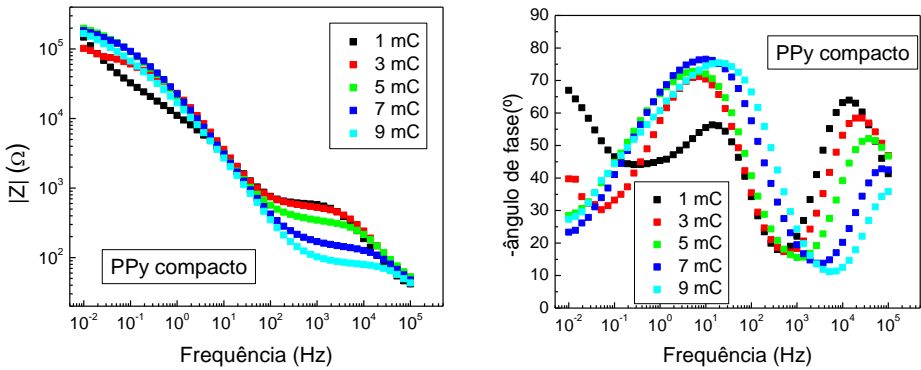
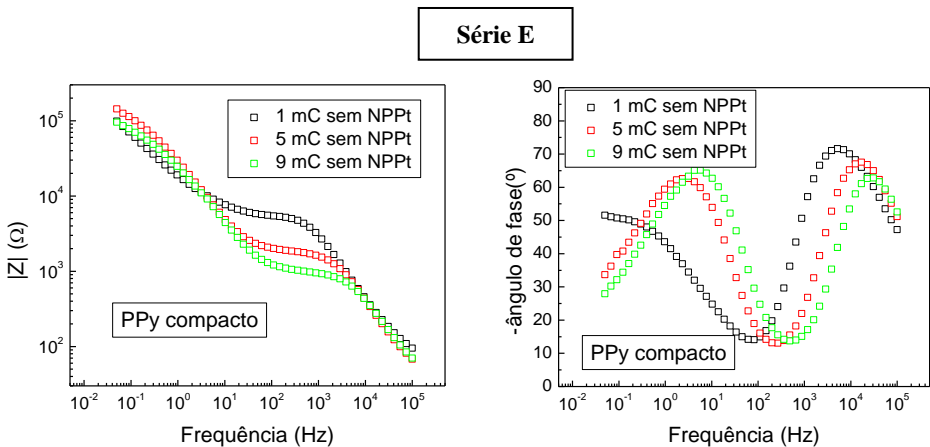
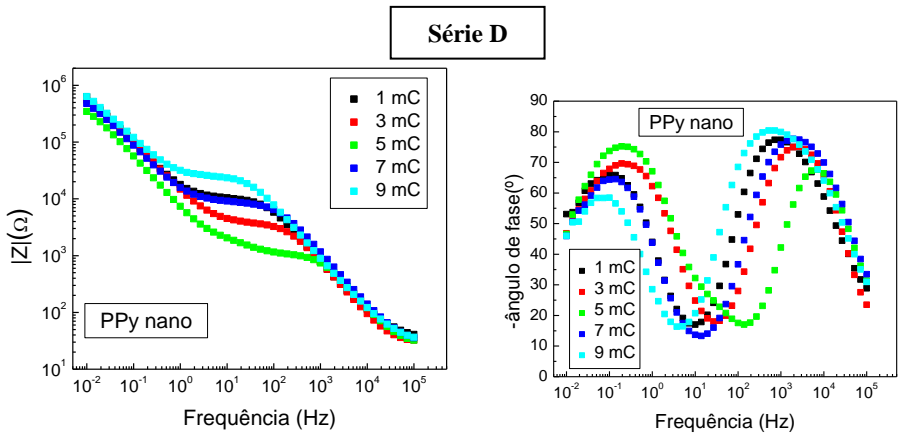


Figura 70: Série C: Filmes de PPY compacto com diferentes espessuras eletropolimerizados em potencial 1,8 V. Espessuras menores.



Série F

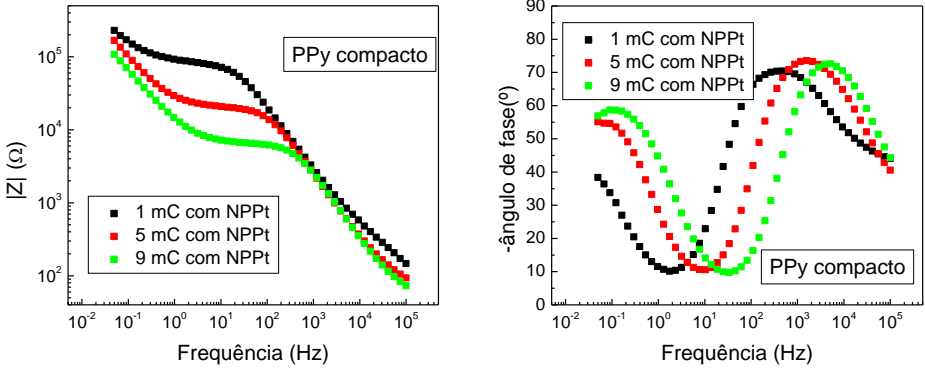


Figura 73: Série F: Filmes de PPy compactos com três espessuras específicas eletropolimerizados em potencial 1,8 V, com nanopartículas.

Série G

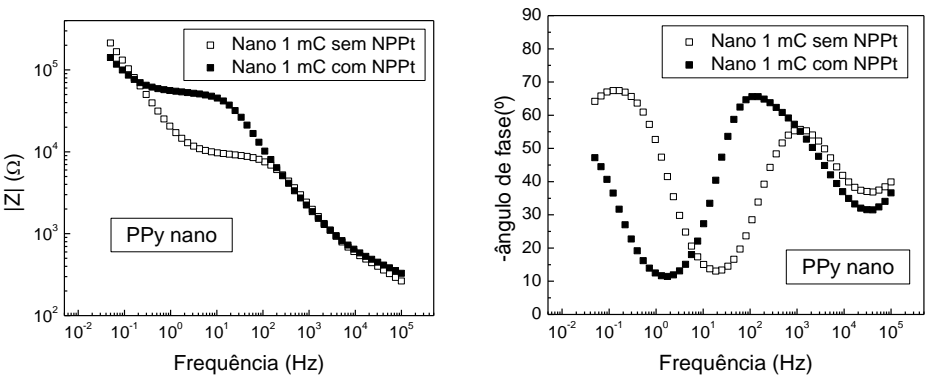


Figura 74: Série G: Filmes de PPy nanoestruturados com mesma carga eletropolimerizada em potencial 1,8 V, com e sem nanopartículas.

Na série A são comparadas amostras com mesma carga de polimerização que devem, a princípio, possuir a mesma espessura. Observa-se que o módulo da impedância e o ângulo de fase não se alteram na região de baixas frequências para todas as amostras. Um comportamento diferenciado no módulo de impedância surge apenas no patamar que separa os dois processos, relacionado com a resistência R do processo rápido e que neste caso diminui com o aumento do potencial de eletropolimerização. Sabe-se de trabalhos anteriores do grupo (8) que com o aumento do potencial de síntese o depósito de polipirrol fica mais rugoso. A rugosidade do filme aumenta a área específica da interface polímero/eletrólito, com consequente diminuição da resistência de transferência de carga. Pode-se, assim, associar o processo rápido com a interface polímero/eletrólito.

O mesmo efeito é observado nas séries B e C, que comparam filmes de diferentes espessuras. Observa-se novamente que o patamar de impedância diminui com o aumento de espessura, que está, por sua vez, diretamente relacionado com o aumento da rugosidade (ver Figura 55). No entanto, verifica-se que o efeito da rugosidade sobre o patamar de impedância satura para cargas superiores a 15 mC. Por outro lado, observa-se na série B que o módulo de impedância em toda a faixa de baixas frequências diminui com a espessura de forma monotônica. Podemos, portanto, correlacionar o processo observado em baixas frequências com o transporte iônico que ocorre dentro da estrutura porosa do polímero.

No caso das plataformas nanoestruturadas (série D) o patamar de impedância do processo rápido tem um valor mínimo quando a altura do depósito atinge o equador das esferas. Quando os alvéolos de pirrol continuam a crescer e passam a se fechar novamente, o patamar de impedância volta a aumentar, ultrapassando, inclusive, os valores iniciais. Trata-se de um resultado surpreendente, pois esperava-se que o aumento da superfície dos alvéolos, conforme visto nas micrografias MEV, contribuísse para a diminuição da resistência da interface. O fato da impedância voltar a aumentar, quando os alvéolos ultrapassam a linha do equador, começando a se fechar, indica que, aparentemente, a área de contato efetivo entre o polipirrol e o eletrólito restringe-se à camada superior dos alvéolos, conforme esquematizado na **Erro! Fonte e referência não encontrada.** Reforça-se, portanto, a interpretação de que o processo em altas frequências está relacionado com a morfologia da interface entre o polipirrol e o volume do eletrólito, e que quanto maior for a área desta interface, menor será a resistência para a transferência de carga. Por outro lado, verifica-se, ao comparar as séries C e D, que a

nanoestruturação, para um mesmo volume de material eletropolimerizado, aumenta a resistência por um fator que varia de 17 a 300, o que pode estar relacionado ao crescimento confinado do pirrol dentro do molde, que gera membranas pirrônicas de baixa rugosidade. Portanto, a nanoestruturação dos eletrodos afeta primordialmente a interface externa do polímero com o eletrólito.

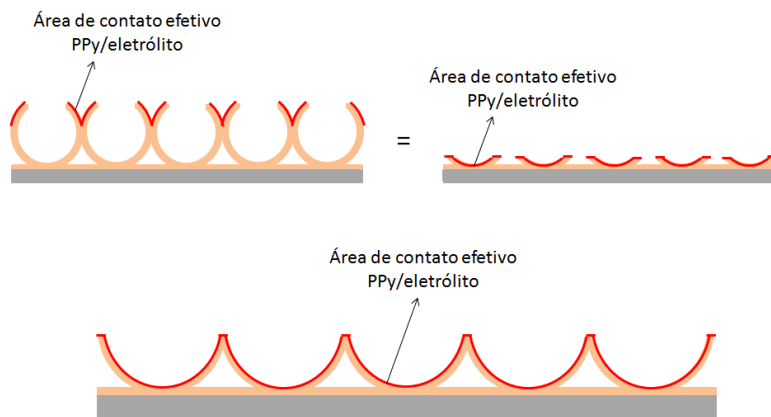


Figura 75: Plataformas nanoestruturadas com diferentes níveis de preenchimento e área de contato efetivo entre o polipirrol e o eletrólito.

As séries E e F mostram o efeito provocado pela imobilização de nanopartículas de Pt sobre o filme de polipirrol compacto. Conforme descrito no Capítulo 2, as nanopartículas de Pt estão dispersas no dendrímero poli (amido amina) (PAMAM), onde permanecem estáveis e não se aglomeram. Sendo uma matriz isolante, a adsorção de PAMAM aumenta a impedância do sistema, conforme observado na figura e relatado inúmeras vezes na literatura (115).

Finalmente, a série G mostra que também para um filme nanoestruturado, a adição da matriz isolante com NP de Pt provoca o aumento da impedância da estrutura.

A fim de se obter mais informações acerca dos sistemas investigados deve-se analisar em separado a representação logarítmica das partes real e imaginária da impedância em função do logaritmo da frequência. Os tempos característicos de processos de transporte descritos por associações em paralelo de resistores e capacitores são

caracterizados por um máximo no gráfico de $\log(Z_{\text{Imag}})$ em função do logaritmo da frequência. A assíntota desse máximo, pelo lado de altas frequências, fornece o valor de n do elemento de fase constante (CPE) que substitui o capacitor quando o sistema é descrito por uma distribuição de tempos característicos. Por outro lado, as resistências envolvidas no processo podem ser obtidas a partir das assíntotas no gráfico de $\log(Z_{\text{real}})$ vs. $\log(\text{freq.})$. As figuras a seguir exibem ambas as representações para todas as séries investigada.

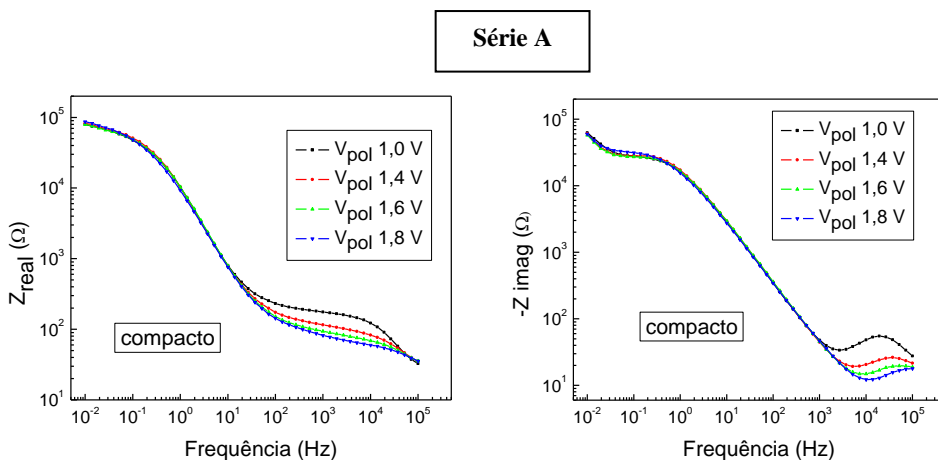


Figura 76: Série A: Filmes de PPy compacto de mesma espessura ($Q = 5 \text{ mC}$) eletropolimerizados em diferentes potenciais.

Série B

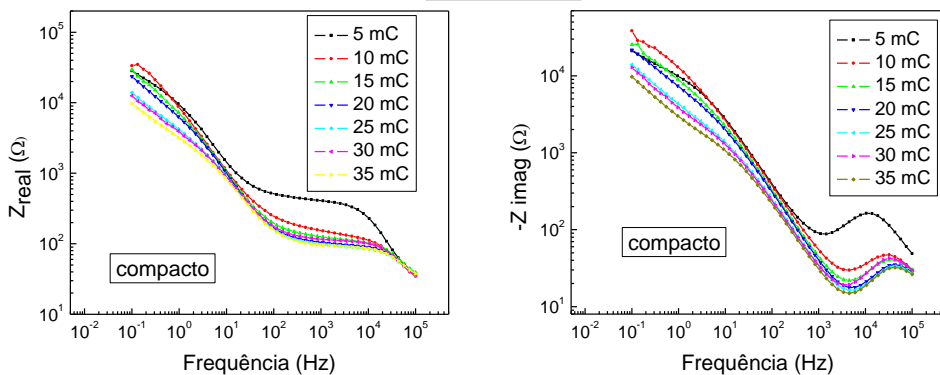


Figura 77: Série B: Filmes de PPy compacto com diferentes espessuras eletropolimerizados em potencial 1,8 V.

Série C

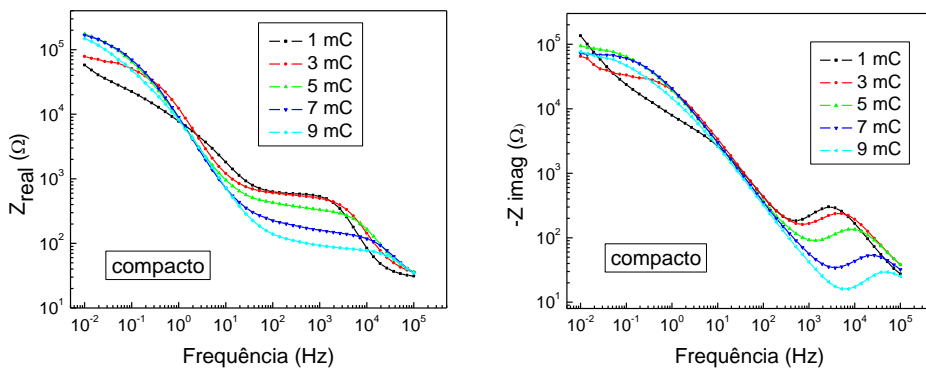


Figura 78: Série C: Filmes de PPy compacto com diferentes espessuras eletropolimerizados em potencial 1,8 V. Espessuras menores.

Série D

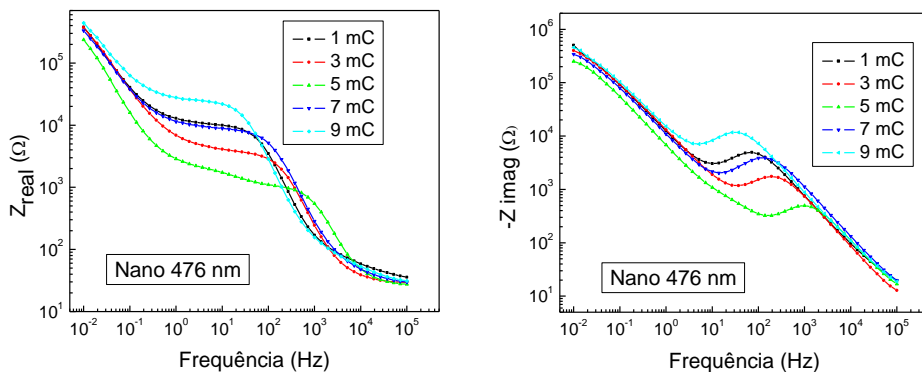


Figura 79: Série D: Filmes de PPy nanoestruturados com diferentes espessuras eletropolimerizados em potencial 1,8 V.

Série E

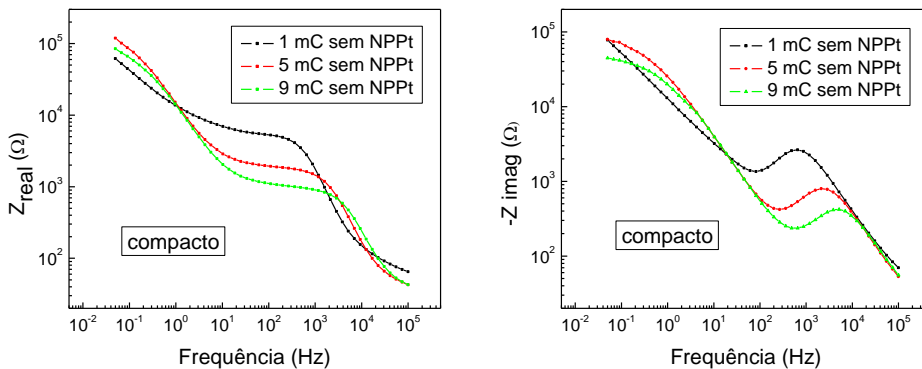


Figura 80: Série E: Filmes de PPy compactos com três espessuras específicas eletropolimerizados em potencial 1,8 V, sem nanopartículas.

Série F

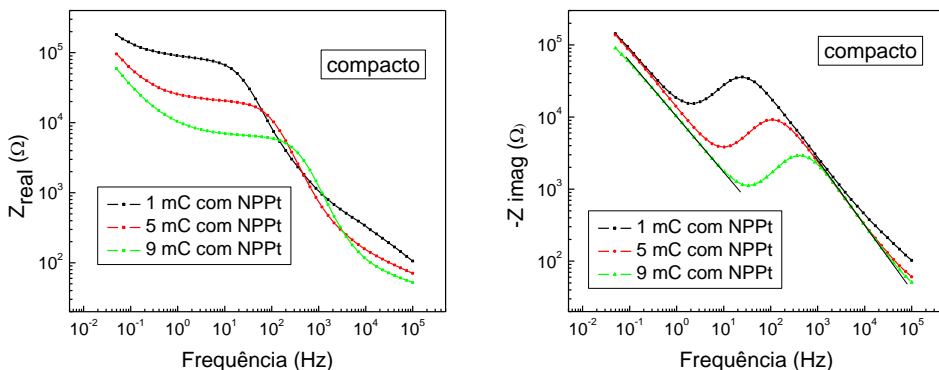


Figura 81: Série F: Filmes de PPy compactos com três espessuras específicas eletropolimerizados em potencial 1,8 V, com nanopartículas.

Série G

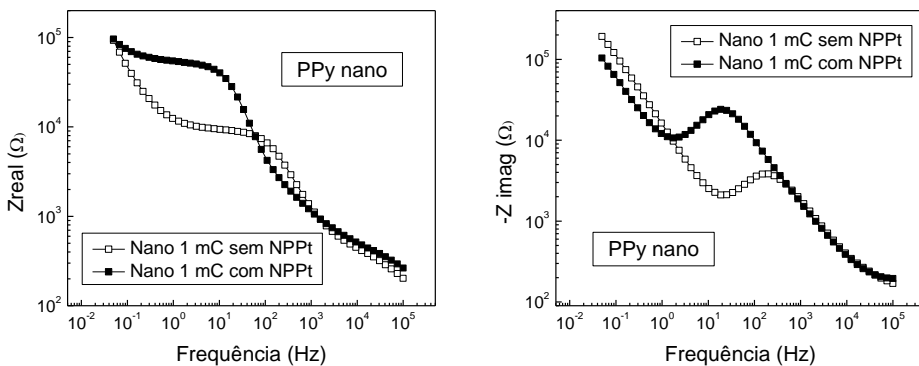


Figura 82: Série G: Filmes de PPy nanoestruturados com mesma carga eletropolimerizada em potencial 1,8 V, com e sem nanopartículas.

Novamente, num panorama geral, as seguintes constatações são realizadas:

- (i) Somente nas séries C e D é possível verificar um valor assintótico para a resistência do eletrólito, que ficou em torno de 30Ω (amostras compactas) e 27Ω (amostras nanoestruturadas). Nas demais séries a faixa de frequência varrida não foi suficiente para se atingir os valores assintóticos para a resistência total do sistema (baixas frequências) e para a resistência do eletrólito (altas frequências). Em trabalhos futuros será necessário realizar uma medida independente da resistência do eletrólito, a fim de reduzir o número de parâmetros indeterminados.
- (ii) O processo de transferência eletrônica que ocorre na interface externa do polímero/eletrólito encontra-se suficientemente bem descrito somente para as séries D, E, F e G, que são séries de amostras nanoestruturadas. Para estas séries a faixa de frequências varrida foi suficiente para mapear todo o processo. Nas demais séries os tempos característicos do processo são muito curtos e inacessíveis à faixa de frequência varrida. A determinação de parâmetros precisos que descrevam o processo fica, portanto, comprometida.
- (iii) O processo lento, associado à difusão iônica no interior do polímero ficou bem determinado nas séries A, C e E, que se referem a amostras compactas e finas. A série B, de filmes compactos espessos, apresentou um comportamento mais complexo, que não pode ser descrito por uma combinação em paralelo simples de resistor e CPE.
- (iv) Em cada série, a título de simples referência, valores de resistência $Z_{patamar}$, para um valor fixo de frequência situado na região de patamar foram extraídos dos gráficos da primeira coluna (gráficos à esquerda).
- (v) Quando viável, valores de frequência característica de cada processo foram determinados a partir dos gráficos da segunda coluna (gráficos à direita).

A **Erro! Fonte de referência não encontrada.** compila todos os arâmetros experimentais extraídos das figuras anteriores. Os valores de capacitância não estão representados em função da área do eletrodo, pois foram encontradas certas dificuldades em relacionar a área dos eletrodos compactos com os nanoestruturados, devido sua porosidade.

série	amostra	PROCESSO LENTO			PROCESSO RÁPIDO			
		f_{carac} (Hz)	n_2 ($\pm 0,003$)	C_1 (μF)	Z_2 (Ω)	f_{carac} (kHz)	n_1 ($\pm 0,003$)	C_2 (μF)
A $C_1 @ 100$ Hz $Z_2 @ 1$ kHz	1,0 V	~ 0,23	0,905	4,617	175	19,40	-	-
	1,4 V	-	-	4,462	116	37,23	-	-
	1,6 V	-	-	4,411	93	55,02	-	-
	1,8 V	-	-	4,633	82	~98,48	-	-
B $C_1 @ 100$ Hz $Z_2 @ 1$ kHz	5 mC	-	no CPE	4,024	400	10,95	-	-
	10 mC	-	no CPE	4,231	155	31,16	-	-
	15 mC	-	no CPE	4,851	125	33,39	-	-
	20 mC	-	no CPE	5,154	117	42,77	-	-
	25 mC	-	no CPE	6,384	105	43,89	-	-
	30 mC	-	no CPE	6,691	98	32,61	-	-
C $C_1 @ 100$ Hz $Z_2 @ 1$ kHz	1 mC	<7	0,846	3,729	534	2,73	0,841	
	3 mC	<1	0,893	3,686	502	4,96		
	5 mC	<0,3	0,901	4,313	332	9,15		
	7 mC		0,924	4,474	159	25,8		
	9 mC		0,910	4,963	93	49,0		
D $C_1 @ 100$ Hz $Z_2 @ 1$ kHz $C_2 @ 10$ kHz	1 mC		0,873	12,79	10072	0,070	0,885	0,164
	3 mC		0,874	12,12	4103	0,193	0,938	0,184
	5 mC		0,891	23,35	1732	0,981	0,545	0,144
	7 mC		0,861	14,56	8924	0,139	0,935	0,120
E $Z_2 @ 100$ Hz	1 mC		0,616		5300	0,651	0,865	
	5 mC		0,880		1949	2,308	0,885	
	9 mC		0,878		1103	4,841	0,836	
F $Z_2 @ 10$ Hz	1 mC		0,712		67016	0,024	0,839	
	5 mC		0,795		20289	0,108	0,874	
	9 mC		0,769		6850	0,430	0,903	
G $Z_2 @ 10$ Hz	sem NP		0,880		9463	0,173	0,701	
	com NP		0,807		41627	0,019	0,762	

Série A: compacto; 5 mC; var. V_{pol} ; **Série B:** compacto; $V_{pol}=1,8$ V ;
Série C: compacto; $V_{pol}=1,8$ V ; **Série D:** nano; $V_{pol}=1,8$ V ;
Série E: compacto; sem NP ; **Série F:** compacto; com NP ;
Série G: nano; 1mC.

Tabela 6: Compilação dos parâmetros experimentais extraídos da Figura 71.

Como principais conclusões observa-se que:

- (i) O processo de transferência eletrônica que ocorre na interface externa do polímero é muito suscetível às condições de preparação, visto que filmes de mesma espessura, medidos em condições semelhantes (comparar, por exemplo, série A-1,8V e B-5mC), podem apresentar variações de Z_{patamar} de uma ordem de grandeza.
- (ii) Por outro lado, existe uma correlação direta entre Z_{patamar} e frequência, conforme mostrado na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** A razão K entre o logaritmo das duas grandezas varia ligeiramente em função do eletrólito utilizado nas medidas, conforme indicado pelas linhas tracejadas no gráfico. Essa correlação evidencia que em todos os casos está-se observando o mesmo fenômeno, qual seja, a transferência eletrônica entre a camada externa do PPy e o eletrólito.
- (iii) O (suposto) aumento da rugosidade propiciado, ou pela eletropolimerização em potenciais mais altos, ou pelo aumento da espessura do depósito gera um aumento modesto da impedância da interface externa de até 4 vezes.
- (iv) Por outro lado, a mesoestruturação propiciada pela litografia de nanoesferas afeta de maneira muito mais significativa a impedância da interface (até 12 vezes). A suposição que tal fenômeno se deva à baixa rugosidade do Ppy nanoestruturado precisa ser verificada.
- (v) O filme nanoestruturado até o equador da série D apresenta, na região intermediária de frequência (entre 15 e 50 Hz) um processo difusivo, a julgar pelo baixo valor de $n = 0,545$ obtido nessa faixa.
- (vi) O filme mais fino, de 1 mC, da série C também apresenta um comportamento distinto dos demais de sua série. Vê-se no gráfico da parte imaginária da impedância que a curva mostra uma inflexão para cima, que sugere que neste caso o sistema se comporta como um resistor em série com um elemento capacitivo.
- (vii) O mesmo ocorre para os filmes da série A.

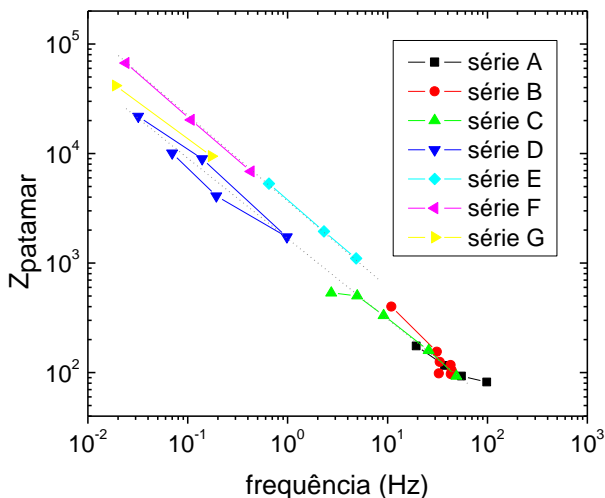


Figura 83: Correlação entre patamar de impedância e frequência.

A fim de se explicitar o comportamento da capacitância, as figuras a seguir trazem os gráficos da capacitância efetiva em função da frequência para todas as séries investigadas. Nesses gráficos, a região de alta frequência referente a um determinado processo reativo é representado pela presença de um patamar que indica o valor efetivo da capacitância efetiva referente a esse processo. A partir das figuras a seguir verifica-se que:

- (i) Para os filmes poliméricos compactos das séries A, B e C observa-se somente um patamar de capacitância, localizado na faixa de 100 Hz, que corresponde à capacitância efetiva do processo lento, relacionado à difusão do eletrólito nos poros do polímero.
- (ii) Para os filmes nanoestruturados da série D observam-se dois patamares de capacitância: um em torno de 10 kHz, que se refere ao processo rápido que ocorre na interface externa da estrutura, e outro localizado em torno de 1 Hz, que se refere ao processo que ocorre no interior do polímero.

(iii) Para as demais séries observam-se duas regiões de menor inclinação, embora não possam ser tomadas como patamares de capacitância, pois variam de forma não desprezível.

Os valores de capacitância registrados nos patamares citados das séries A, B, C e D também estão compilados na **Erro! Fonte de eferência não encontrada..**

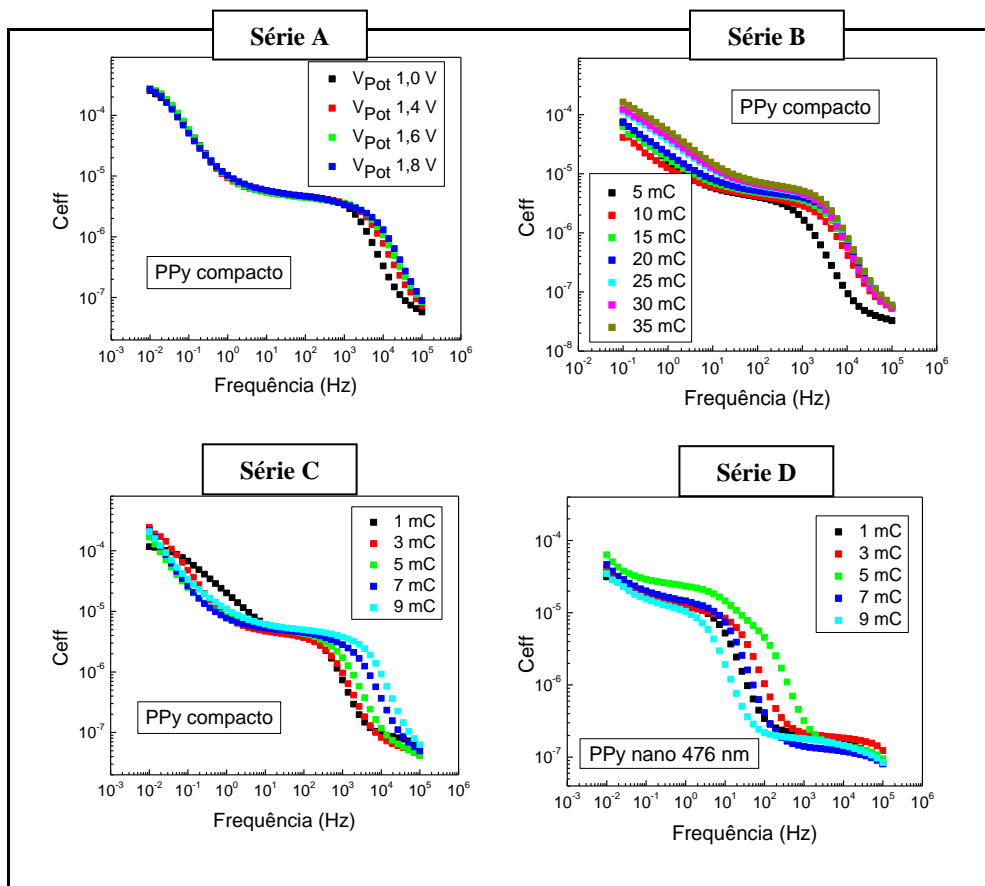


Figura 84: Gráficos da capacitância efetiva em função da frequência.

Série A: Filmes compactos de mesma espessura eletropolimerizados em 1,8 V.

Série B: Filmes compactos de diferentes espessuras eletropolimerizados em 1,8 V.

Série C: Filmes compactos de espessuras menores eletropolimerizados em 1,8 V.

Série D: Filmes nanoestruturados de diferentes espessuras eletropolimerizados em 1,8V.

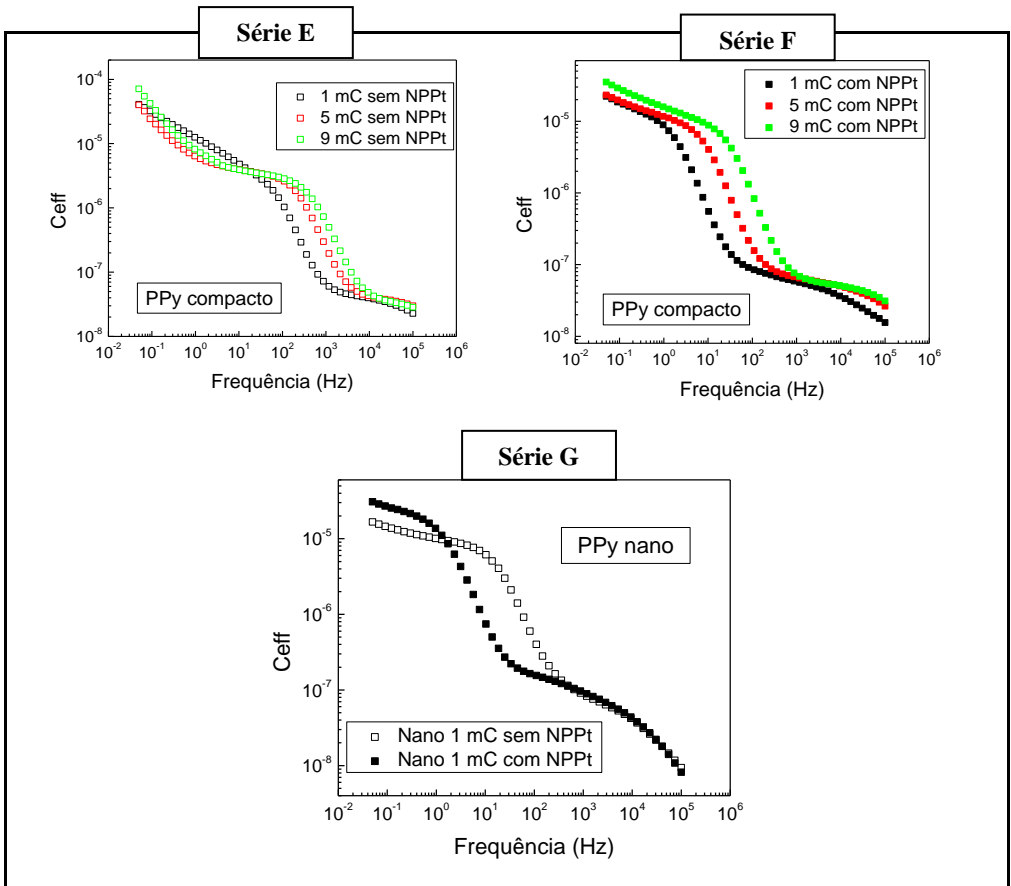


Figura 85: Gráficos da capacitância efetiva em função da frequência.

Série E: Filmes compactos de diferentes espessuras, eletropolimerizados em 1,8 V, sem NPpT.

Série F: Filmes compactos de diferentes espessuras, eletropolimerizados em 1,8 V, com NPpT.

Série E: Filmes nanoestruturados com mesma carga eletropolimerizada em 1,8

4.4.1 Determinação dos parâmetros de circuito equivalente

Finalmente, mostramos, nas figuras a seguir, a representação da impedância no plano complexo (Diagrama de Argand), que é a forma mais disseminada na literatura. Esta representação foi utilizada para se obter valores ajustados para os parâmetros de resistência e capacitância dos dois processos reativos observados nas séries investigadas.

Série A

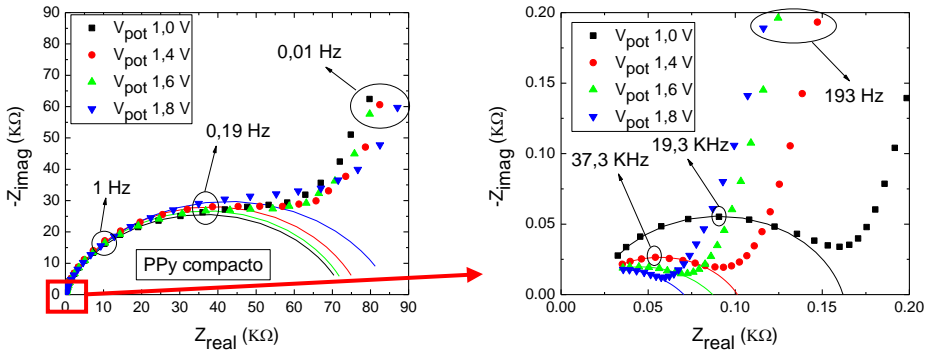


Figura 86: Série A: Filmes de PPy compacto de mesma espessura ($Q = 5 \text{ mC}$) eletropolimerizados em diferentes potenciais (V_{pot}).

Série B

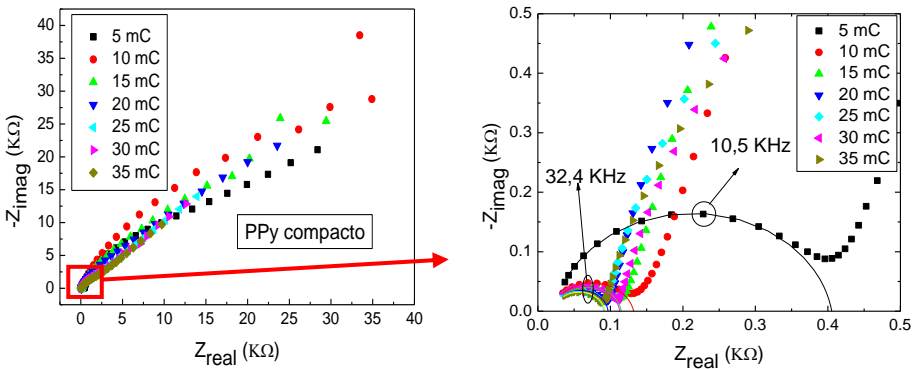


Figura 87: Série B: Filmes de PPy compacto com diferentes espessuras eletropolimerizados em potencial 1,8 V.

Série C

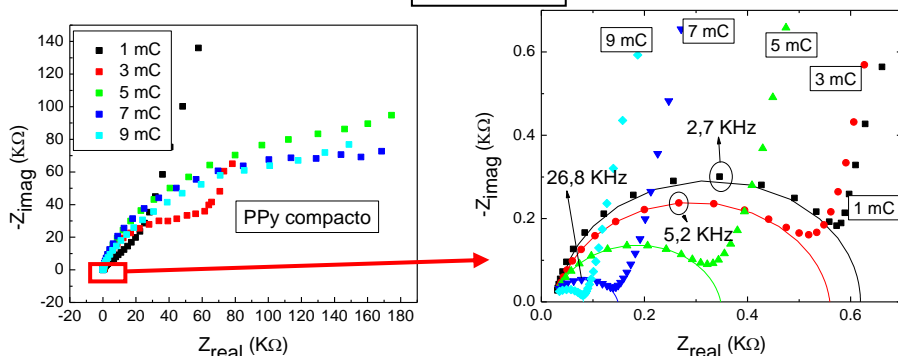


Figura 88: Série C: Filmes de PPy compacto com diferentes espessuras eletropolimerizados em potencial 1,8 V. Espessuras menores.

Série D

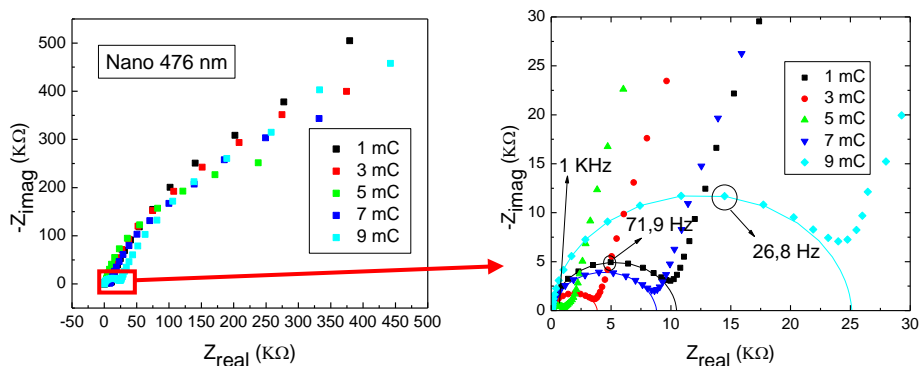


Figura 89: Série D: Filmes de PPy nanoestruturados com diferentes espessuras eletropolimerizados em potencial 1,8 V.

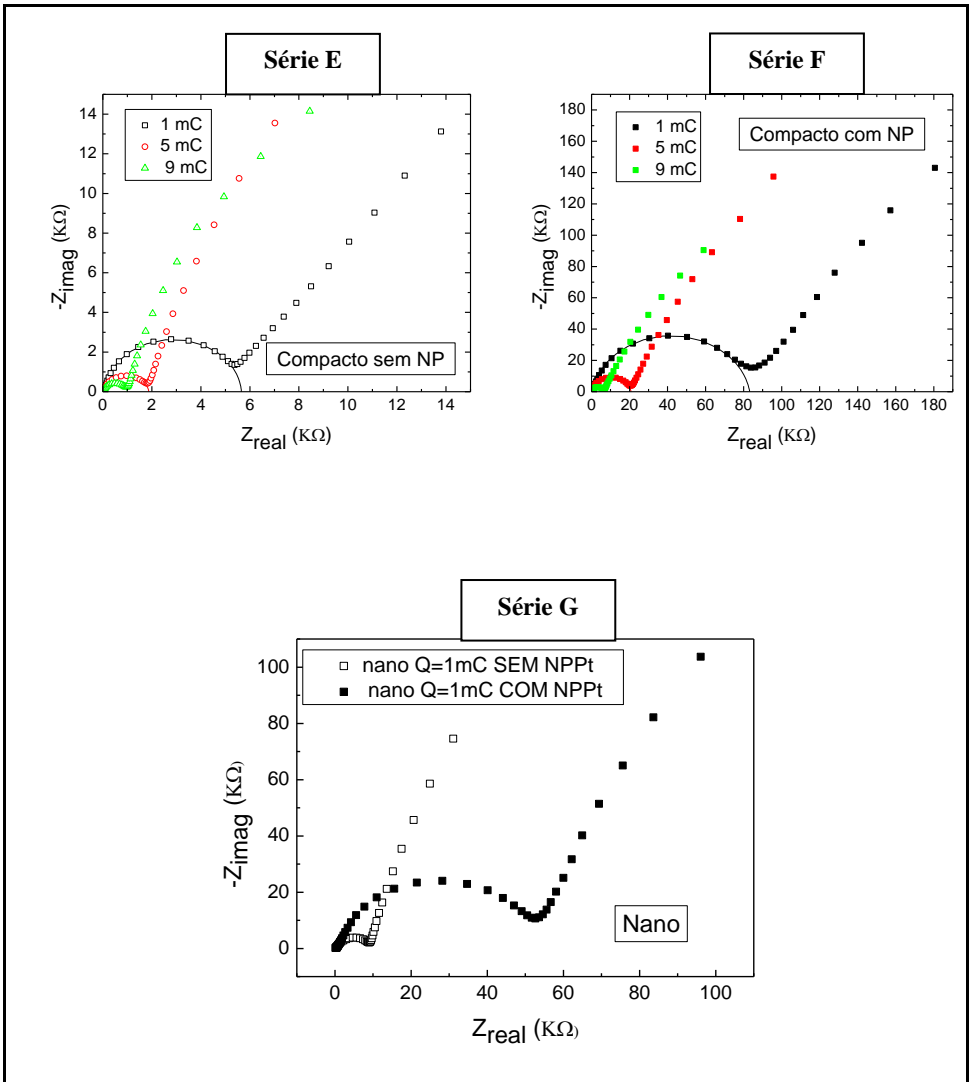


Figura 90: Panorama com os conjuntos de medidas de filmes compactos e nanoestruturados, com e sem nanopartículas.

Para todas as séries realizou-se uma estimativa dos parâmetros de circuito equivalente para cada processo em separado. As estimativas se baseiam em um circuito reativo simples com CPE e têm valor qualitativo. Os valores dos parâmetros obtidos a partir das estimativas serão mostrados no Apêndice.

Para as séries C e D realizou-se também um ajuste mais elaborado, baseado em circuitos equivalentes específicos, que serão descritos adiante, com o intuito de descrever simultaneamente os processos observados em todas as faixas de frequência.

Tanto as estimativas como os ajustes foram realizados com aplicativos do próprio equipamento (FRA-Autolab) e outros (LEVM) (REREFÊNCIA). Nas figuras que se seguem, as linhas sólidas representam as curvas teóricas derivadas das estimativas e ajustes.

Série A: Influência da voltagem de eletropolimerização em filmes compactos com 5 mC de carga nominal.

Na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** (série A) nota-se a resença de dois semicírculos achatados, relacionados aos dois processos reativos acima mencionados. Vê-se que o processo em baixas frequências (semicírculo maior) culmina com uma curva característica de um processo limitado por difusão, que pode ser atribuído à difusão dos íons do eletrólito no interior dos poros do Ppy. Na faixa de altas frequências o raio dos semicírculos diminui sensivelmente com o aumento do potencial de eletropolimerização, indicando que a resistência desse processo de transferência de carga diminui com a voltagem.

Série B: influência da espessura em filmes compactos com carga nominal variando entre 5 e 35 mC, eletropolimerizados em 1,8 V/SCE.

Observa-se que o diâmetro dos semicírculos que descrevem o processo reativo rápido diminui gradativamente com a espessura do filme até atingir um valor estacionário para filmes com carga de eletropolimerização igual ou superior a 15 mC. O diâmetro dos semicírculos indica a resistência de transferência de carga do processo, que neste caso, foi associado à interface externa do polímero com o eletrólito.

Série C vs. Série D: Influência da nanoestruturação – Comparação entre filmes compactos e nanoestruturados de espessura equivalente.

A Erro! Fonte de referência não encontrada. e Erro! Fonte de referência não encontrada. (Séries C e D) trazem o resultado mais inesperado das medidas de impedância: para filmes de espessura equivalente, esperava-se que o processo de nanoestruturação, ao aumentar a área específica da nanoestrutura, reduzisse a resistência de interface. No entanto, observa-se que a diminuição da resistência com o aumento da área dos alvéolos não é monotônica, mas atinge um mínimo quando os mesmos atingem a altura $h=R$. A partir daí, a resistência da interface volta a aumentar, ultrapassando inclusive os valores iniciais. Os filmes compactos, por outro lado, mostram uma queda monotônica da resistência com a espessura do filme, como esperado, que é atribuído ao aumento da rugosidade interfacial.

Série E vs. Série F: Influência da adição de nanopartículas – Comparação entre filmes compactos de espessura equivalente

Para as duas séries observa-se, mais uma vez, que a resistência da interface diminui com a espessura. A adição das nanopartículas de Pt funcionalizadas com PAMAM aumenta em cerca de 10 vezes a resistência da interface. O processo reativo que ocorre em baixas frequências e que foi associado ao volume do polímero, fica assemelhado a uma resistência de Warburg, que caracteriza um processo reativo limitado por difusão.

Série G: Influência da adição de nanopartículas de Pt em filmes nanoestruturados a partir de esferas de 476 nm de diâmetro (1 mC).

De maneira análoga ao que foi observado nas séries E e F, observa-se o aumento da resistência de transferência de carga com a adição das nanopartículas de Pt.

4.4.2 Análise detalhada das relações de impedância para três séries distintas

Com o intuito de obter uma maior compreensão dos processos envolvidos nas diferentes estruturas, foram compilados e analisados detalhadamente os dados extraídos para três séries de medidas de impedância distintas:

- Nanoestruturada (1 mC, 3 mC, 5 mC, 7 mC e 9 mC);
- Compacta fina (1 mC, 3 mC, 5 mC, 7 mC e 9 mC);
- Compacta grossa (5 mC, 10 mC, 15 mC, 20 mC, 25 mC, 30 mC e 35 mC).

A partir dessas séries foram construídos gráficos que relacionam o aumento da resistência com a geometria (carga eletropolimerizada) da estrutura (Figura 91), sendo que esses valores de resistência (resistência do eletrólito mais “resistência iônica”, que será abordada com maiores detalhes adiante) foram obtidos para o processo que ocorre em maiores frequências (processo rápido).

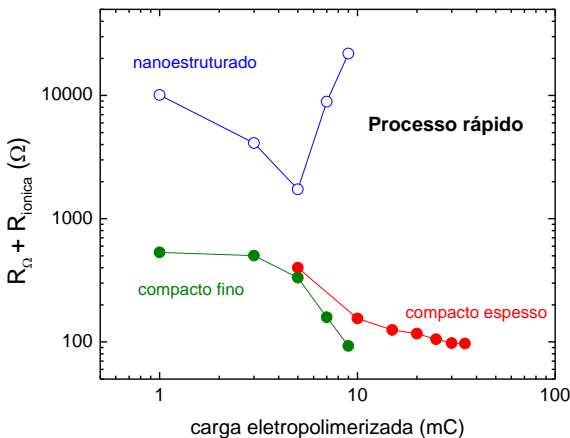


Figura 91: Dados de três séries distintas que relacionam valores de resistência com a carga eletropolimerizada (processo rápido).

No gráfico acima é possível observar que, para ambos os filmes compactos (fino e grosso), há uma diminuição da resistência com o aumento da espessura dos filmes (carga eletropolimerizada). Esse resultado está de acordo com o esperado, já que com o aumento da espessura ocorre também um aumento da rugosidade do filme (Figura 55).

O aumento na rugosidade gera um aumento na área superficial dos filmes, que está relacionado com a resistência através da seguinte expressão:

$$R = \rho \frac{l}{A} \quad (18)$$

Nota-se que a partir de determinados valores de espessura a resistência tende a um valor constante, fato que também está de acordo com o esperado, já que, como observado anteriormente, a rugosidade dos filmes atinge um valor limite a partir de determinadas espessuras, cessando, por conseguinte, o aumento da área superficial do eletrodo e a diminuição da resistência.

Para os filmes nanoestruturados o comportamento é distinto àquele observado nos filmes compactos. Nesse caso, observa-se uma queda da resistência do filme à medida que a espessura aumenta (1 mC e 3 mC), atingindo um ponto de mínimo (5 mC) quando ao crescimento da estrutura ocorre até o equador das esferas, e voltando a aumentar quando a estrutura cresce acima do equador das esferas (7 mC e 9 mC).

A diminuição da resistência, nesse caso, está relacionada com o aumento da área eletroativa efetiva da estrutura até seu maior valor (crescimento até o equador das esferas com carga de 5 mC). A resistência volta a crescer quando a área eletroativa efetiva da estrutura diminui (Figura 75). Esses resultados também podem ser explicados em termos da expressão acima, que relaciona a área superficial com a resistência.

Para as mesmas séries também foram construídos gráficos relacionando os valores de capacitância com a geometria (carga eletropolimerizada) da estrutura (Figura 92). Essas informações foram encontradas para frequências relativamente menores que àquelas analisadas para a resistência em função da geometria (processo lento).

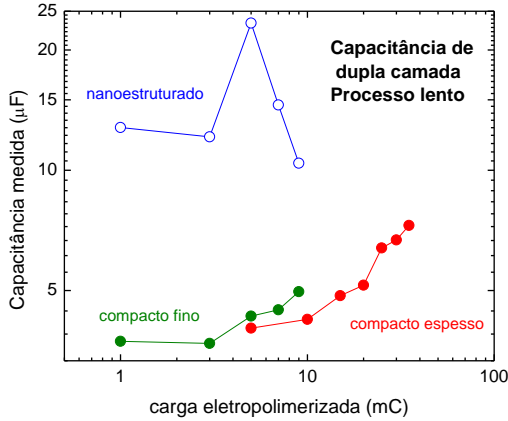


Figura 92: Dados de três séries distintas que relacionam valores de capacitância com a carga eletropolimerizada (processo lento).

Analisando o gráfico acima, é possível observar que para os filmes compactos (fino e grosso) há um aumento dos valores de capacitância à medida que o filme fica mais espesso.

Esse resultado está de acordo com o esperado, já que o aumento da espessura está relacionado com o aumento da rugosidade e, conseqüentemente, da área. De acordo com a equação abaixo, a capacitância geométrica deve aumentar com o aumento da área superficial do filme.

$$C = \epsilon \frac{A}{d} \quad (19)$$

Para os filmes nanoestruturados ocorre um aumento gradual da capacitância geométrica (1 mC e 3 mC) até um ponto de máximo de capacitância (5 mC), onde o crescimento ocorreu até o equador das esferas, voltando a cair quando o crescimento ocorre acima do equador das esferas (7 mC e 9 mC).

Esse resultado também pode ser explicado em termos da equação acima e da área eletroativa efetiva da estrutura.

A partir dessas análises e da tendência das curvas para as diferentes estruturas conclui-se, portanto, que devem existir dois processos, um rápido (maiores frequências) e outro lento (menores frequências) que devem de alguma forma estar correlacionados.

Em vista disso, a correlação entre os dois processos deve ocorrer através da seguinte associação:

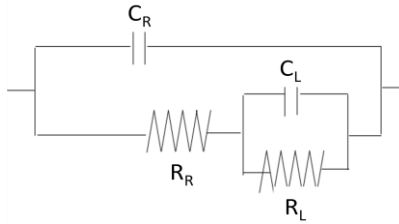


Figura 93: Circuito equivalente que correlaciona os processos rápido e lento.

onde R_R e C_R representam, respectivamente, a resistência e a capacitância do processo rápido (maiores frequências). R_L e C_L são, respectivamente, a resistência e a capacitância do processo lento (menores frequências), sendo R_R e C_L representados em ambos os gráficos discutidos anteriormente (Figura 91 e Figura 92).

Considerando um circuito reativo simples para o processo rápido (Figura 94), podemos então calcular, a partir da equação abaixo (conhecendo-se os valores de R_R e f), a capacitância relacionada a esse processo (processo rápido).

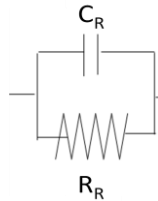


Figura 94: Circuito reativo simples que representa o processo rápido.

$$f = \frac{1}{2\pi RC} \quad (20)$$

Calculando os valores de capacitância para todas as três séries discutidas anteriormente (nanoestruturada, compacta fina, compacta grossa), é possível obter um gráfico relacionando a capacitância calculada do processo rápido com a geometria das estruturas (Figura 95).

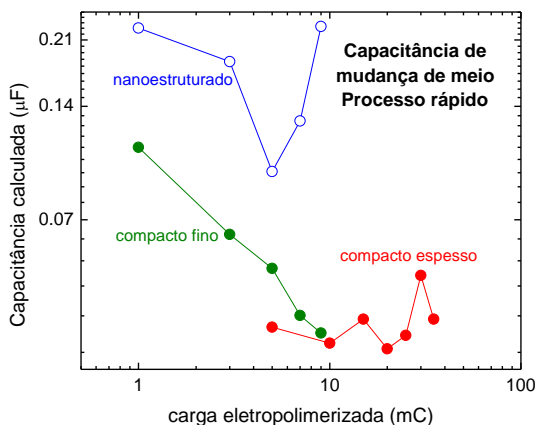


Figura 95: Dados de três séries distintas que relacionam valores de capacitância com a carga eletropolimerizada (processo rápido).

Ao analisar e comparar o gráfico acima (Figura 95) com o gráfico da capacitância do processo lento anterior (Figura 92), imediatamente identifica-se que os comportamentos das séries são sensivelmente distintos entre si.

Para a série nanoestruturada, no processo rápido (contrariamente ao resultado obtido para o processo lento), os valores de capacitância diminuem (1 mC e 3 mC) até um valor mínimo (5 mC) para estruturas com crescimento até o equador das esferas, voltando a aumentar para crescimentos acima do equador das esferas (7 mC e 9mC).

Outra questão intrigante consiste no fato de que os valores de capacitância para o processo rápido são muito baixos quando comparados com os valores do processo lento.

Capacitâncias desse tipo (da ordem de dezenas de nF) não devem estar associadas a formação de dupla camada elétrica (com capacitâncias típicas da ordem de μF), mas sim com algum outro fenômeno presente no sistema.

Para melhor compreender os sistemas discutidos anteriormente e explicar a existência de dois processos (um rápido e outro lento), ambos com contribuições resistivas e capacitivas, foram propostos dois modelos que descrevem as diferentes interfaces para filmes nanoestruturados e compactos, assim como um circuito equivalente relacionando parâmetros eletroquímicos com parâmetros elétricos e que serão discutidos detalhadamente a seguir.

4.4.3 Modelo de três fases para dois sistemas distintos

A seguir será discutida uma proposta de modelo para um sistema macroporoso (filmes nanoestruturados) e outra para um sistema microporoso (filmes compactos), assim como circuitos equivalentes que descrevem os parâmetros observados.

4.4.3.1 Modelo de circuito equivalente para sistema mesoporoso

Para a descrição da impedância dos filmes nanoestruturados de PPy houve a necessidade de adotar um circuito elétrico equivalente que justificasse a evidente mudança na geometria dos eletrodos. A macroporosidade da interface propicia diferentes caminhos de difusão para o íon, assim como diferentes concentrações de campo elétrico nas proximidades da interface (116) (117).

O circuito proposto relaciona dois processos sucessivos, um rápido (associado a valores de alta frequência) e outro lento (que ocorre em valores de baixas frequências), como já foi discutido anteriormente. Dessa forma, o circuito equivalente deve conter uma ramificação em um dos braços, caracterizando o caráter sucessivo dos processos e é representado pela Figura 96 abaixo.

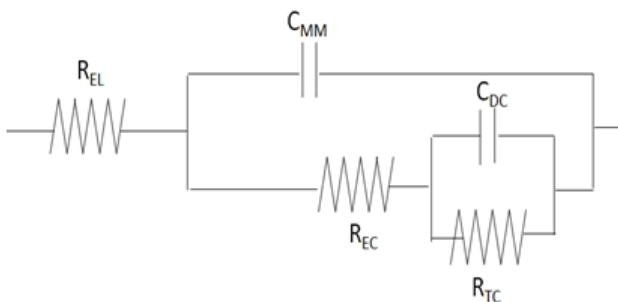


Figura 96: Circuito elétrico equivalente com distintos caminhos para filmes de PPy nanoestruturados.

A analogia entre os componentes do circuito equivalente acima e o sistema eletroquímico em questão está representado na Figura 97 abaixo.

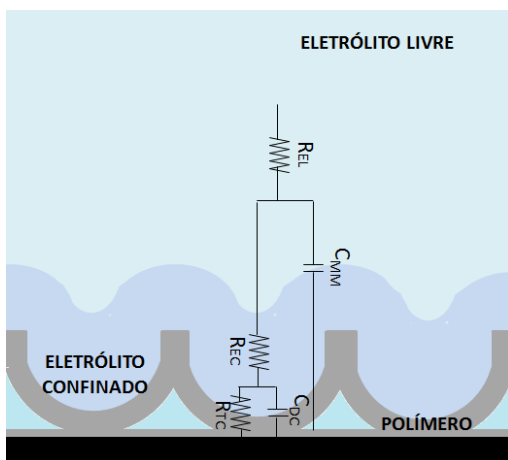


Figura 97: Interface eletrólito/polímero para o sistema nanoestruturado.

A resistência R_{EL} está associada à resistência ôhmica do eletrólito para regiões distantes da interface. À medida que o íon alcança regiões nas proximidades da interface eletrólito/polímero começa a sentir outra resistência, devido a uma nova distribuição das linhas de campo elétrico na interface eletrólito/polímero que surge a partir da simetria do filme nanoestruturado.

A Figura 98 e a Figura 99 ilustram simulações para diferentes distribuições das linhas de concentração e de campo num sistema análogo, construído a partir de um material condutor para diferentes geometrias (116) (117).

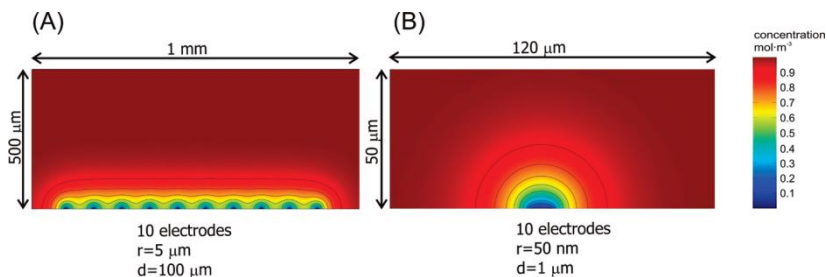


Figura 98: Simulação de distribuições das linhas de concentração para condutores com diferentes geometrias (116).

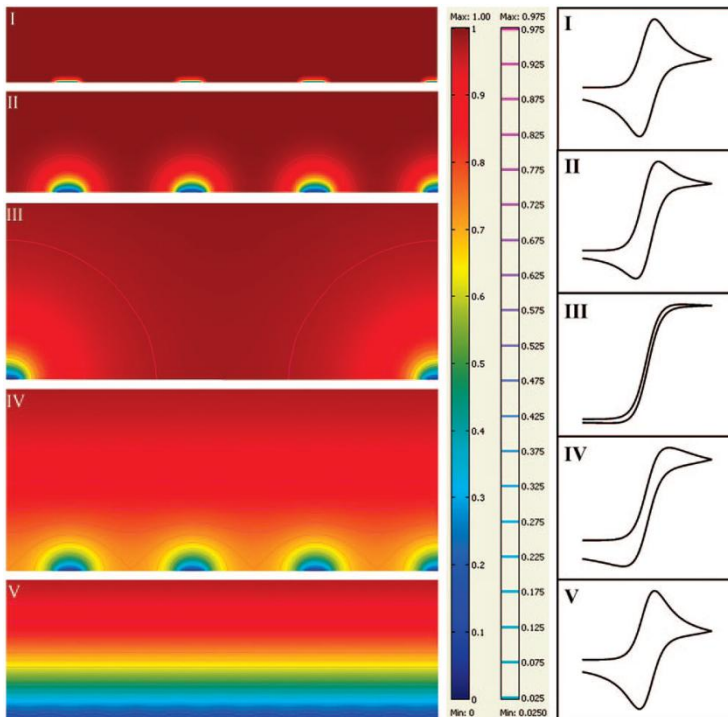


Figura 99: Simulação de distribuições das linhas de campo para condutores com diferentes geometrias (117).

A nova resistência, associada ao eletrólito confinado, é representada por R_{EC} , e surge nas proximidades da interface polímero/eletrólito. Junto com R_{EC} surge uma componente capacitiva, associada a um atraso que o íon sofre ao atravessar uma região de maior ou menor concentração de linhas de campo elétrico. Essa componente capacitiva é chamada de capacitância de mudança de meio e representada por C_{MM} . Ambos os processos acontecem simultaneamente em regiões de alta frequência do espectro de impedância e estão relacionados entre si.

A seguir, quando o íon encontra efetivamente a superfície do polímero, após atravessar a região de eletrólito confinado e sofrer um atraso, ocorre a formação de uma dupla camada elétrica em toda a superfície do polímero que é representada por uma capacitância de dupla

camada C_{DC} e a transferência de carga elétrica no eletrodo, associada a uma resistência de transferência de carga e representada por R_{TC} .

A Figura 100 abaixo apresenta os ajustes dos parâmetros calculados a partir do circuito acima e as medidas experimentais. Observa-se um acordo com os dados experimentais, à exceção da amostra de 5 mC, que apresenta um comportamento de caráter difusivo, em médias frequências, que não pôde ser descrito pelo modelo. Os dados numéricos são mostrados no Apêndice.

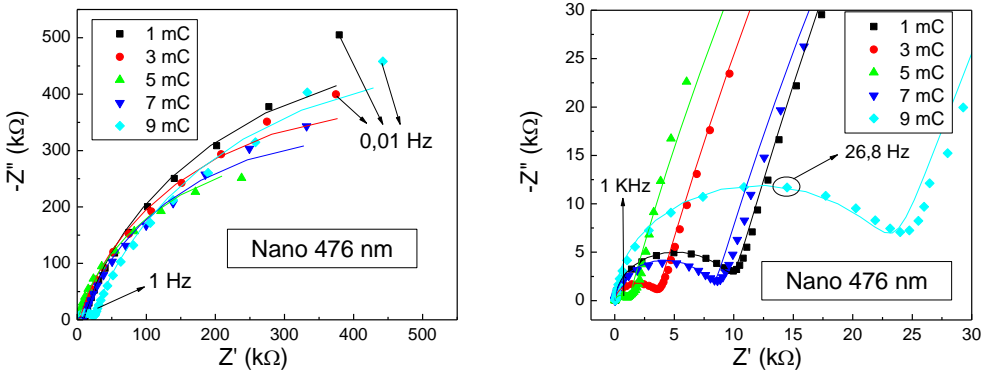


Figura 100: Medidas experimentais e parâmetros ajustados a partir do circuito elétrico equivalente proposto.

4.4.3.2 Modelo de circuito equivalente para sistema microporoso

Para a descrição completa de um sistema microporoso deve-se considerar os fenômenos de transporte iônico e eletrônico que ocorrem a partir do eletrólito, passando por cada uma das interfaces até o interior do material poroso.

As imagens a seguir (Figura 101 e Figura 102) ilustram, respectivamente, um sistema de eletrodo polimérico poroso mergulhado num eletrólito, e o respectivo circuito elétrico equivalente que descreve o mesmo.

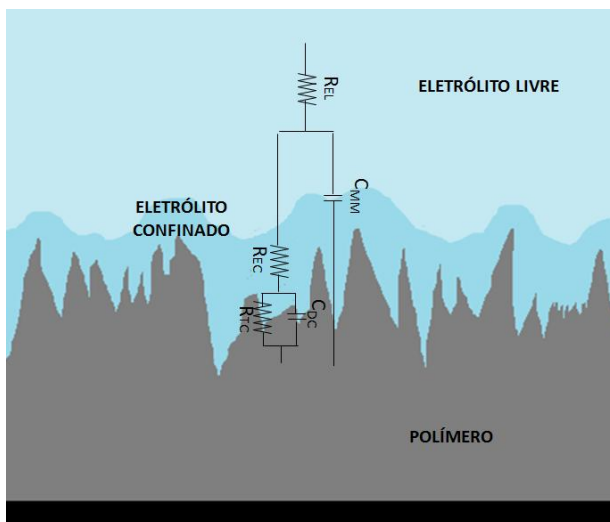


Figura 101: Interface eletrólito/polímero para o sistema poroso.

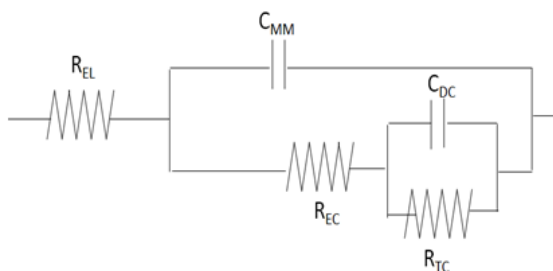


Figura 102: Circuito elétrico equivalente com distintos caminhos para filmes de PPy compactos.

Novamente é possível observar que, após cruzar a região de eletrólito livre, o íon alcança uma região chamada de eletrólito confinado, onde existe uma distribuição de linhas de campo elétrico diferente daquela encontrada na região de eletrólito livre (distribuição planar). Essa nova distribuição das linhas de campo, e consequentemente, nova concentração iônica, ocorre devido ao caráter rugoso da interface polímero/eletrólito dos filmes compactos.

Todo o sistema eletroquímico e circuito equivalente são análogos àqueles propostos para filmes nanoestruturados, entretanto, distinguindo no fato de que, para esse sistema, as dimensões são muito menores que para os nanoestruturados (rugosidade da ordem de nm).

A resistência R_{EL} está associada a uma resistência ôhmica do eletrólito numa região afastada da interface polímero/eletrólito. Quando o íon encontra a região de eletrólito confinado, surge uma resistência R_{EL} associada com uma diferença de mobilidade do eletrólito nessa região. Simultaneamente a essa resistência surge uma capacitância de mudança de meio C_{MM} associada com o atraso que o íon sofre ao entrar nessa região do eletrólito.

Após atravessar a região de eletrólito confinado (que neste caso é bem curta), o íon finalmente encontra a interface do polímero, ocorrendo uma transferência de carga R_{TC} e a formação de uma dupla camada elétrica C_{DC} como ilustrado na Figura 101 acima.

Os parâmetros do ajuste estão colocados no Apêndice. A seguir (Figura 103) observam-se os ajustes dos parâmetros calculados a partir do circuito acima e as medidas experimentais. Observa-se que obtivemos uma boa descrição dos dados experimentais, à exceção dos filmes mais finos, de 1 mC e 3 mC, que se comportam como eletrodos bloqueantes em regiões de baixa frequência.

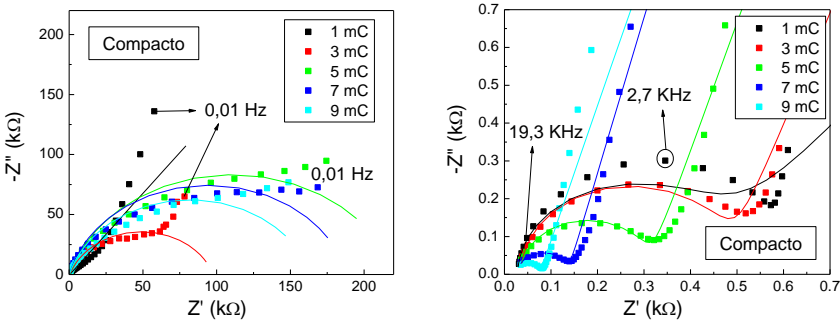


Figura 103: Medidas experimentais e parâmetros ajustados a partir do circuito elétrico equivalente proposto.

4.5 BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO NÃO ENZIMÁTICO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

4.5.1 Medidas amperométricas

As medidas amperométricas são feitas para observar as características do eletrodo como sensibilidade, linearidade, limite de detecção, tempo de resposta e estabilidade, características estas, que definem a potencialidade do eletrodo como sensor.

Todas as medidas estão relacionadas com a variação da corrente, em relação ao acréscimo do analito (peróxido de hidrogênio) na solução.

4.5.1.1 Nanopartículas de platina (NPt)

Para a realização das medidas amperométricas, faz-se necessária a utilização das nanopartículas de platina, que possuem papel fundamental na intensificação do sinal observado, por sua função catalisadora da reação em questão (redução do peróxido de hidrogênio).

Sua importância fica bem evidenciada nas medidas amperométricas realizadas para estruturas poliméricas idênticas, com e sem a utilização das nanopartículas, como pode ser observado na Figura 104.

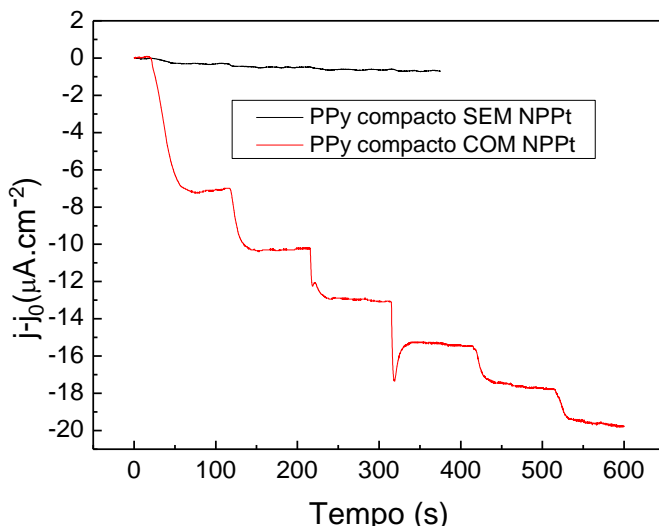


Figura 104: Cronoamperometrias realizadas com e sem a presença de NPt na estrutura polimérica, para incrementos graduais de 100 μl de H_2O_2 em 100 ml de solução aquosa de H_2SO_4 ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Do gráfico anterior é possível observar que, com a presença das nanopartículas de platina a sensibilidade do sensor é aumentada consideravelmente, o que por si só já justifica a utilização das mesmas nos eletrodos.

4.5.2 Influência da geometria

Com o intuito de encontrar o eletrodo que possui a melhor resposta amperométrica, foram testadas diversas geometrias para a estrutura polimérica, desde filmes compactos até nanoestruturados acima, abaixo e no equador das esferas de poliestireno. Outros parâmetros que foram investigados estão relacionados com a concentração de peróxido de hidrogênio utilizado, além da área polimérica eletroativa.

No gráfico da Figura 105, é possível observar as cronoamperometrias para quatro amostras distintas, sendo duas compactas e duas nanoestruturadas. As cargas depositadas nas amostras compactas são equivalentes àsquelas utilizadas na fabricação das amostras nanoestruturadas acima do equador e no equador das esferas.

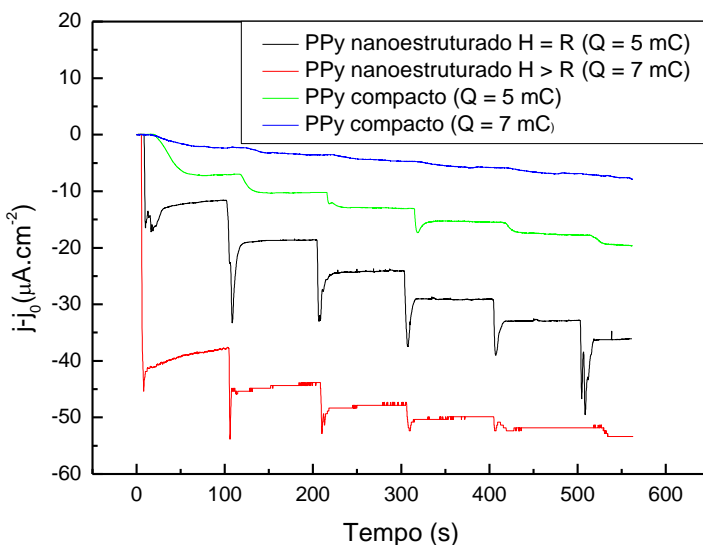


Figura 105: Respostas amperométricas de quatro estruturas poliméricas distintas.

Quanto às respostas amperométricas, observa-se que os eletrodos nanoestruturados apresentaram o melhor resultado para ambos os casos, no equador e acima (curvas preta e vermelha, respectivamente), quando comparados com os eletrodos compactos (curvas azul e verde).

Para o eletrodo nanoestruturado acima do equador, observa-se que, após a primeira injeção de peróxido de hidrogênio, a corrente aumenta consideravelmente em relação às outras. No entanto, nas sucessivas injeções, o aumento na corrente torna-se menos sensível. Esse comportamento pode estar relacionado com o fato de o eletrodo polimérico estar saturando rapidamente, devido ao acréscimo razoavelmente grande de H_2O_2 na solução (aproximadamente 29 mM). Em vista disso, essa saturação deve comprometer a sensibilidade do sensor nas detecções (adições) subsequentes.

No gráfico da Figura 106, é possível observar o comportamento do patamar de corrente, atingido após cada acréscimo de peróxido de hidrogênio (curva de calibração) realizado nas mesmas amostras citadas anteriormente (Figura 105).

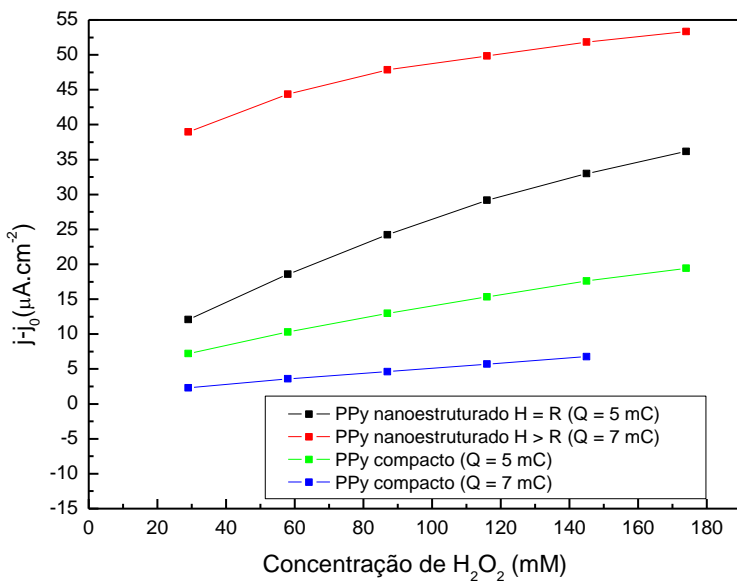


Figura 106: Curvas de calibração das amostras nanoestruturadas e compactas anteriores.

O gráfico da Figura 106 mostra que o comportamento da corrente em relação à concentração de peróxido de hidrogênio é aproximadamente linear, pelo menos a partir da primeira injeção, pois ao analisar a elevação inicial da corrente temos um comportamento diferenciado, principalmente para o eletrodo nanoestruturado acima do equador, que dá um salto maior em relação às outras estruturas (como citado anteriormente). O grande salto de corrente verificado no eletrodo nanoestruturado acima do equador sugere que esta geometria pode ter uma resposta linear em faixas menores de concentração, o que precisa ser esclarecido em trabalhos futuros.

A seguir, segue uma tabela com as principais características desses eletrodos nas regiões lineares das curvas de calibração.

Geometria	Sensibilidade ($\text{mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$)	Tempo de resposta (s)	Limites testados (mM)	Faixa de Linearidade (mM)	Limite de detecção (mM)
Nano H=R (Q = 5mC)	0,166	13	29-174	29-174	23,6
Nano H>R (Q = 7 mC)	0,095	9	29-174	29-174	46,1
Compacto (Q = 5mC)	0,084	22	29-174	29-174	15,7
Compacto (Q = 7mC)	0,038	-	29-145	29-145	6,63

Tabela 7: Características dos eletrodos compactos e nanoestruturados no equador e acima.

Com o intuito de evitar a saturação dos eletrodos e investigar os limites de sensibilidade, novas medidas amperométricas foram realizadas, com um acréscimo menor de peróxido de hidrogênio, para estruturas compactas e nanoestruturadas (no equador e pouco abaixo do equador), como pode ser observado nas micrografias a seguir (Figura 107 e Figura 108).

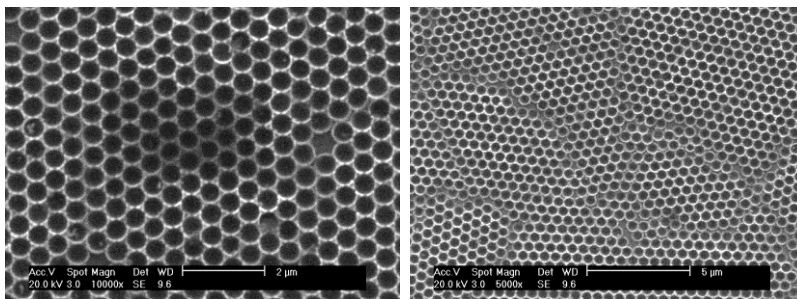


Figura 107: Imagens de MEV das estruturas de PPy com carga depositada no equador das esferas de poliestireno de 535 nm diâmetro.

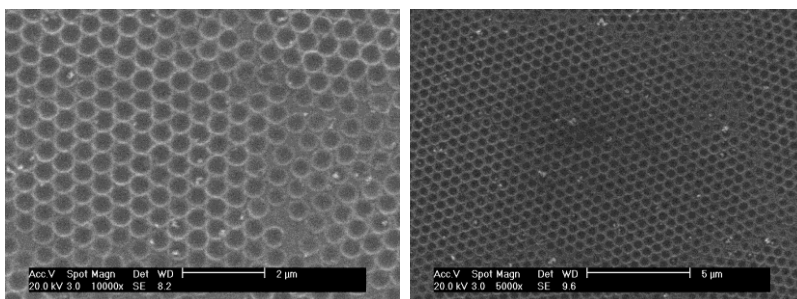


Figura 108: Imagens de MEV das estruturas de PPy com carga depositada abaixo do equador das esferas de poliestireno de 535 nm diâmetro.

As cronoamperometrias a seguir foram realizadas para quatro eletrodos distintos, dois nanoestruturados (Figura 107 e Figura 108) e dois compactos (com carga equivalente aos nanoestruturados). Nessas medidas, o acréscimo regular de peróxido de hidrogênio foi de aproximadamente 0,4 mM, redução de duas ordens de grandeza em relação às medidas anteriores. Aumentou-se também o número de acréscimos realizados, a fim de verificar a faixa de linearidade dos eletrodos.

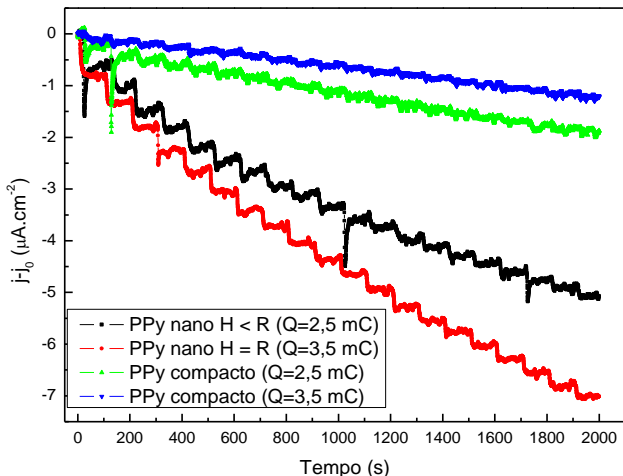


Figura 109: Respostas amperométricas de quatro estruturas poliméricas distintas, duas nanoestruturadas e duas compactas. O acréscimo de H_2O_2 é de 0,4 mM por passo.

Novamente é possível observar que, as melhores respostas amperométricas são para os eletrodos nanoestruturados. Neste caso, o eletrodo nanoestruturado no equador apresentou melhor resultado que aquele pouco abaixo do equador, fato que está relacionado com o ancoramento das nanopartículas de platina no interior das estruturas poliméricas.

Nas estruturas pouco abaixo do equador, a área interna das cavidades (área eletroativa) é menor que no equador, além do mais, a abertura dessas cavidades abaixo do equador também é maior, o que por sua vez pode facilitar o desprendimento das nanopartículas da estrutura polimérica.

A Figura 110 exhibe o comportamento da corrente em função da concentração de peróxido de hidrogênio acrescentada na solução para os casos anteriores. Observa-se que os três eletrodos apresentam comportamento linear em relação aos acréscimos de peróxido de hidrogênio. Entretanto, a sensibilidade é maior para a amostra nanoestruturada no equador.

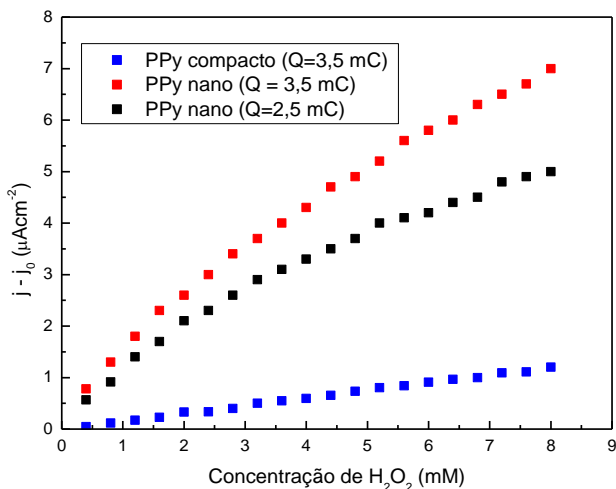


Figura 110: Comparação entre as curvas de calibração. A sensibilidade do eletrodo nanoestruturado no equador é maior que as outras (coeficiente angular da reta).

O tempo de resposta dos eletrodos nanoestruturados é menor que dos filmes compactos, e é de aproximadamente 8 segundos, tempo que pode ser considerado muito bom quando comparado com resultados encontrados na literatura que também utilizam o polímero condutor PPy como matriz polimérica (76) (74) (75).

O gráfico a seguir representa a cronoamperometria realizada para a amostra nanoestruturada no equador com carga igual a 3,5 mC. No detalhe, indica-se como o tempo de resposta do eletrodo é determinado, definido como o intervalo de tempo para a corrente sair de um valor de 5% até 95% da corrente do próximo patamar.

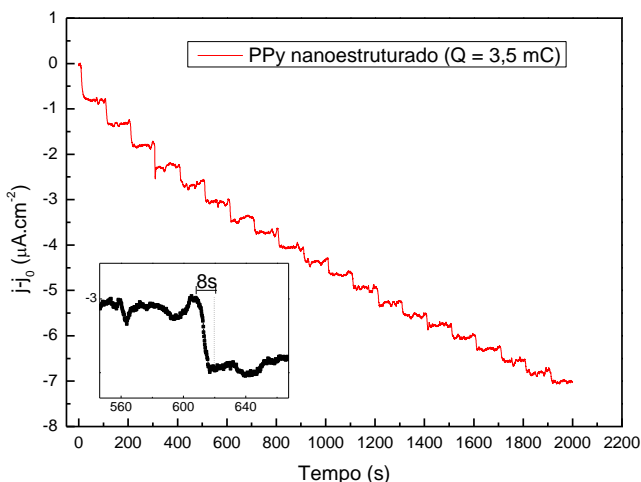


Figura 111: Cronoamperometria da amostra nanoestruturada no equador. No quadro menor dentro do gráfico, o tempo de resposta para essa mesma amostra.

A Tabela 8 ilustra as principais características desses eletrodos.

Geometria	Sensibilidade ($\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Tempo de resposta (s)	Limites testados (mM)	Faixa de Linearidade (mM)	Limite de detecção (mM)
Nano H=R ($Q = 3,5 \text{ mC}$)	0,95	8	0,4 - 8	0,4 - 5	0,39
Nano H<R ($Q = 2,5 \text{ mC}$)	0,69	8	0,4 - 8	0,4 - 5	0,63
Compacto ($Q = 3,5 \text{ mC}$)	0,15	-	0,4 - 8	0,4 - 8	0,33
Compacto ($Q = 2,5 \text{ mC}$)	-	-	0,4 - 8	-	-

Tabela 8: Características dos eletrodos compactos e nanoestruturados no equador e abaixo.

4.6 BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO ENZIMÁTICO DE TIROSINASE PARA DETECÇÃO DE CATECOL

Neste capítulo serão apresentados os resultados referentes à fabricação e caracterização do biossensor de tirosinase, onde a enzima foi imobilizada em plataformas de polipirrol compactas e nanoestruturadas. Assim como na seção de resultados do biossensor não enzimático de peróxido de hidrogênio, esta seção está organizada de modo a abordar inicialmente os resultados referentes à imobilização da enzima, culminando nas medidas amperométricas e de caracterização elétrica do biossensor.

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados basicamente três diâmetros específicos de esferas de poliestireno na fabricação das nanoestruturas poliméricas: 250 nm, 600 nm e 756 nm. Estruturas compactas de carga equivalente também foram produzidas, a fim de estabelecer uma comparação com as amostras nanoestruturadas. Os parâmetros investigados foram: diferentes espessuras para as estruturas compactas (através da variação da carga depositada), diferentes níveis de preenchimento dos interstícios das máscaras coloidais (abaixo, acima e no equador das esferas de poliestireno), diferentes diâmetros das esferas utilizadas e nível de oxidação da enzima tirosinase, a partir da fabricação do biossensor (imobilização da enzima) até o momento da medida amperométrica.

Microscopia óptica foi utilizada para acompanhar os processos de imobilização da enzima sobre as plataformas poliméricas de polipirrol. Na Figura 112 e Figura 113 abaixo, podemos acompanhar a concentração aproximada de enzimas adsorvidas na superfície do eletrodo, antes e depois do enxágue com solução tampão para utilização nas medidas amperométricas.

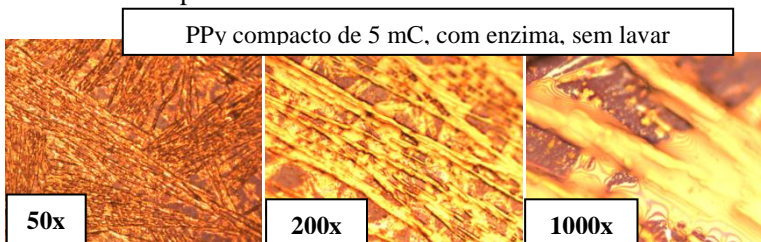


Figura 112: Imagens de microscopia óptica em diferentes magnificações de filmes de PPy compacto de 5 mC. Amostras com tirosinase antes de lavar em solução tampão.

É possível observar que há uma espécie de cristalização do material, após o processo de imobilização. Esse comportamento é observado por toda a superfície do filme, e se repete também para outras espessuras ou amostras nanoestruturadas.

Após enxaguar a amostra em solução tampão, o material excedente é removido, permanecendo na superfície do eletrodo apenas o material mais fortemente ligado. É possível observar que existe uma distribuição homogênea na superfície polimérica (Figura 113).

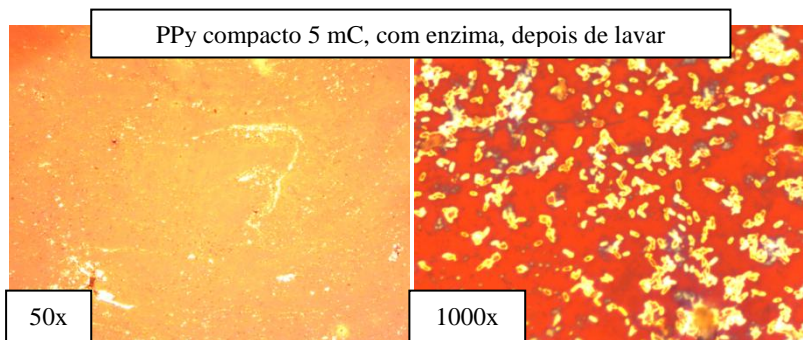


Figura 113: Imagens de microscopia óptica em diferentes magnificações de filmes de PPy compacto de 5 mC. Amostras com tirosinase depois de lavar em solução tampão.

Na Figura 114 temos imagens de microscopia eletrônica de varredura das mesmas amostras caracterizadas anteriormente por microscopia óptica. É possível observar a formação de bastonetes na superfície do eletrodo. Esta estrutura deve estar associada a algum tipo de cristalização da enzima no processo de imobilização. As regiões sem protuberâncias provavelmente estão repletas de enzima em sua forma natural, que não puderam, entretanto, ser distinguidas e reconhecidas nas micrografias.

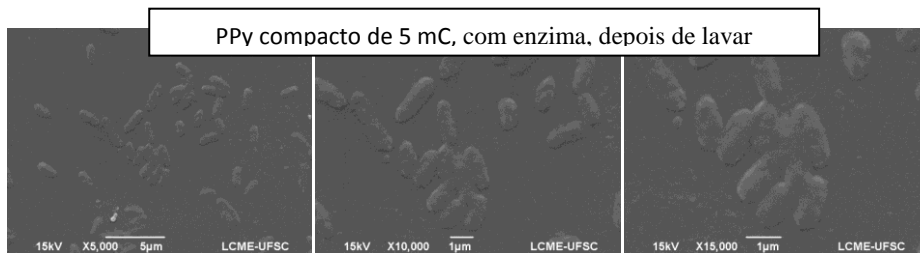


Figura 114: Micrografias de MEV em diferentes magnificações de filmes compactos de PPy com tirosinase.

A seguir, o mesmo tipo de caracterização, para filmes de polipirrol compacto com carga depositada de 10 mC.

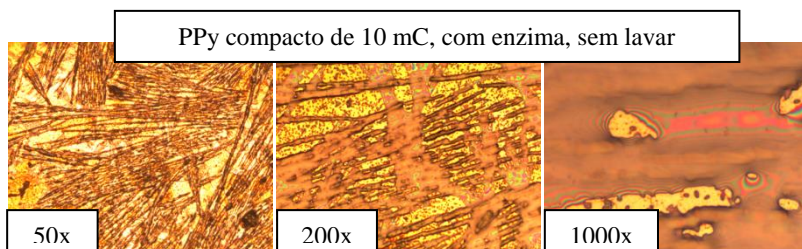


Figura 115: Imagens de microscopia óptica em diferentes magnificações de filmes de PPy compacto de 10 mC. Amostras com tirosinase antes de lavar em solução tampão.

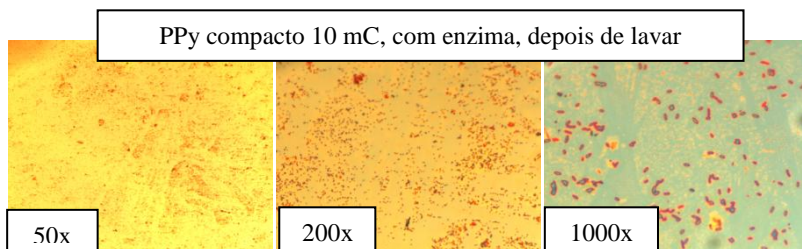


Figura 116: Imagens de microscopia óptica em diferentes magnificações de filmes de PPy compacto de 10 mC. Amostras com tirosinase depois de lavar em solução tampão.

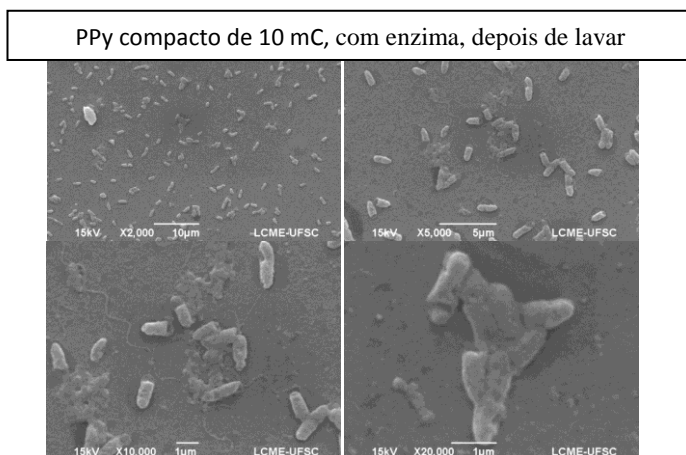


Figura 117: Micrografias de MEV em diferentes magnificações de filmes compactos de PPy com tirosinase.

Para amostras nanoestruturadas, o comportamento observado é o mesmo que para as amostras compactas. A Figura 118 ilustra uma amostra de polipirrol nanoestruturada, onde a enzima foi imobilizada e imediatamente enxaguada com solução tampão. Nessas imagens é possível observar as cavidades das nanoestruturas e um maior nível de carregamento de enzimas na superfície do eletrodo, o que ilustra, de forma preliminar uma das vantagens na utilização de nanoestruturas para a fabricação de biossensores.

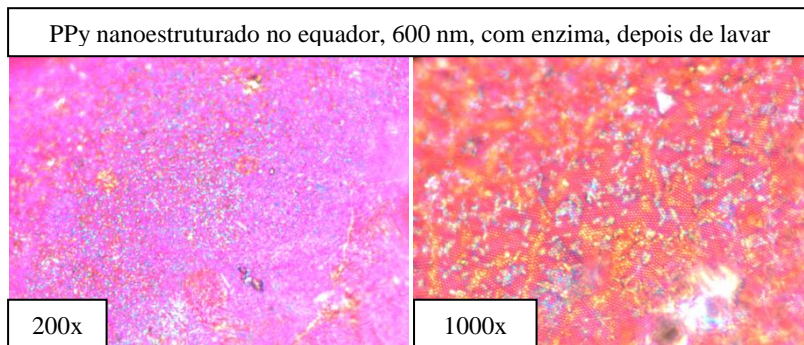


Figura 118: Imagens de microscopia óptica em diferentes magnificações de filmes de PPy nanoestruturado de 600 nm. Amostras com tirosinase depois de lavar em solução tampão.

Ao analisarmos as micrografias de MEV, para as mesmas amostras caracterizadas por microscopia óptica, percebemos que realmente há uma maior concentração de enzimas na plataforma polimérica nanoestruturada.

Assim como nas amostras de polipirrol compactas, percebemos a existência de aglomerados de enzimas pela superfície dos eletrodos. Entretanto, nesse tipo de arquitetura, podemos facilmente perceber a existência da enzima em sua forma natural, preenchendo as cavidades das esferas da estrutura polimérica, fato que não pôde ser observado nos filmes compactos.

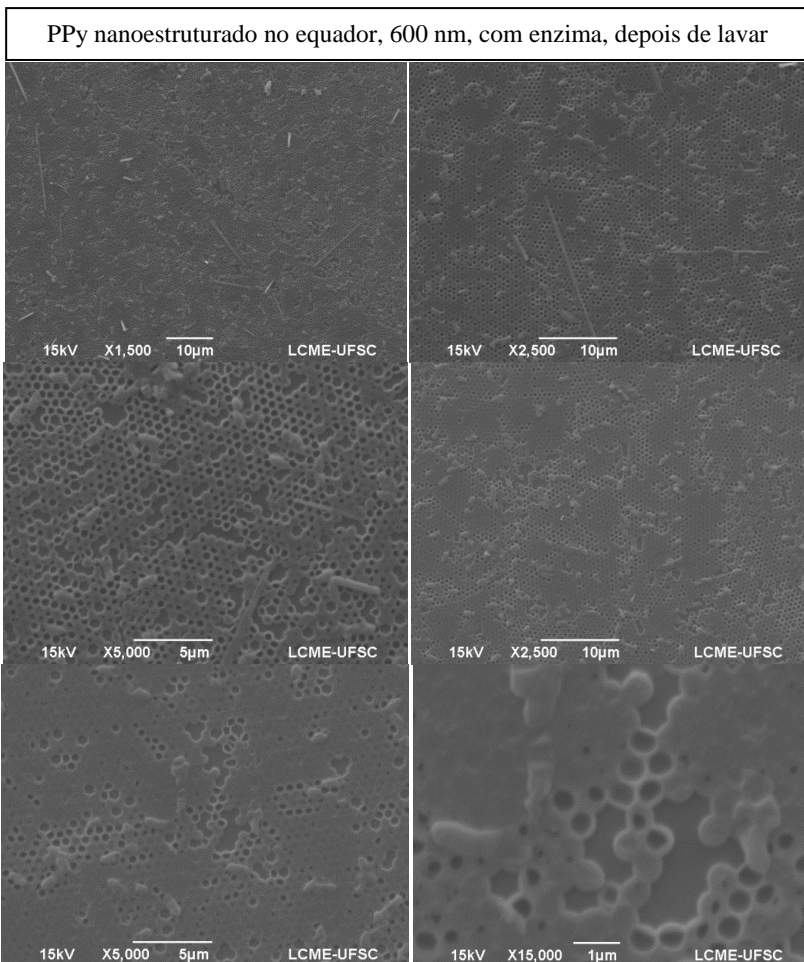


Figura 119: Micrografias de MEV em diferentes magnificações de filmes nanoestruturados de PPy com tirosinase.

4.6.1 Medidas amperométricas

Comparamos inicialmente o papel desempenhado pela enzima tirosinase na resposta da membrana pirrólica frente à adição de catecol, conforme mostrado na Figura 120. Eletrodos de polipirrol sem enzima não apresentam qualquer resposta frente à adição do analito, conforme mostrado no detalhe da Figura 120. A imobilização da enzima sobre o substrato muda completamente a resposta do eletrodo, que apresenta uma evidente variação na corrente com o respectivo acréscimo de

catecol, indicando assim o poder catalítico da mesma e sua biobompatibilidade com a membrana pirrólica.

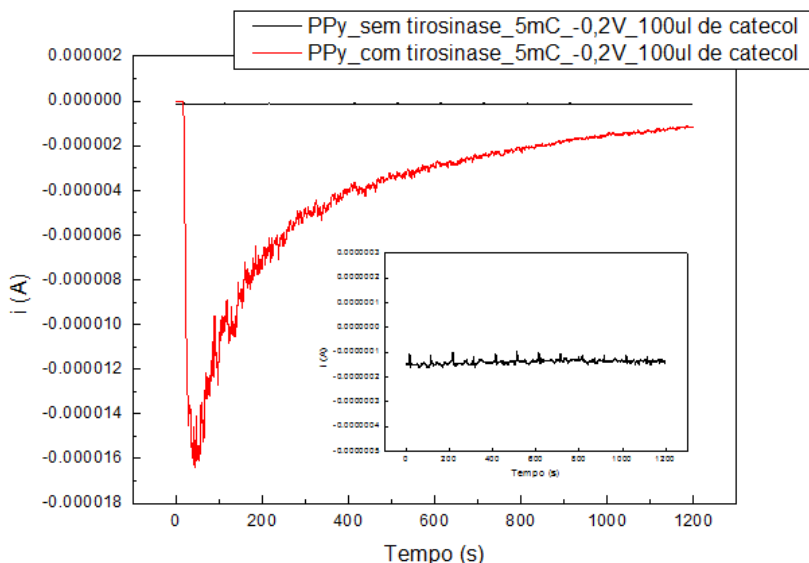


Figura 120: Cronoamperometrias de amostras de PPY compacto com e sem tirosinase.

Em seguida, foram testados diferentes valores de potencial aplicado durante a medida, a fim de otimizar a resposta do dispositivo. Observou-se que o processo bioquímico de detecção prescinde da aplicação de um potencial elétrico. Correntes são detectadas mesmo a potencial zero. Inclusive, o nível de ruído diminui sensivelmente quando $V = 0$, conforme mostra a Figura 121.

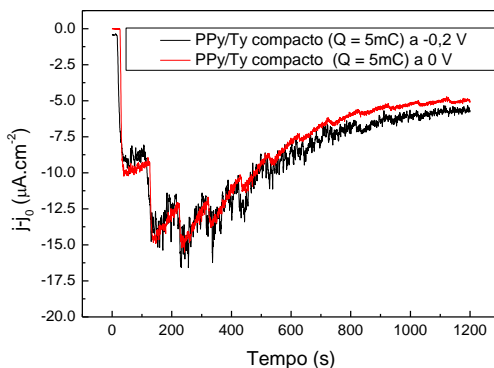


Figura 121: Cronoamperometrias em amostras de PPy/Ty compacto (ambas com $Q = 5 \text{ mC}$) e acréscimos de $20 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ de catecol em potenciais de 0 V e $-0,2 \text{ V}$.

A concentração adequada das dosagens de catecol foi outro parâmetro que precisou sofrer ajustes iniciais. Doses elevadas do mesmo levam à saturação da resposta amperométrica. O gráfico de cronoamperometria a seguir ilustra o problema.

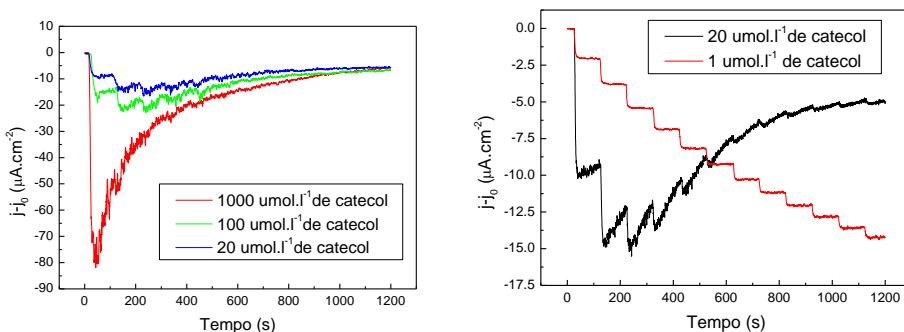


Figura 122: Cronoamperometrias de filmes compactos de PPy/Ty (5 mC) para diversas concentrações de catecol.

4.6.1.1 Geometrias poliméricas

O objetivo principal deste trabalho é determinar a influência que a geometria da plataforma nanoestruturada exerce sobre as características de sensibilidade, linearidade e limite de detecção do biossensor.

A Figura 123 exibe a resposta amperométrica de plataformas com diferentes periodicidades e níveis de preenchimento (geometria). Em todos os casos observa-se que quando $H < R$, a resposta amperométrica ao acréscimo de catecol é menor. Também para todos os diâmetros de esfera testados, a geometria de preenchimento $H > R$ foi a que resultou na melhor resposta em termos de sensibilidade e limite de detecção, conforme mostrado na Tabela 9.

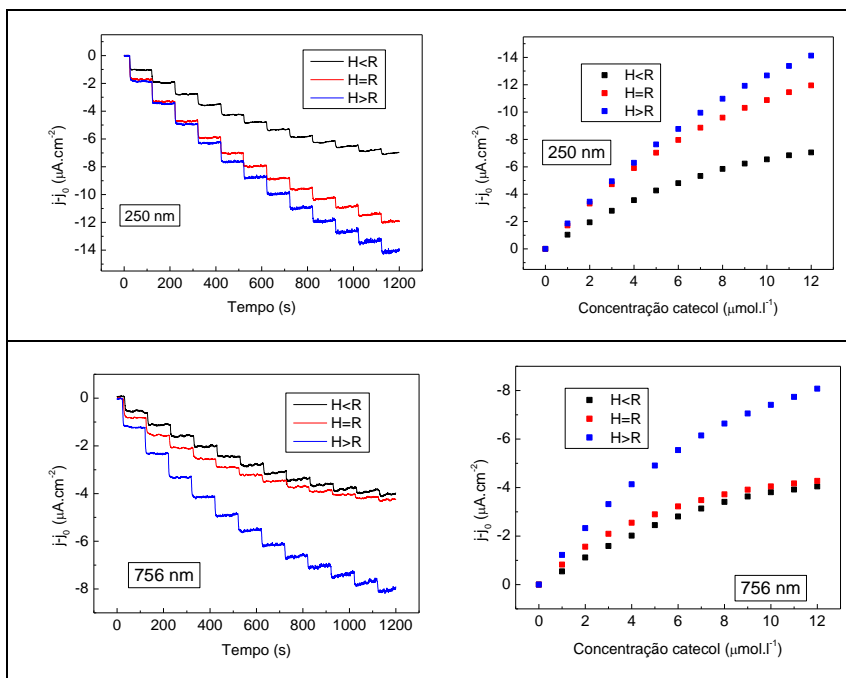


Figura 123: Cronoamperometrias e curvas de calibração de filmes nanoestruturados de PPy de 250 nm e 756 nm para diversos níveis de preenchimento. Acréscimos sucessivos de $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de catecol.

Geometria	2R (nm)	Sensibilidade ($\text{AM}^{-1}\text{cm}^{-2}$)	Tempo de resposta (s)	Limites testados (μM)	Faixa de Linearidade (μM)	Limite de detecção (μM)
Nano H < R Q = 1 mC	250	0,80	5	1 – 12	1 – 6	0,66
Nano H = R Q = 3 mC	250	1,32	5	1 – 12	1 – 6	0,75
Nano H > R Q = 5 mC	250	1,45	5	1 – 12	1 – 6	0,52
Nano H < R	600	-	-	-	-	-
Nano H = R	600	-	-	-	-	-
Nano H > R Q = 7 mC	600	1,25	5	1 – 12	1 – 8	1,20
Nano H < R Q = 5 mC	756	0,47	5	1 – 12	1 – 6	0,55
Nano H = R Q = 7 mC	756	0,53	5	1 – 12	1 – 6	1,28
Nano H > R Q = 9 mC	756	0,92	5	1 – 12	1 – 6	0,78

Tabela 9: Características dos eletrodos nanoestruturados de 250 nm, 600nm e 756nm de diâmetro com diferentes cargas depositadas.

Geometria	2R (nm)	Sensibilidade ($\text{AM}^{-1}\text{cm}^{-2}$)	Tempo de resposta (s)	Limites testados (μM)	Faixa de Linearidade (μM)	Limite de detecção (μM)
Compacto Q = 3 mC	-	0,26	8	1 - 12	6 – 12	0,63
Compacto Q = 5 mC	-	0,28	8	1 - 12	3 – 11	0,98
Compacto Q = 7 mC	-	0,72	8	1 - 12	1 – 7	0,81

Tabela 10: Características dos eletrodos compactos com diferentes cargas depositadas.

Eletrodos compactos de mesma carga também foram testados, conforme mostra a comparação da Figura 124. Os parâmetros do biossensor são exibidos na Tabela 10. Nota-se, portanto, que a nanoestruturação do eletrodo favorece o desempenho do biossensor, tanto em sensibilidade como linearidade. O desempenho superior das plataformas nanoestruturadas manifesta-se também no nível de ruído, que é menor nestas últimas.

Além disso, observou-se que a geometria não é o único fator relevante: a dimensão da rede polimérica também importa. Conforme se nota da Tabela 9, a rede de 250 nm apresenta sensibilidade superior nas três geometrias testadas. O menor limiar de detecção também ocorre para o tamanho de 250 nm, na geometria H>R.

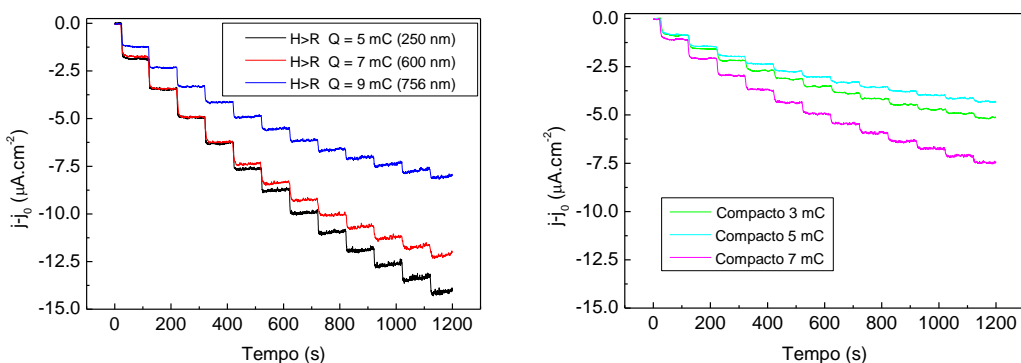


Figura 124: Comparação entre as cronoamperometrias realizadas em filmes nanoestruturados de PPy de 250 nm, 600 nm e 756 nm, todos com nível de preenchimento acima do equador (à esquerda) e compactos (à direita).

Acréscimos de $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de catecol.

Para poder explicar esses resultados devemos analisar o processo bioquímico que está ocorrendo. A sequência de reações desse processo envolve a oxidação da enzima tirosinase por um agente oxidante (oxigênio molecular), que em seguida é reduzida ao seu estado inicial a partir de agentes redutores (catecol), que são por sua vez oxidados, formando uma quinona. Essas espécies são então reduzidas diretamente no eletrodo em potenciais próximos de 0 V, sendo a corrente de redução proporcional à concentração de catecol.

Em geral, a proximidade entre a enzima e o eletrodo é fundamental para o rápido ciclo de reação. Portanto, para a otimização dos biossensores, buscam-se configurações onde ocorra uma rápida redução das quinonas no eletrodo.

Na Figura 125 temos uma ilustração, fora de escala, de como os aglomerados da enzima se distribuem sobre as nanoestruturas de polipirrol com diferentes níveis de preenchimento polimérico, $H < R$, $H = R$ e $H > R$, respectivamente.

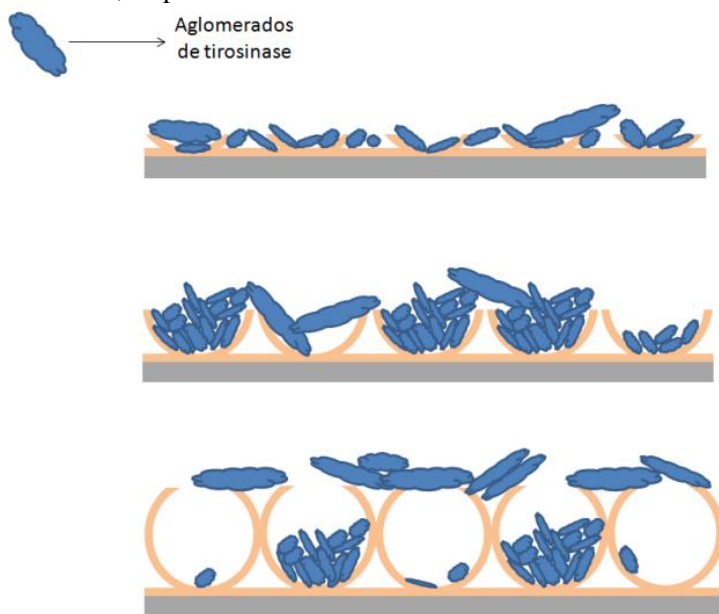


Figura 125: Distribuição de aglomerados de tirosinase sobre as plataformas poliméricas com diferentes níveis de preenchimento.

Das medidas amperométricas anteriores (Figura 123) é possível observar que, em todos os casos, as amostras nanoestruturadas acima do equador das esferas (H>R) apresentaram os melhores resultados para a detecção de catecol. Esse fato deve-se à maneira como a enzima se distribui sobre a nanoestrutura de polipirrol. Para essas estruturas, as aberturas dos alvéolos são pequenas, portanto, grande parte desses aglomerados não consegue passar pelas aberturas e as cavidades ficam somente parcialmente preenchidas com tirosinase, que se distribuem principalmente ao longo de sua superfície externa, como que sobre uma “grade” (Figura 125).

Esse arranjo faz com que a enzima fique numa posição privilegiada para a reação bioquímica, pois as quinonas produzidas nesse processo ficam muito próximas da interface do eletrodo onde serão reduzidas. No entanto, esse processo de redução deve ser precedido pela difusão da quinona pelo interior do alvéolo. Assim, quanto menor esse caminho de difusão, menor as perdas envolvidas, o que resulta em maior resposta do biossensor e aumento da sensibilidade do mesmo (Figura 126). Assim, o fato dos biossensores fabricados a partir de esferas de 250 nm de diâmetro (H>R) serem mais sensíveis do que aqueles construídos a partir de esferas de 756 nm (H>R), está relacionado com a proximidade entre o sítio onde ocorre a reação bioquímica que produz as quinonas e a região onde elas posteriormente serão reduzidas no eletrodo, gerando o sinal elétrico. Considerando a distribuição dos aglomerados enzimáticos nas nanoestruturas com H>R (Figura 126), o caminho de difusão para os biossensores nanoestruturados de 250 nm é consideravelmente menor que para os biossensores de 756 nm.

Além disso, o fato da enzima não ficar compactada no interior das cavidades facilita o processo de regeneração da mesma, que deve retornar ao seu estado oxidado para reiniciar o ciclo bioquímico.

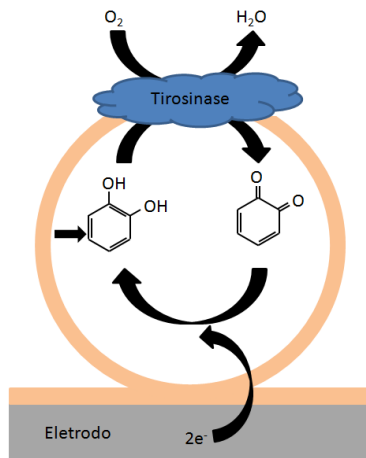


Figura 126: Processo de oxidação do catecol promovido pela tirosinase e posterior redução dos produtos no eletrodo para uma plataforma nanoestruturada acima do equador.

No caso das amostras compactas e nanoestruturadas no equador e abaixo, a enzima fica distribuída sobre toda a superfície (amostra compacta) ou preenche quase completamente as cavidades (nanoestruturadas H=R e H<R), bloqueando a área eletroativa e/ou dificultando a difusão das espécies (o-quinonas) até o eletrodo, o que diminui o sinal de corrente elétrica.

4.6.2 Forma & mecanismo

É interessante estabelecer uma correlação entre a geometria de melhor desempenho do biossensor com o mecanismo de funcionamento do mesmo.

Vimos que para o sensor de peróxido, ao contrário deste último, a geometria de interface que apresentou os melhores resultados corresponde aos alvéolos com maior abertura, isto é, com h=R. Ocorre que, naquele caso, a NP de platina, que atua primordialmente como elemento catalítico, também funciona como interface elétrica na redução do peróxido. Portanto, para o sensor de peróxido, aumentar a área eletroativa é o que importa, e essa é maximizada na condição h=R. Como sugestão para trabalhos futuros, seria interessante verificar se a funcionalização deste biossensor com a enzima glucose oxidase modificaria esse panorama.

4.6.3 Estabilidade dos biossensores

Um aspecto importante na fabricação de biossensores refere-se à sua estabilidade. Embora este não tenha sido o enfoque do trabalho, observamos dois fatos de relevância relativos ao desempenho do dispositivo em função do tempo, que não podem ser ignorados.

De um lado, verificou-se que a enzima, após o processo de imobilização, tem um “tempo de cura”, isto é, a atividade enzimática evolui num período de dias, quando então atinge um ponto de máxima sensibilidade.

A Figura 127 traz um gráfico das medidas de cronoamperometria em amostras compactas de diferentes espessuras, e que foram realizadas no mesmo dia da imobilização da enzima sobre a plataforma polimérica. Nota-se que não há diferença alguma entre as curvas, e que o nível de ruído suplanta os patamares de corrente causados por adições sucessivas de analito.

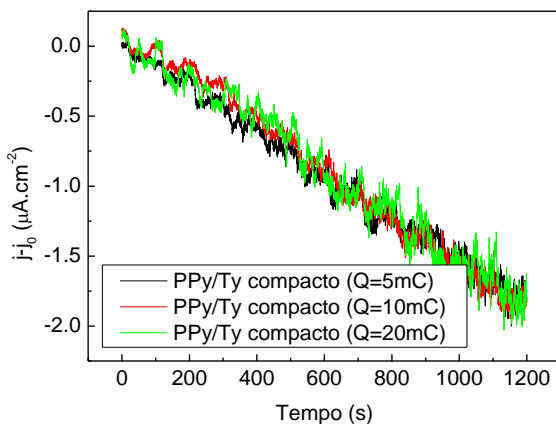


Figura 127: Comparação entre as cronoamperometrias de amostras compactas para diferentes cargas. Acréscimos de $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de catecol.

A Figura 128 exibe a evolução da resposta do biossensor para diferentes intervalos de tempo (dias) entre a fabricação/imobilização e a primeira medida amperométrica, para diferentes geometrias. Observa-se sempre o mesmo comportamento: a sensibilidade do biossensor atinge um máximo sete dias após a imobilização, para em seguida regredir a níveis mais modestos. Como proposta de trabalhos futuros sugere-se o

planejamento de uma metodologia que permita aprofundar o entendimento desse fenômeno.

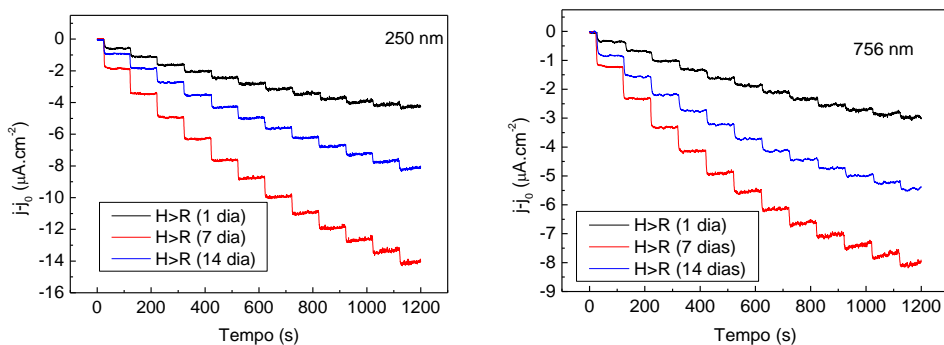


Figura 128: Comparação entre as cronoamperometrias de amostras nanoestruturadas de 250 nm e 756 nm (com mesma carga) realizadas em diferentes dias após sua fabricação. Acréscimos de 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de catecol.

Geometria	2R (nm)	Medida após	Sensibilidade ($\text{A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)
Nano Q = 5 mC H>R	250	1 dia	0,47
Nano Q = 5 mC H>R	250	7 dias	1,45
Nano Q = 5 mC H>R	250	14 dias	0,83
Nano Q = 9 mC H>R	756	1 dia	0,31
Nano Q = 9 mC H>R	756	7 dias	0,92
Nano Q = 9 mC H>R	756	14 dias	0,61

Tabela 11: Características dos eletrodos nanoestruturados de 250 nm (Q = 5 mC) e 756 nm (Q = 9 mC) para diferentes dias.

4.6.3.1 Perda de sensibilidade pelo uso continuado

O segundo fato relevante observado refere-se à queda da sensibilidade do dispositivo após ciclos sucessivos de medida. Num experimento simples, foram realizadas quatro medidas de cronoamperometria sucessivas em uma mesma amostra nanoestruturada de 600 nm com carga de 7 mC, que equivale à geometria H>R. As medidas são apresentadas na Figura 129.

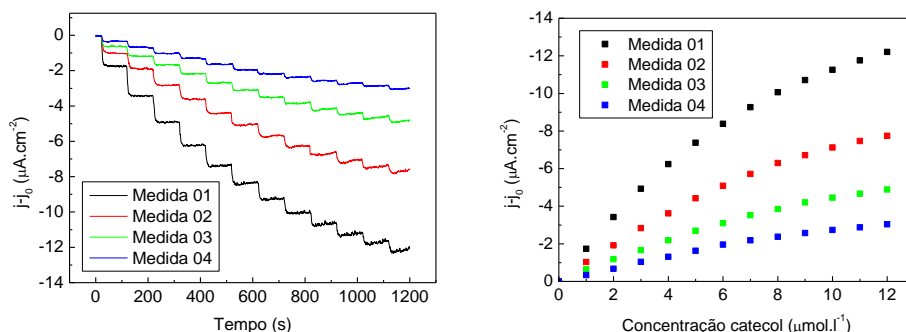


Figura 129: Diversas cronoamperometrias realizadas para a mesma amostra. Medidas simultâneas. Acréscimos de $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de catecol.

Medida	Sensibilidade ($\text{A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Tempo de resposta (s)	Limites testados (μM)	Faixa de Linearidade (μM)	Limite de detecção (μM)
01	1,25	5	1 – 12	1 – 8	1,20
02	0,78	5	1 – 12	1 – 8	0,78
03	0,48	5	1 – 12	1 – 8	0,69
04	0,30	5	1 – 12	1 – 8	0,67

Tabela 12: Características dos eletrodos nanoestruturados acima do equador de esferas de 600 nm (7 mC) para repetidas medidas de cronoamperometria.

Constatou-se que há uma queda de sensibilidade entre a primeira e a quarta medida, que pode estar atrelada a diversos fatores, como degradação do polímero ou perda de atividade da enzima, entretanto, esses aspectos ainda carecem de maiores investigações.

4.6.4 Comparação com dados da literatura

A tabela a seguir relaciona os parâmetros e características dos diferentes biossensores desenvolvidos ao longo do trabalho. Ambos os biossensores para detecção de H_2O_2 e catecol apresentaram os melhores resultados para as amostras nanoestruturadas no equador e acima do equador das esferas quando comparados com os biossensores compactos com mesma carga depositada.

Biossensor	Analito	Geometria	Sensibilidade ($A.M^{-1}.cm^{-2}$)	Tempo de resposta (s)	Limites testados (μM)	Faixa de Linearidade (μM)	Limite de detecção (μM)
PPy/NPPt	H_2O_2	Nano no equador de esferas de 535 nm Q = 3.5 mC	$0,95 \times 10^{-3}$	8	$0,4 - 8 \times 10^3$	$0,4 - 5 \times 10^3$	$0,39 \times 10^3$
PPy/NPPt	H_2O_2	Compacto Q = 3.5 mC	$0,15 \times 10^{-3}$	-	$0,4 - 8 \times 10^3$	$0,4 - 8 \times 10^3$	$0,33 \times 10^3$
PPy/Ty	Catecol	Nano acima do equador de esferas de (250 nm) Q = 5 mC	1,45	5	1 - 12	1 - 6	0,52
PPy/Ty	Catecol	Nano acima do equador de esferas de (600nm) Q = 7 mC	1,25	5	1 - 12	1 - 8	1,20
PPy/Ty	Catecol	Nano acima do equador de esferas de (756nm) Q = 9 mC	0,92	5	1 - 12	1 - 6	0,78
PPy/Ty	Catecol	Compacto Q = 7 mC	0,72	8	1 - 12	1 - 7	0,81
PPy/Ty	Catecol	Compacto Q = 5 mC	0,28	8	1 - 12	3 - 11	0,98
PPy/Ty	Catecol	Compacto Q = 3 mC	0,26	8	1 - 12	6 - 12	0,63

Tabela 13: Características do desenvolvidos neste trabalho.

A Tabela 14 apresenta alguns biossensores semelhantes aos que foram construídos neste trabalho, entretanto, devido às inúmeras aplicações e especificidades desses dispositivos, fica difícil fazer uma comparação mais apurada entre as características de cada um deles com os da Tabela 13.

Biossensor	Analito	Ref.	Sensibilidade (A.M ⁻¹ .cm ⁻²)	Tempo de resposta (s)	Faixa de Linearidade (μM)	Limite de deteção (μM)
PMo ₁₂ /PPy/ CPE	H ₂ O ₂	(118)	15,57 x 10 ⁻³	5	(0,2 – 3) x 10 ³	0,5
PPy/nanofi os de PB	H ₂ O ₂	(119)	10 x 10 ⁻³	8	(0,2 – 7,2) x 10 ³	-
CV/PPy/Ty	Catecol	(120)	0,0156	30	1 – 8	-
Pt/ PO ⁴⁻ Ppy/Ty	Catecol	(121)	6,02	5	10 - 120	0,84
ITO/PPy/F e ²⁺ /Ty	Fenol	(122)	0,33	80	4,5 – 107,4	0,7
CV/SWNT s/PPy/Ty	Dopamina	(123)	0,467	5	5 - 50	5
Pt/Ppy/KCl /Tyr	Catecol	(124)	29,2	-	1 – 400	20 x 10 ⁻³

Tabela 14: Dados de biossensores semelhantes encontrados na literatura.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 CONCLUSÕES

Esse trabalho teve por objetivo principal o desenvolvimento e caracterização de nanoestruturas de polipirrol para a aplicação em biossensores, estruturas que venham a servir de plataforma para a imobilização de biomoléculas e desenvolvimento de sensores bioanalíticos.

Dentro desse contexto, foram desenvolvidas e estudadas estruturas poliméricas periódicas com diferentes geometrias, e verificadas suas potencialidades como biossensores não enzimáticos e enzimáticos para a detecção de peróxido de hidrogênio e catecol, respectivamente. Analitos estes, encontrados em abundância na natureza como subproduto de diversas reações bioquímicas, e que possuem grande interesse científico e tecnológico na área de biossensores.

Medidas de perfilometria, microscopia ótica, MEV e FEG demonstraram que a litografia de nanoesferas associada à eletropolimerização permite a fabricação de nanoestruturas poliméricas de excelente qualidade, com ordenamento de longo alcance e alto grau de homogeneidade e cuja geometria pode ser rigorosamente controlada pela carga nominal eletropolimerizada.

A espectroscopia de impedância eletroquímica comparativa entre eletrodos poliméricos compactos e nanoestruturados permitiu uma análise inédita na literatura a respeito da influência da nanoestruturação sobre os mecanismos de transporte iônico e eletrônico através da interface. Observou-se que a nanoestruturação da interface equivale à introdução de uma camada intermediária de transporte iônico de menor difusividade, que aumenta drasticamente os tempos característicos dos processos de transporte e transferência de carga.

As medidas amperométricas realizadas tanto para o biossensor não enzimático de peróxido de hidrogênio, como para o biossensor enzimático de catecol mostraram que os melhores resultados obtidos, em todos os casos, estão associados às plataformas poliméricas nanoestruturadas.

No caso do biossensor não enzimático, as nanopartículas possuem a função de catalisar a reação de oxidação do peróxido de hidrogênio na superfície do eletrodo. O uso de nanopartículas de platina mostrou-se fundamental na amplificação dos sinais amperométricos medidos em todas as amostras, aumentando significativamente a sensibilidade do sensor. Os melhores resultados foram obtidos para os

eletrodos nanoestruturados no equador de esferas de 535 nm de diâmetro, que mostrou-se linear na faixa de 0,4 – 5 mM com sensibilidade de $0,95 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ e limite de detecção de 0,39 mM. O tempo de resposta característico para esses sensores foi da ordem de 8 s.

Em relação aos biossensores enzimáticos de tirosinase para detecção de catecol, foram comparados filmes compactos e nanoestruturados de PPy com a mesma carga depositada, sendo que os melhores resultados foram observados para filmes nanoestruturados. Diferentes diâmetros de esferas e níveis de preenchimento polimérico também foram testados. Nesse caso, os melhores resultados foram observados para os biossensores fabricados a partir de esferas de 250 nm de diâmetro e com nível de preenchimento polimérico acima do equador das esferas. A sensibilidade para esses biossensores foi de $1,45 \text{ A.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ numa faixa linear de 1 – 6 μM e limite de detecção de 0,52 μM . O tempo de resposta obtido para esses eletrodos foi da ordem de 5 s.

Esses valores, quando comparados aos da literatura, mostram-se extremamente satisfatórios em relação aos parâmetros investigados, comprovando que essas geometrias, associadas à afinidade do PPy com biomoléculas ativas, possuem enorme potencial na construção de biossensores eficientes.

A comparação entre os dois tipos de sensores permitiu estabelecer uma correlação entre a forma da interface e o mecanismo de catálise que propicia o funcionamento do biossensor. Quando esse mecanismo envolve a etapa de transferência eletrônica que origina o sinal elétrico, o aumento de área propiciado pela maior abertura dos alvéolos resulta na melhor resposta amperométrica. Quando o mecanismo de catálise envolve uma etapa intermediária, então o efeito de grade propiciado por alvéolos pequenos e quase fechados resulta na melhor resposta.

5.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para a continuidade do trabalho em questão, poderão ser adotadas diversas rotas e alternativas que visam o aprimoramento dos biossensores desenvolvidos, assim como a fabricação de outros biossensores a partir dos mesmos princípios e estruturas:

- realizar a caracterização elétrica completa da estrutura polimérica com a biomolécula imobilizada;
- realizar estudo mais detalhado da especificidade do biossensor com a utilização de possíveis substâncias interferentes;
- imobilizar outros tipos de biomoléculas nas estruturas de polipirrol desenvolvidas neste trabalho;
- coimobilização da biomolécula juntamente com materiais que possuam propriedades catalíticas, para intensificação do sinal medido;
- utilização de outros dopantes no processo de eletropolimerização do polipirrol e fabricação dessas plataformas;
- nanoestruturação de polímeros com maior grau de porosidade, como por exemplo, a polianilina.

Outro enfoque interessante consiste em investigar a resposta impedimétrica das nanoestruturas, comparando:

- nanoestruturas poliméricas e metálicas;
- diferentes periodicidades;
- diferentes eletrólitos.

6 BIBLIOGRAFIA

1. **T.A. ALBANIS, D.G. HELA, T.M. SAKELLARIDES, I.K. KONSTANTINO**. Monitoring of pesticide residues and their metabolites in surface and underground waters of Imathia (N. Greece) by means of solid-phase extraction disks and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1998, Vol. 823, p. 59.
2. **F. SCHELLER, R. D. SCHMID**. *Biosensors : applications in medicine, environmental protection and process control*. 2nd. New York : VCH, 1989. p. 428.
3. **A. RASOOLY, K.E. HEROLD**. *Biosensors and Biodetection*. 1ª Edição. s.l. : Humana Press, 2009. p. 464. Vol. 2.
4. **P. YANG, F. KIM**. Langmuir-Blodgett Assembly of One-Dimensional Nanostructures. *ChemPhysChem*. 2002, Vol. 3, p. 503.
5. **O. AZZARONI, K.H. A. LAU**. Layer-by-Layer Assemblies in Nanoporous Templates: NanoOrganized Design and Applications of Soft Nanotechnology. *Soft Matter*. 2011, Vol. 7, p. 8709.
6. **DEEPSHIKHA, T. BASU**. A Review on Synthesis and Characterization of Nanostructured Conducting Polymers (NSCP) and Application in Biosensors. *Analytical Letters*. 2011, Vol. 44, p. 1126.
7. **M. GERARD, A. CHAUBEY, B.D. MALHOTRA**. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosens. Bioelectron*. 2002, Vol. 17, p. 345.
8. **JASINSKI, E.F**. *Litografia de Nanoesferas para Obtenção de Moldes Secundários Poliméricos Eletrodepositados em Silício*. Departamento de Física, UFSC. Florianópolis : s.n., 2007. p. 114, Dissertação de Mestrado.
9. **SPADA, E. R**. *Eletrodeposição de Redes Porosas Ordenadas de Cobalto e NiFe via Litografia de Nanoesferas*. Departamento de Física, UFSC. Florianópolis : s.n., 2007. p. 140, Dissertação de Mestrado.
10. **CHAVERO, L. N**. *Compósito Ordenado de Acrilato e Sílica como Plataforma para a Nanoestruturação de Materiais*. Departamento de Física, UFSC. Florianópolis : s.n., 2009. p. 78, Dissertação de Mestrado.
11. **MATTOS, L. L**. *Membranas Nanoestruturadas de Polipirrol para Aplicação em Baterias*. Departamento de Física, UFSC. Florianópolis : s.n., 2011. p. 155, Dissertação de Mestrado.
12. **T. AHUJA, I.A. MIR, D. KUMAR, RAJESH**. Biomolecular immobilization on conducting polymers. *Biomaterials*. 2007, Vol. 28, p. 791.
13. **M. SINGH, P.K. KATHUROJU, N. JAMPANA**. Polypyrrole based amperometric glucose biosensors. *Sens. Actuators B*. 2009, Vol. 143, p. 430.
14. **R.S. MARKS, C.R. LOWE, D.C. CULLEN, H.H. WEETALL, I. KARUBE**. *Handbook of Biosensors and Biochips*. 1ª Edição. s.l. : John Wiley & Sons, 2007. p. 1239.
15. **F. SCHELLER, F. SCHUBERT**. *Biosensors*. 1ª Edição. s.l. : Elsevier, 1992. p. 359.
16. **J.C. PICKUP, F. HUSSAIN, N.D. EVANS, N. SACHEDINA**. In vivo glucose monitoring: the clinical reality and the promise. *Biosens. Bioelectron*. 2005, Vol. 20, p. 1897.

17. **J.D. NEWMAN, A.P.F. TURNER.** Home blood glucose monitors: a commercial perspective. *Biosens. Bioelectron.* 2005, Vol. 20, p. 2435.
18. **H.E. KOSCHWANEZ, W.M. REICHERT.** In vitro, in vivo and post explantation testing of glucose detecting biosensors: Current methods and recommendations. *Biomaterials.* 2007, Vol. 28, p. 3687.
19. **N. VERMA, M. SINGH.** A Bacillus sphaericus based biosensor for monitoring nickel ions in industrial effluents and foodstuffs. *J. Automat. Meth. Manage. Chem.* 2006, Vol. 2006, p. 1.
20. —. Development of a yeast biosensor for monitoring mercuric ions in industrial effluents. *Int. J. Environ. Study.* 2005, Vol. 62, p. 3.
21. —. A disposable microbial based biosensor for quality control in milk. *Biosens. Bioelectron.* 2003, Vol. 18, p. 1219.
22. **M. PILIARIK, L. PAROVA, J. HOMELA.** High throughput SPR sensor for food safety. *Biosens. Bioelectron.* 2009, Vol. 24, p. 1399.
23. **M. VALACH, J. KATRLIK, E. STURDIK, P. GEMAINER.** Ethanol Gluconobacter biosensor designed for flow injection analysis: application in ethanol fermentation off-line monitoring. *Sens. Actuators B.* 2009, Vol. 138, p. 581.
24. **K. MOSBACH, B. DANIELSSON.** Thermal bioanalyzers in flow streams—enzyme thermister devices. *Anal. Chem.* 1981, Vol. 53, p. 83A.
25. **B. XIE, M. KHAYYAMI, T. NWOSU, P. LARSSON, B. DANIELSSON.** Ferrocene mediated thermal biosensor. *Analyst.* 1993, Vol. 118, p. 845.
26. **M. GERARD, K. RAMANATHAN, A. CHAUBEY, B.D. MALHOTRA.** Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polyaniline films. *Electroanalysis.* 1999, Vol. 12, p. 450.
27. **GUILBAULT, G.G.** *Ion Select. Electrode Rev.* 1980, Vol. 2, p. 3.
28. **P. N. BARTLETT, R.G. WHITAKER.** Electrochemical immobilization of enzymes. Part II. Glucose oxidase immobilized in poly-N-methyl pyrrole. *J. Electroanal. Chem.* 1987, Vol. 224, p. 37.
29. **K. RAMANATHAN, N.S. SUNDARESAN, B.D. MALHOTRA.** Ion exchanged polypyrrole-based glucose biosensor: enhanced loading and response. *Electroanalysis.* 1995, Vol. 7, p. 579.
30. **M. TROJANOWICZ, T.K. VEL KRAWCZYK.** Electrochemical biosensors based on enzymes immobilized in electropolymerized films. *Mikrochim. Acta.* 1995, Vol. 121, p. 167.
31. **RATCLIFFE, N.M.** Polypyrrole-based sensor for hydrazine and ammonia. *Anal. Chim. Acta.* 1990, Vol. 239, p. 257.
32. **A.Q. CONTRACTOR, T.N. SURESHKUMAR, R. NARAYANAN, S. SUKEERTHI, R. LAL, R.S. SRINIVASA.** Conducting polymers based biosensors. *Electrochim. Acta.* 1994, Vol. 39, p. 1321.
33. **K. RAMANATHAN, M.K. RAM, B.D. MALHOTRA, A.S.N. MURTHY.** Application of polyaniline-Langmuir-Blodgett films as a glucose biosensor. *Mater. Sci. Engg. C.* 1995, Vol. 3, p. 159.

34. **J. NARANG, N. CHAUHAN, C. S. PUNDIR.** A non-enzymatic sensor for hydrogen peroxide based on polyaniline, multiwalled carbon nanotubes and gold nanoparticles modified Au electrode. *Analyst.* 2011, Vol. 136, p. 4460.
35. **W. CAI, Q. XU, X. ZHAO, J. ZHU, H. CHEN.** Porous Gold-Nanoparticle-CaCO₃ Hybrid Material: Preparation, Characterization, and Application for Horseradish Peroxidase Assembly and Direct Electrochemistry. *Chem. Mater.* 2006, Vol. 18, p. 279.
36. **W. CHEN, S. CAI, Q. REN, W. WEN, Y. ZHAO.** Recent advances in electrochemical sensing for hydrogen peroxide: a review. *Analyst.* 2012, Vol. 137, p. 49.
37. **Z. YAN, J. ZHAO, L. QIN, F. MU, P. WANG, X. FENG.** Non-enzymatic hydrogen peroxide sensor based on a gold electrode modified with granular cuprous oxide nanowires. *Microchim Acta.* 2013, Vol. 180, p. 145.
38. **J. W. ZHAO, L. R. QIN, Y. H. HAO, Q. GUO, Z. K. YAN, F. MU.** Application of tubular tetrapod magnesium oxide in a biosensor for hydrogen peroxide. *Microchim Acta.* 2012. 10.1007/s00604-012-.
39. **S. S. ROSATTO, R. S. FREIRE, N. DURÁN, L. T. KUBOTA.** Biosensors Amperométricos para Determinação de Compostos Fenólicos em Amostras de Interesse Ambiental. *Quim. Nova.* 2001, Vol. 24, p. 77.
40. **I. M. RUSSELL, S. G. BURTON.** Development and demonstration of an immobilised-polyphenol oxidase bioprobe for the detection of phenolic pollutants in water. *Analytica Chimica Acta.* 1999, Vol. 389, p. 161.
41. **BARCELO, M. CASTILLO D.** Analysis of industrial effluents to determine endocrine-disrupting chemicals. *Trends Anal. Chem.* 1997, Vol. 16, p. 574.
42. **VINCENT, G.** *Organic Micropollutants in the Aquatic Environmental.* [ed.] A. BJORSETH G. ANGELETTI. Dordrecht : Klumer Academic Publishers, 1991.
43. **EPA.** *Ambient Water Quality Criteria for Phenol.* Washington : s.n., 1980. p. 58.
44. **Bartlett, P. N., [ed.].** *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications.* s.l. : John Wiley & Sons Ltd, 2008. p. 478.
45. **S. Y. SEO, V. K. SHARMA, N. SHARMA.** Myshroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agr. Food Chem.* 2003, Vol. 51, p. 2837.
46. **ERICKSON, H. P.** Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. *Biological Procedures Online.* 2009, Vol. 11, p. 32.
47. **A. S. FERRER, J. N. R. LOPEZ, F. GARCIA.** Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995, Vol. 1247, p. 1.
48. **F. G. CÁNOVAS, J. TUDELA, C. M. MADRID, R. VARÓN, F. G. CARMONA, J. A. LOZANO.** Kinetic study on the suicide inactivation of tyrosinase induced by catechol. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1987, Vol. 912, p. 417.

49. **R. ULLRICH, M. HOFRICHTER.** Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007, Vol. 64, p. 271.
50. **RETAMA, R.J.** Synthesis & characterization of semi conducting polypyrrole/polyacrylamide micro particles with GOx for biosensor application. *Col Surf A: Phys Chem Eng Aspt.* 2005, pp. 270–271:239–44.
51. **C.B. DUKE, L.B. SCHEIN.** Organic solids: is energy-based theory enough? *Phys. Today.* 1980, Vol. 33, p. 42.
52. **A. SHARMA, B.D. MALHOTRA.** Synthesis & characterization of a copolymer: poly (aniline co fluoroaniline). *J. Appl. Polym. Sci.* 2001, Vol. 81, p. 1460.
53. —. Synthesis and characterization of fluorosubstituted polyaniline. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2001, Vol. 96, p. 155.
54. **PANDEY, P.C.** A new conducting polymer-coated glucose sensor. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1.* 1988, Vol. 84, p. 2259.
55. **G.E. COLLINS, L. BUCKLEY.** Conductive polymer-coated fabrics for chemical sensing. *Synth. Met.* 1996, Vol. 78, p. 93.
56. **D. TAXIS, S. MIYAMOTO, T. MURAKAMI, J. KIMURA.** Direct electron transfer with glucose oxidase immobilized in an electro polymerized poly (N methyl pyrrole) film on gold microelectrode. *Anal. Chim. Acta.* 1990, Vol. 235, p. 255.
57. **N. K. GUIMARD, N. GOMEZ, C. E. SCHIMIDT.** Conducting polymers in biomedical engineering. *Progress in Polymer Science.* 2007, Vol. 32, p. 876.
58. **K. ARSHAK, V. VELUSAMY, O.KOROSTYNSKA.** Conducting polymers and their applications to biosensors: Emphasixing on foodborne pathogen detection. *Ieee Sensors J.* 2009, Vol. 9, p. 1942.
59. **J. L. BREDAS, D. BELJONNE, J. CORNIL.** Electroluminescence in semiconducting conjugated polymers and oligomers: A quantum-chemical approach. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London Series a - Mathematical Physical and Engineering Sciences.* 1997, Vol. 355, p. 735.
60. **D. BLOOR, B. MOVAGHAR.** Conducting polymers. *IEEE Proceedings.* 1983, Vol. 130, p. 225.
61. **BIANCHI, R.F.** ESTUDO DAS PROPRIEDADES ELETRÔNICAS E ÓPTICAS DE FILMES E DISPOSITIVOS POLIMÉRICOS. Instituto de Física de São Carlos , Universidade de São Paulo. São Carlos : s.n., 2002. Tese de Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais.
62. **J.L. BREDAS, G.B. STREET.** Polarons, Bipolarons, and Solitons in Conducting Polymers. *Accounts of Chemical Research.* 1985, Vol. vol. 18, p. p. 309.
63. **D. J. MAIA, M. A. DE PAOLI, O. L. ALVES.** Síntese de polímeros condutores em matrizes sólidas hospedeiras. *Guímica Nova.* 2000, Vol. 23.
64. **A.F. DIAZ, J.I. CASTILLO, J.A. LOGAN, W.Y. LEE.** Electrochemistry of conducting polymer films. *J. Electroanal. Chem.* 1981, Vol. 129, p. 115.
65. **A.F. DIAZ, K.K. KANAZAWA.** Electrochemical polymerisation of pyrrole. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1979, p. 635.

66. **S. SADKI, P. SCHOTTLAND, N. BRODIE, G. SABOURAUD.** The mechanisms of pyrrole electropolymerization. *Chem. Soc. Rev.* 2000, Vol. 29, p. 283.
67. **G. A. WOOD, J. O. IROH.** Efficiency of electropolymerization of pyrrole onto carbon fibers. *Synthetic Metals.* 1996, Vol. 80, p. 73.
68. **SCHUHMAN, W.** Conducting polymer based amperometric enzyme electrodes. *Mikrochim. Acta.* 1995, Vol. 121, p. 1.
69. **A. ASAVAPIRIYANONT, G.K. CHANDLER, G.A. GUNAWARDENA, D. PLETCHER.** The electrodeposition of polypyrrole films from aqueous solutions. *J. Electroanal. Chem.* 1984, Vol. 177, p. 229.
70. **N.C. FOULDS, C.R. LOWE.** Enzyme entrapment in electrically conducting polymers. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1986, Vol. 82, p. 1259.
71. **W. SCHUHMAN, C. KRANZ, H. WOHLSCHLAGER, J. STROHMEIER.** Pulse technique for the electrochemical deposition of polymer films on electrode surfaces. *Biosens. Bioelectron.* 1997, Vol. 12, p. 1157.
72. **HELLER, A.** Electrical wiring of redox and enzymes. *Acc. Chem. Res.* 1990, Vol. 23, p. 128.
73. **RAJESH, W. TAKASHIMA, K. KANETO.** Amperometric tyrosinase based biosensor using an electropolymerized PTS-doped polypyrrole film as an entrapment support. *Reactive and Functional Polymers.* 2004, Vol. 59, p. 163.
74. **M. MA, L. QU, S. SHI.** Glucose oxidase electrodes based on microstructured polypyrrole films. *J. Appl. Polym. Sci.* 2005, Vol. 98, p. 2550.
75. **Y. C. TSAI, S. C. LI, S. W. LIAO.** Electrodeposition of polypyrrole multiwalled carbon nanotube glucose oxidase nanobiocomposite film for the detection of glucose. *Biosensors and Bioelectronics.* 2006, Vol. 22, p. 495.
76. **E.M.I.M. EKANAYAKE, D. M. G. PREETHICHANDRA, K. KANETO.** Bi-functional amperometric biosensor for low concentration hydrogen peroxide using polypyrrole immobilizing matrix. *Sensors and Actuators B.* 2008, Vol. 132, p. 166.
77. **H. XU, K. MALLADI, C. WANG, L. KULINSKY, M. SONG, M. MADOU.** Carbon post microarrays for glucose sensors. *Biosensors and Bioelectronics.* 2008, Vol. 23, p. 1637.
78. **K. MIN, Y. J. YOO.** Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase-SWNTs-Ppy composite electrode. *Talanta.* 2009, Vol. 80, p. 1007.
79. **A. SASSOLAS, L. J. BLUM, B.D. LECA-BOUVIER.** Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances.* 2012, Vol. 30, p. 489.
80. **W. STÖBER, A. FINK, E. BOHN.** Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in Micron Size Range. *J. Coll. Interf. Sci.* 1968, Vol. 26, p. 62.
81. **I. M. KRIEGER, F. M. O'NEILL.** Diffraction of Light by Arrays of Colloidal Spheres. *J. Am. Chem. Soc.* . 1968, Vol. 90, p. 3114.
82. **MURAMATSU., L. V.** *Obtenção de Partículas Micrométricas para Máscaras de Litografia.* Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. Set/2003 a Jun/2004. Relatório Final PIBIC. Orientado por D. ZANCHET.

83. **M. A. MCLACHLAN, N. P. JOHNSON, R. M. DE LA RUE, D. W. MCCOMB.** Thin Film Photonic Crystals: Synthesis and Characterisation. *J. Mater. Chem.* 2004, Vol. 14, p. 144.
84. **A. P. PHILIPSE, A. VRIJ.** Preparation and Properties of Nonaqueous Model Dispersions of Chemically Modified, Charged Silica Spheres. *J. Coll. Interf. Sci.* 1989, Vol. 128, p. 121.
85. **G. H. BOGUSH, M. A. TRACY, C. F. ZUKOSKI.** Preparation of Monodisperse Silica Particles: Control of Size and Mass Fraction. *J. Non-Cryst. Solids.* 1988, Vol. 104, p. 95.
86. **O. D. VELEV, P. M. TESSIER, A. M. LENHOFF, E. W. KALER.** A Class of Porous Metallic Nanostructures. *Nature.* 1999, Vol. 401, p. 548.
87. **P. JIANG, J. CIZERON, J. F. BERTONE, V. L. COLVIN.** Preparation of Macroporous Metal Films from Colloidal Crystals. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, Vol. 121, p. 7957.
88. **P. JIANG, K. S. HWANG, D. M. MITTLEMAN, J. F. BERTONE, V. L. COLVIN.** Template-Directed Preparation of Macroporous Polymers with Oriented and Crystalline Arrays of Voids. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, Vol. 121, p. 11630.
89. **O. D. VELEV, T. A. JEDE, R. F. LOBO, A. M. LENHOFF.** Porous Silica via Colloidal Crystallization. *Nature.* 1997, Vol. 389, p. 447.
90. **B. T. HOLLAND, C. F. BLANFORD, A. STEIN.** Synthesis of Macroporous Minerals with Highly Ordered Three-Dimensional Arrays of Spheroidal Voids. *Science.* 1998, Vol. 281, p. 538.
91. **A. A. ZAKHIDOV, R. H. BAUGHMAN, Z. IQBAL, C. X. CUI, I. KHAYRULLIN, S. O. DANTAS, I. MARTI, V. G. RALCHENKO.** Carbon Structures with Three-Dimensional Periodicity at Optical Wavelengths. *Science.* 1998, Vol. 282, p. 897.
92. **P. JIANG, M. J. MCFARLAND.** Wafer-Scale Periodic Nanohole Arrays Templated From Two-Dimensional Nonclose-Packed Colloidal Crystals. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, Vol. 127, p. 3710.
93. **CHEN, D. G.** Anti-Reflection (AR) Coatings made by Sol-Gel Processes: A Review. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells.* 2001, Vol. 68, p. 313.
94. **MESEGUER, F.** Colloidal Crystals as Photonic Crystals. *Colloids Surf. A.* 2005, Vol. 1, p. 270.
95. **R. C. SCHRODEN, M. AL-DAOUS, C. F. BLANFORD, A. STEIN.** Optical Properties of Inverse Opal Photonic Crystals. *Chem. Mater.* 2002, Vol. 14, p. 3305.
96. **M. P. HAROLD, C. LEE, A. J. BURGGRAAF, K. KEIZER, V. T. ZASPALIS, R. S. A. DELANGE.** Catalysis with Inorganic Membranes. *MRS Bull.* 1994, Vol. 19, p. 34.
97. **M. R. NEWTON, A. K. BOHATY, H. S. WHITE, I. ZHAROV.** Chemically modified opals as thin permselective nanoporous membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, Vol. 127, p. 7268.

98. **H. GAU, S. HERMINGHAUS, P. LENZ, R. LIPOWSKY.** Liquid Morphologies on Structured Surfaces: from Microchannels to Microchips. *Science*. 1999, Vol. 283, p. 46.
99. **S. M. WEEKES, F. Y. OGRIN, W. A. MURRAY, P. S. KEATLEY.** Macroscopic Arrays of Magnetic Nanostructures from Self-Assembled Nanosphere Templates. *Langmuir*. 2007, Vol. 23, p. 1057.
100. **N. D. DENKOV, O. D. VELEV, P. A. KRALCHEVSKI, I. B. IVANOV, H. YOSHIMURA, K. NAGAYAMA.** Mechanism of Formation of Two-Dimensional Crystals from Latex Particles on Substrates. *Langmuir*. 1992, Vol. 8, p. 3183.
101. **P. JIANG, M. J. MCFARLAND.** Large-scale fabrication of wafer-size colloidal crystals, macroporous polymers and nanocomposites by spin coating. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, Vol. 126, p. 13778.
102. **JIANG, P.** Large-Scale Fabrication of Periodic Nanostructured Materials by Using Hexagonal Non-Close-Packed Colloidal Crystals as Templates. *Langmuir*. 2006, Vol. 22, p. 3955.
103. **D. E. BORNSIDE, C. W. MACOSKO, L. E. SCRIVEN.** Spin Coating - One-Dimensional Model. *J. Appl. Phys.* 1989, Vol. 66, p. 5185.
104. **MIDDLEMAN, S.** The Effect of Induced Air-Flow on the Spin Coating of Viscous-Liquids. *J. Appl. Phys.* 1987, Vol. 62, p. 2530.
105. **M. E. ORAZEM, B. TRIBOLLET.** *Electrochemical Impedance Spectroscopy*. New Jersey : John Wiley & Sons, Inc., 2008.
106. **E. BARSOUKOV, J. R. MACDONALD.** *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*. Second Edition. New Jersey : A John Wiley & Sons, Inc., 2005.
107. **F. S. DAMOS, R. K. MENDES, L. T. KUBOTA.** Aplicações de QCM, EIS e SPR na Investigação de Superfícies e interfaces para o desenvolvimento de biossensores. *Quim. Nova*. 2004, Vol. 27, p. 970.
108. **S. PHADKE, A. Du PASQUIER, D. P. BIRNIE.** Enhanced Electron Transport through Template-Derived Pore Channels in Dye-Sensitized Solar Cells. *J. Phys. Chem. C*. 2011, Vol. 115, p. 18342.
109. **ATES, M.** Review study of electrochemical impedance spectroscopy and equivalent electrical circuits of conducting polymers on carbon surfaces. *Progress in Organic Coatings*. 2011, Vol. 71, p. 1.
110. **A.J. BARD, L.R. FAULKNER.** *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2ª Edição. s.l. : Wiley, 2001.
111. **W. CHEN, S. CAI, Q. REN, W. WEN, Y. ZHAO.** Recent advances in electrochemical sensing for hydrogen peroxide: a review. *Analyst*. 2012, Vol. 137, p. 49.
112. **F. N. CRESPILO, F. HUGUENIN, V. ZUCOLOTTI, P. OLIVI, F. C. NART, O. N. OLIVEIRA Jr.** Dendrimers as nanoreactors to produce platinum nanoparticles embedded in layer-by-layer films for methanol-tolerant cathodes. *Electrochemistry Communications*. 2006, Vol. 8, p. 348.

113. **T. F. OTERO, C. SANTAMARIA.** Kinetics of the polypyrrole electrogeneration from aqueous solution. An ex situ microgravimetric study. *Electrochimica Acta*. 37, 1992, p. 297.
114. **J. S. MORENO, S. PANERO.** Evaluation of the interface aging process of polypyrrole–polysaccharide electrodes in a simulated physiological fluid. *Electrochimica Acta*. 2012, Vol. 68, p. 1.
115. **F. N. CRESILHO, M. E. GHICA, V. ZUCOLOTTI, F. C. NART, O. N. OLIVEIRA Jr., C. M. A. BRETT.** Electroactive Nanostructured Membranes (ENM): Synthesis and Electrochemical Properties of Redox Mediator-Modified Gold Nanoparticles Using a Dendrimer Layer-by-Layer Approach. *Electroanalysis*. 2007, Vol. 19, p. 805.
116. **N. GODINO, X. BORRISÉ, F. X. MUÑOZ, F. J. DEL CAMPO, R. G. COMPTON.** Mass Transport to Nanoelectrode Arrays and Limitations of the Diffusion Domain Approach: Theory and Experiment. *J. Phys. Chem. C*. 2009, Vol. 113, p. 11119.
117. **J. GUO, E. LINDNER.** Cyclic Voltammograms at Coplanar and Shallow Recessed Microdisk Electrode Arrays: Guidelines for Design and Experiment. *Anal. Chem*. 2009, Vol. 81, p. 130.
118. **X. WANG, H. ZHANG, E. WANG, Z. HANA, C. HUA.** Phosphomolybdate-polypyrrole composite bulk-modified carbon paste electrode for a hydrogen peroxide amperometric sensor. *Materials Letters*. 2004, Vol. 58, p. 1661.
119. **M. LIN, J. YANG, M. CHO, Y. LEE.** Hydrogen Peroxide Detection Using a Polypyrrole/Prussian Blue Nanowire Modified Electrode. *Macromol. Res*. 2011, Vol. 19, p. 673.
120. **C. CRISTEA, C. MOUSTY, S. COSNIER, I. C. POPESCU.** Organic phase PPO biosensor based on hydrophilic films of electropolymerized polypyrrole. *Electrochimica Acta*. 2005, Vol. 50, p. 3713.
121. **C. APETREI, M. L. R. MÉNDEZ, J.A. DE SAJA.** Amperometric tyrosinase based biosensor using an electropolymerized phosphate-doped polypyrrole film as an immobilization support. Application for detection of phenolic compounds. *Electrochimica Acta*. 2011, Vol. 56, p. 8919.
122. **RAJESH, S.S. PANDEY, W. TAKASHIMA, K. KANETO.** Simultaneous co-immobilization of enzyme and a redox mediator in polypyrrole film for the fabrication of an amperometric phenol biosensor. *Current Applied Physics*. 2005, Vol. 5, p. 184.
123. **K. MIN, Y. J. YOO.** Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase–SWNTs–Ppy composite electrode. *Talanta*. 2009, Vol. 80, p. 1007.
124. **R. RAMYA, M.V. SANGARANARAYANAN.** Polypyrrole microfibrils synthesized with Quillaja Saponin for sensing of catechol. *Sensors and Actuators B*. 2012, Vol. 173, p. 40.
125. **J.Y. XIANG, X.L. WANG, J. ZHONG, D. ZHANG, J.P. TU.** Enhanced rate capability of multi-layered ordered porous nickel phosphide film as anode for lithium ion batteries. *Journal of Power Sources*. 2011, Vol. 196, p. 379.
126. <http://www.ac.uni-kiel.de/tuczek/research-new/oxygen-activation>. [Online]

7 APÊNDICE

7.1 ESTIMATIVAS DOS PARÂMETROS DE CIRCUITO EQUIVALENTE

Série A

Potencial de eletropolimerização (V)	Parâmetros dos primeiros semicírculos (altas frequências)			Parâmetros dos segundos semicírculos (baixas frequências)		
	R (Ω)	CPE (F)	n	R ($K\Omega$)	CPE (F)	n
1.0	142.9	3.79E-7	0.842	73.9	1.09E-5	0.771
1.4	88.7	2.57E-6	0.686	78.0	1.02E-5	0.794
1.6	84.0	1.01E-5	0.559	74.8	1.05E-5	0.790
1.8	75.5	6.35E-6	0.565	86.2	1.21E-5	0.769

Tabela 15: Parâmetros estimados para os semicírculos formados em altas e baixas frequências para a Série A. R representa o diâmetro dos semicírculos, CPE são valores associados à pseudocapacitâncias na interface e interior do polímero e n é o coeficiente de CPE.

Série B

Carga	Parâmetros dos primeiros semicírculos (altas frequências)				Parâmetros dos segundos semicírculos (baixas frequências)		
	R _s	R (Ω)	CPE (F)	n	R (KΩ)	CPE (F)	n
5 mC	22.3	383	1.07E-7	0.905	35.4	1.40E-5	0.752
10 mC	19.0	113	1.91E-7	0.890	68.9	1.43E-5	0.762
15 mC	23.2	91.8	1.27E-7	0.924	45.3	2.00E-5	0.710
20 mC	21.0	75.7	8.88E-8	0.954	41.0	2.48E-5	0.680
25 mC	19.6	71.3	8.23E-8	0.961	21.1	4.13E-5	0.629
30 mC	21.2	91.5	9.97E-8	0.946	16.2	4.13E-5	0.646
35 mC	21.8	70.7	1.09E-7	0.942	21.8	6.63E-5	0.560

Tabela 16: Parâmetros estimados para os semicírculos formados em altas e baixas frequências para a Série B.

Série C

Carga	Parâmetros dos primeiros semicírculos (altas frequências)			
	R_s	R (Ω)	CPE (F)	n
1 mC	36.85	582.0	7,80E-08	0.9999
3 mC	30.58	529.0	1,26E-07	0.9359
5 mC	24.86	323.0	1,84E-07	0.8939
7 mC	18.46	130.0	2,17E-07	0.8788
9 mC	21.63	59.8	5,84E-08	0.9996

Tabela 17: Parâmetros estimados para os semicírculos formados em altas frequências para a Série C.

Série D

Carga	Parâmetros dos primeiros semicírculos (altas frequências)			
	R_s	R (K Ω)	CPE (μ F)	n
1 mC	65.3	10.41	0.275	0.967
3 mC	24	3.82	0.317	0.944
5 mC	27.7	1.08	0.239	0.948
7 mC	27.6	8.78	0.235	0.9302
9 mC	22.6	25.1	0.242	0.962

Tabela 18: Parâmetros estimados para os semicírculos formados em altas frequências para a Série D.