



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



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

Mestrando: RONALT MARCELINO LEMOS DE OLIVEIRA

Orientador: PROF. DR. JOÃO MARCOS MADURRO

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

UBERLÂNDIA

-2009-



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



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

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

Mestrando: RONALT MARCELINO LEMOS DE OLIVEIRA

Orientador: PROF. DR. JOÃO MARCOS MADURRO

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

Curso: QUÍMICA

Área de concentração: QUÍMICA

UBERLÂNDIA

-2009-

RONALT MARCELINO LEMOS DE OLIVEIRA

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

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

Área de concentração: Química

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

Uberlândia

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

CDU: 678.7



ALUNO(A): RONALT MARCELINO LEMOS DE OLIVEIRA

NÚMERO DE MATRÍCULA: 86342

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

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

ORIENTADOR:

PROF. DR. JOÃO MARCOS MADURRO

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

NOME:

ASSINATURA:

Prof. Dr. João Marcos Madurro

(IQUFU)

Prof. Dr. Odonório Abrahão Júnior

(Universidade Federal do Triângulo Mineiro)

Profª Dra. Silvana Guilardi

(IQUFU)

Uberlândia, 30 de junho de 2009.

AGRADECIMENTOS

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

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

Nomenclatura

Letras Gregas

Ω - ohm - resistência elétrica

λ - comprimento de onda (nm)

μ - micro (10^{-6})

Abreviações

PICs – Polímeros intrinsecamente condutores

SBR- Elastômero de copoli(butadieno/acronitrila)

EIE - Espectroscopia de impedância eletroquímica

MECQ – Microbalança eletroquímica de cristal de quartzo

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

EQM – Eletrodos quimicamente modificados

PC- Polímero Condutor

DNA – Ácido desoxirribonucléico

Poli (A)- Poli-adenosina

Poli (T) – Poli-timidina

SUMÁRIO

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

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

Índice das figuras

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

com a base metálica.

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

número de ciclos.

- Figura 30:** (A) Perfil $j \times E$ (—) e $dm \times E$ (- - -) de 3-hidroxi-fenilacético $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, em pH 0,5 com 2 varreduras, 50 mV.s^{-1} . (B) Perfil dm versus número de ciclos, 20 varreduras. 52
- Figura 31:** perfil $dm \times \Delta Q$ para os primeiros 2 voltamogramas cíclicos de 3-hidroxifenilacético $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ em meio de H_2SO_4 $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, 50 mV.s^{-1} . 53
- Figura 32:** Microscopias de força atômica do eletrodo de grafite (A_1 , A_2 e A_3) e do eletrodo modificado com poli-(3-HFA) (B_1 , B_2 e B_3). 54
- Figura 33:** Voltamogramas de pulso diferencial de eletrodos de grafite modificado com poli-3HPA preparadas em pH 0,5 (A) contendo poli (A) antes de hibridação; (B) e após 15 minutos de incubação com a fita complementar poli (T), tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5, amplitude de pulso e pulso $0,05 \text{ V}$ período $0,2 \text{ s}$. 55
- Figura 35:** Voltamogramas de pulso diferencial de eletrodo de grafite, contendo azul de metileno: (A) modificado com poli-3HFA; (B) modificado com poli-HPA/poli(A) e (C) poli-HPA/poli(A)/poli(T), tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5, amplitude de pulso $0,05 \text{ V}$, período do pulso $0,2 \text{ s}$. 56

Índice das tabelas

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

RESUMO:

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRACT:

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1. POLÍMEROS

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

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

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

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

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

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

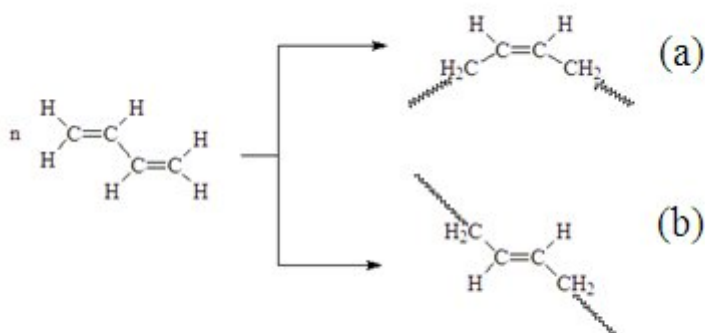


Figura 1: Estruturas *cis*-polibutadieno (a) e *trans*-polibutadieno (b).

1.1.1. CLASSIFICAÇÃO DE POLÍMEROS

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

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

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

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

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

Tabela 1: Estruturas macromoleculares de homopolímeros e copolímeros

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

Tabela 2: Classificação para polímeros

Classificação de polímeros	
Critério	Classe de polímero
Origem do polímero	• Natural • Sintético
Número de monômeros	• Homopolímero • Copolímero
Método de preparação do polímero	• Polímero de adição • Polímero de condensação • Modificação de outro polímero
Estrutura química da cadeia polimérica	• Poli-hidrocarboneto • Poliamida • Poliéster
Encadeamento da cadeia polimérica	• Sequência cabeça-cauda • Sequência cabeça-cabeça, cauda-cauda
Configuração dos átomos na cadeia polimérica	• Sequência cis • Sequência trans
Taticidade da cadeia polimérica	• Isotático • Sindiotático • Atático
Fusibilidade e/ou solubilidade do polímero	• Termoplástico • Termorrígido
Comportamento mecânico do polímero	• Borracha ou elastômero • Plástico • Fibra

1.1.2. POLÍMEROS CONDUTORES

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

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

despertam considerável interesse para várias aplicações [3].

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

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

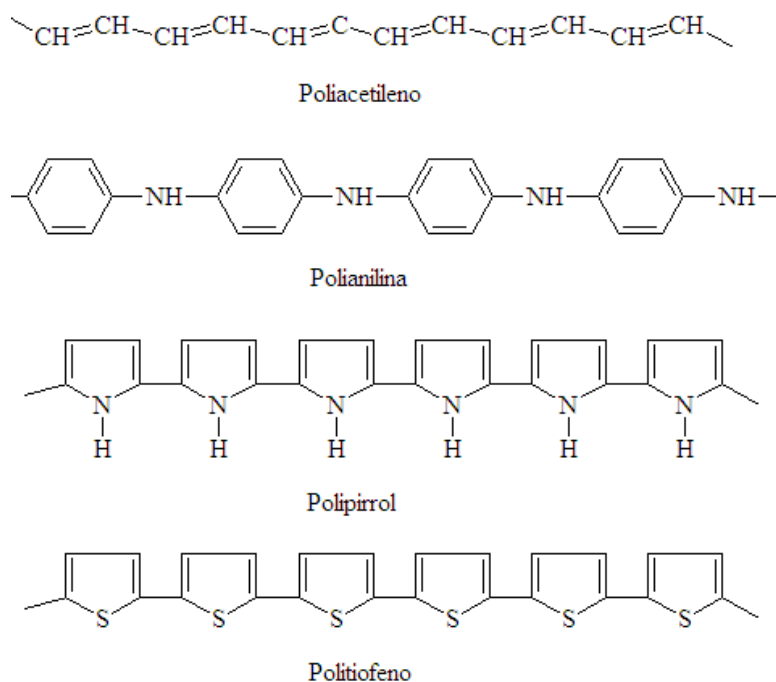


Figura 3: Estrutura dos polímeros condutores intrínsecos (PICs) mais estudados.

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

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

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

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

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

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

1.2. ELETRODOS MODIFICADOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2.1. PREPARAÇÃO DE POLÍMEROS PARA EQM's

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

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

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

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

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

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

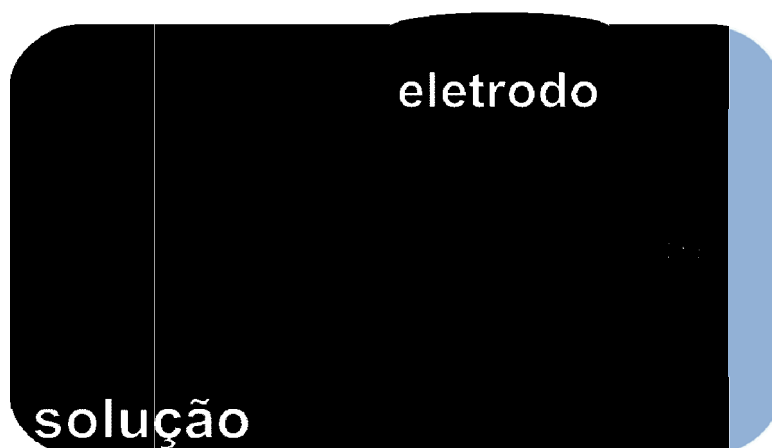


Figura 4: Dupla camada elétrica formada na superfície do eletrodo como resultado do potencial aplicado. (d_0 a d_1) camada interna compacta e (d_1 a d_2) camada difusa [30].

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

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

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

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

1.2.2. TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS PARA A FORMAÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS.

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

- a) Galvanostático, corrente constante.

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

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

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

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

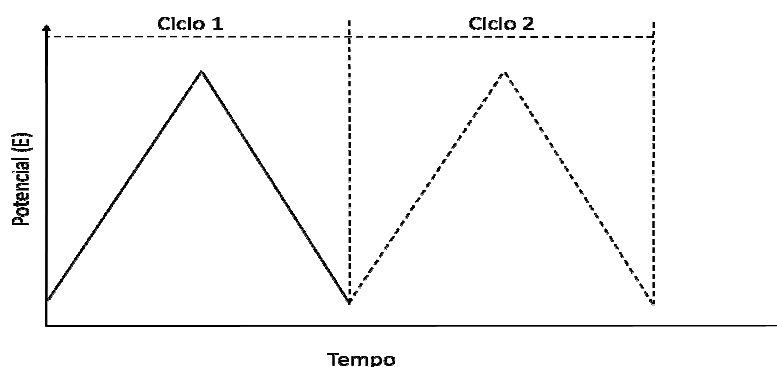


Figura 5: Representação de duas ondas no processo de voltametria cíclica.

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

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

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

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

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

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

1.3.1. MICROBALANÇA ELETROQUÍMICA DE CRISTAL DE QUARTZO (MECQ)

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

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

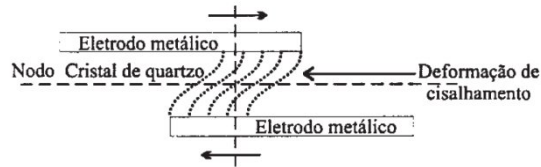


Figura 6 : Desenho esquemático de um cristal, mostrando o nodo da onda acústica passando pelo centro do disco e a deformação causada pelo cisalhamento

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

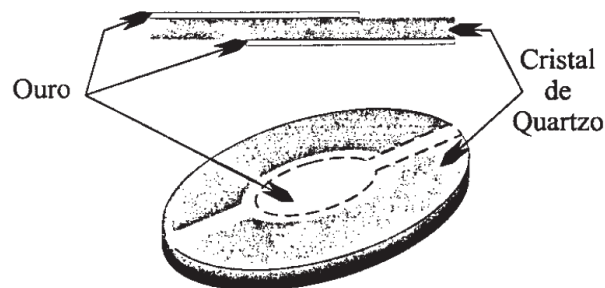


Figura 7: Desenho esquemático da vista superior e lateral de um cristal de quartzo com depósitos metálicos em ambos os lados.

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

$$f = \frac{v}{2d} \quad (1)$$

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

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

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

1.3.2. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA (EIE)

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

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

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

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

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

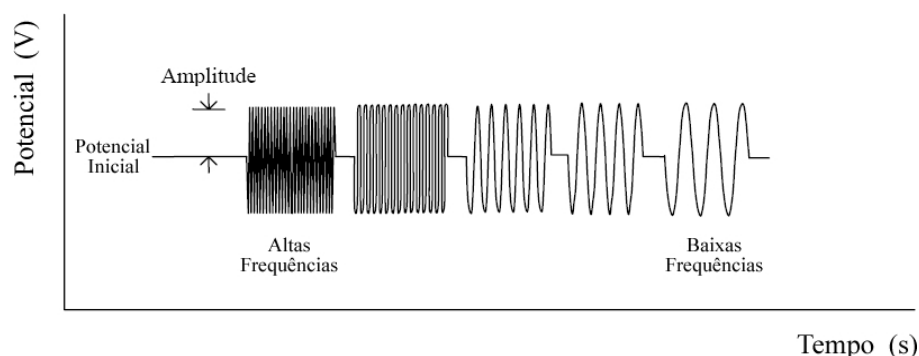


Figura 8: Diagrama da onda de potencial aplicada em função do tempo para realização das medidas de EIS a potencial constante.

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

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

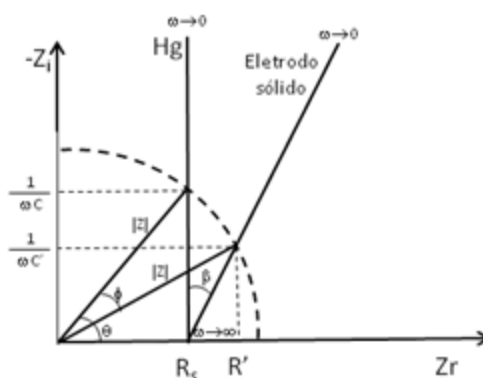


Figura 9: Dispersão de frequências de Z_i e Z_r envolvendo uma superfície eletródica.

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

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

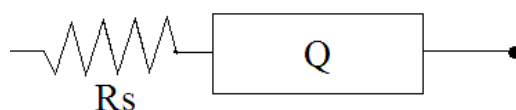


Figura 10: Circuito equivalente da interface eletrodo-solução.

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

1.4. BIOSSENSORES

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

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

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

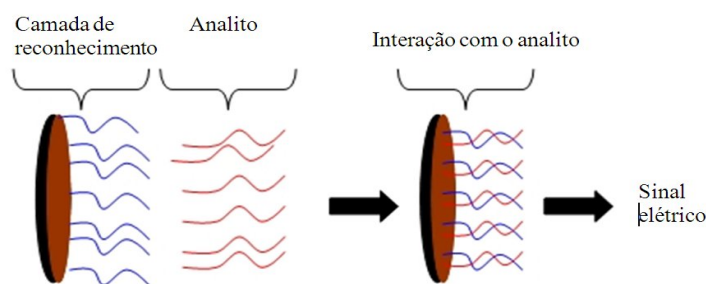


Figura 11: Esquema representativo de um biossensor.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.4.1. FORMAS DE INCORPORAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

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

1.4.1.1 Adsorção física.

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