

condutora) pode ser obtida para o polímero. Blendas condutoras de um polímero condutor com um polímero convencional, cujas condutividades podem ser ajustadas pela variação relativa das proporções de cada polímero, podem ser feitas³. Isto permite a otimização das melhores propriedades de cada tipo de polímero. Os PC mostram quase nenhuma condutividade no estado neutro (não-carregado). A condutividade intrínseca é produzida a partir da formação de cargas transportadoras mediante oxidantes (dopagem tipo p) ou redutores (dopagem tipo n) através da estrutura conjugada ao longo da cadeia polimérica. A oxidação do polímero neutro provoca a geração de estados eletrônicos localizados e os chamados pólarons são formados. Se agora um elétron adicional é removido, a espécie energeticamente mais favorável de se formar é um bipólaron, tanto quanto de dois pólarons¹¹. No entanto, é importante notar que antes da formação do bipólaron, a cadeia inteira dos PC deve tornar-se primeiramente saturada com pólarons^{11,12}.

Além da grande mudança na condutividade, a inserção de cargas (dopagem) nos PC pode dar origem a outros fenômenos interessantes que podem ser utilizados em diversas aplicações. A mudança das estruturas das bandas eletrônicas nos PC é acompanhada por mudanças nas propriedades ópticas no UV-Vis e região de NIR. Isto é usado em visores eletrocromicos e sensores ópticos. Além do mais, a eletroluminescência de alguns PC é utilizada em OLEDs, enquanto que a fotoluminescência pode ser usada em sensores de fluorescência. A incorporação de íons leva a compensação de cargas ao longo da cadeia polimérica gerando o processo de dopagem. Esta propriedade é utilizada em membranas de troca-iônica e pode ser ajustada utilizando diferentes contra-íons. Filmes sintetizados na presença de grandes anions imóveis possuem propriedades de troca catiônica, enquanto que o uso de pequenos anions móveis leva a filmes com propriedades de troca aniônica. O inchamento dos PC devido à oxidação pode ser usado em músculos artificiais¹⁰.

A dopagem dos PC pode ser realizada tanto química quanto eletroquimicamente. Na dopagem química, a oxidação é acompanhada pela exposição do polímero condutor a vapores oxidantes como o iodo^{3,10}. Outro exclusivo processo químico é a dopagem da polianilina (PANI) devido à protonação. Isto leva a uma reação redox interna, convertendo a forma semicondutora da PANI (base emeraldina) para a forma "metálica" (sal emeraldina). As reações entre as diferentes formas de PANI^{10,13} são mostradas na Figura 3.

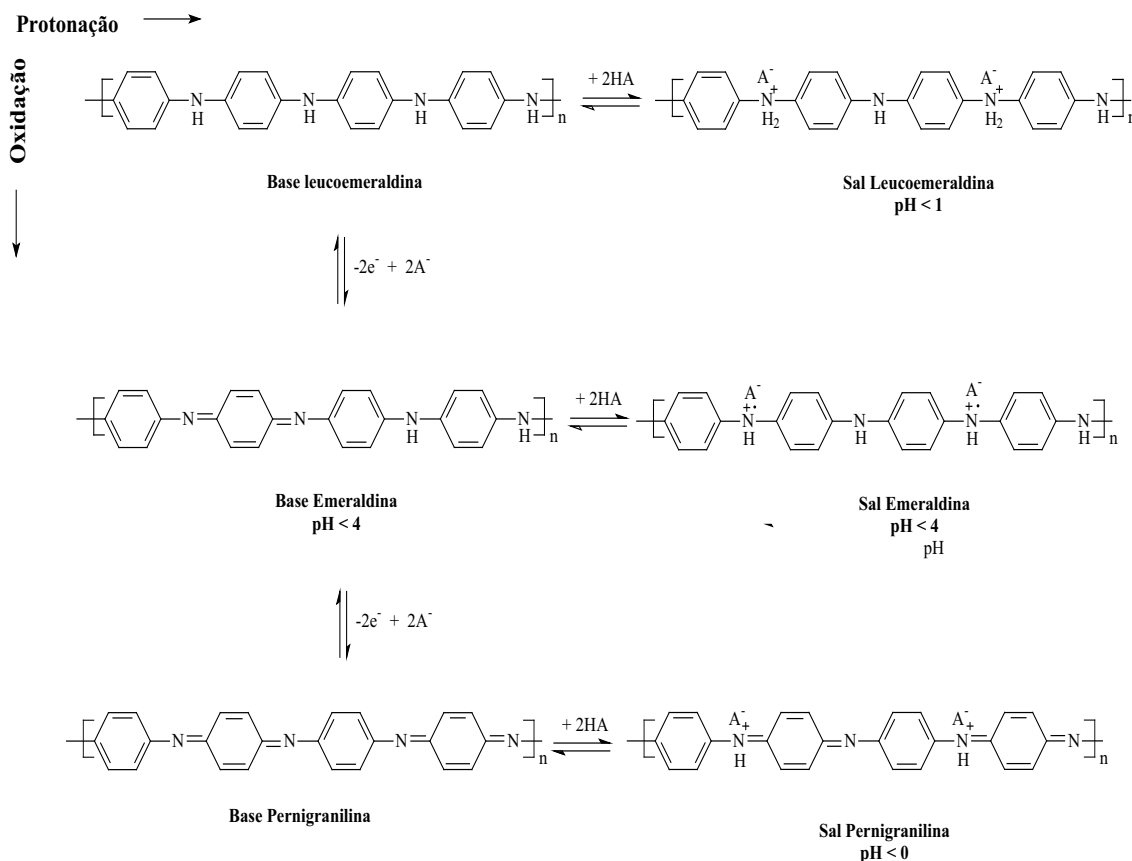


Figura 3: Conversão entre os diferentes estágios da PANI¹⁰.

O processo de dopagem química é eficiente, mas pouco reprodutível quantitativamente. A dopagem eletroquímica por sua vez, promove um ajuste fino no nível de dopagem através do controle do potencial elétrico. Os polímeros podem ser sintetizados, quer por adição de um agente externo (esta abordagem é muitas vezes referida como "síntese química" do PC) ou por reação eletroquímica. A síntese química dos PC é normalmente realizada por oxidantes, tais como: pirossulfato de amônio ((NH₄)₂S₂O₇) ou cloreto férrico (FeCl₃), sendo comumente usada para a preparação de soluções de PC, enquanto deposição eletroquímica é utilizada principalmente para a deposição de filmes de PC sobre substratos condutores. Uma vantagem deste último método é a possibilidade de controlar a espessura do filme pela quantidade de carga passada pelo sistema eletroquímico durante o crescimento do filme, permitindo a realização do processo de geração do polímero a temperatura e pressão ambiente. Outras técnicas para deposição de filmes finos sobre substratos são: "*spin coating*" por uma solução de um PC sintetizado quimicamente; a deposição de uma ou mais camadas

por técnicas Langmuir-Blodgett^a; revestimento de substratos por bicamadas, e polímeros de cargas opostas pela técnica de camada por camada^{3,10,11}.



Desde a descoberta inicial em 1977¹⁴⁻¹⁶, que poliacetileno, agora comumente conhecido como o protótipo dos polímeros condutores, poderia ser dopado, tanto química quanto eletroquimicamente, para um estado metálico. O desenvolvimento no campo dos polímeros condutores está continuamente acelerado, tendo sido descobertas uma variedade de outros polímeros condutores e seus derivados^{1,17}. Esta rápida taxa de crescimento tem estimulado a interdisciplinaridade de investigações nas áreas de Química, Eletroquímica, Bioquímica, Física Experimental e Teórica, e Engenharia Eletrônica e Elétrica e para importantes aplicações tecnológicas destes materiais^{3,10,18-20}.

1.1.2 – Eletropolimerização

A obtenção dos polímeros condutores, com exceção do poliacetileno, é bastante simples, sendo o método eletroquímico o mais relatado¹⁷. Como exemplo, temos o mecanismo de eletropolimerização para heterociclos de cinco membros. O mecanismo de polimerização mais aceito propõe a formação de um cátion-radical do monômero, seguida do acoplamento de dois cátions radicais, com desprotonação e reconstituição do sistema aromático^{17,21}, conforme pode ser observado na Figura 4. A reação continua com acoplamento de cátions radicais do monômero e cátions radicais dos oligômeros que se formam.

A estabilidade do cátion radical do monômero é o fator determinante para obtenção de um polímero com elevado grau de conjugação. Um cátion radical muito estável pode difundir do eletrodo dando origem a oligômeros solúveis, enquanto que um muito reativo pode sofrer reações colaterais. As propriedades elétricas e físico-químicas do material eletrossintetizado dependem fortemente das condições de síntese, tais como: concentração do monômero, natureza do meio eletrolítico, temperatura, etc^{17,22,23}.

Os polímeros condutores podem também ser obtidos por síntese química²⁴. Neste caso, um agente oxidante é introduzido no meio reacional provocando a formação do cátion radical. A princípio, o requisito básico para a espécie ser utilizada como oxidante é possuir um potencial de redução suficiente para a oxidação do monômero.

^a Técnica de nanofabricação usada para criar películas extremamente finas (monocamadas ou camadas moleculares isoladas) as quais são conhecidas como filmes de Langmuir-Blodgett.

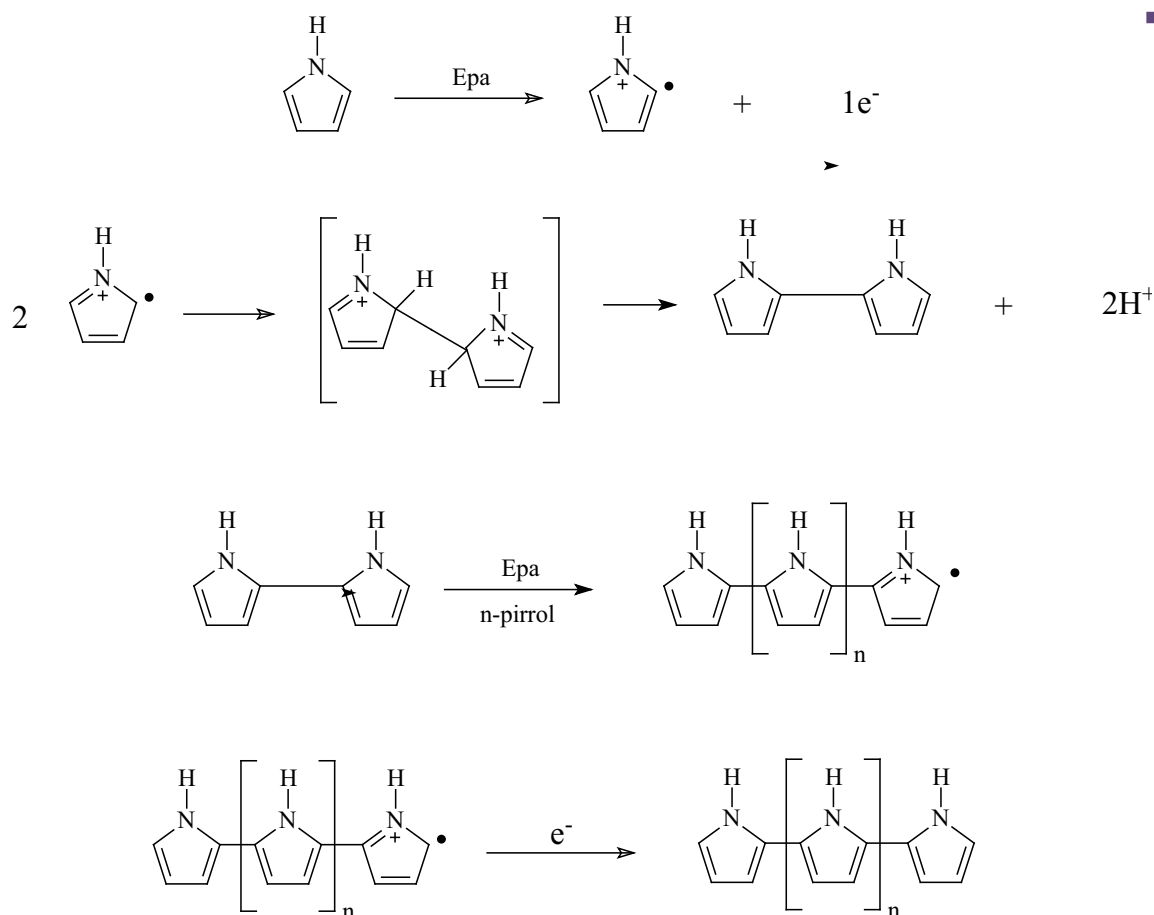


Figura 4: Mecanismo de eletropolimerização para heterociclos de cinco membros²¹.

Enquanto a maioria dos condutores orgânicos produzidos comercialmente são preparados por polimerização química²⁵, muitos monômeros podem ser eletropolimerizados diretamente sobre um metal ou de eletrodos semicondutores²⁶, permitindo, assim, uma caracterização *in situ* dos filmes poliméricos por métodos eletroquímicos e espectroscópicos²⁷.

Observações simultâneas da reação redox por outros métodos, juntamente com medidas eletroquímicas, são importantes para a verdadeira compreensão dos acontecimentos eletroquímicos. Recentemente, diversos métodos analíticos têm sido associados com medidas eletroquímicas, de modo a obter múltiplas informações simultaneamente²⁸.

É bem conhecido que as propriedades de polímeros condutores dependem de suas características estruturais. Portanto, muitos esforços têm sido feitos na síntese de novos monômeros e polímeros, com o objetivo de se obter materiais com características ajustáveis para aplicações em Eletroquímica e outras áreas²⁹⁻³¹. Polimerização eletro-oxidativa de novos monômeros com concomitante deposição de filmes poliméricos tem

sido considerados como uma rota efetiva e versátil para a modificação de superfície de um eletrodo por compostos poliméricos orgânicos³².

1.1.3 – Aplicação dos polímeros condutores

Inúmeras aplicações tecnológicas têm sido propostas e desenvolvidas para polímeros condutores baseando-se, principalmente²:

- i. Na condutividade do polímero condutor puro ou de uma blenda do polímero condutor com um polímero convencional (aplicação em diodos emissores de luz³³⁻³⁸, filmes para dissipação de carga estática^{39,40});
- ii. Nas propriedades eletroquímicas de oxi-redução do polímero (janelas eletrocromicas^{41,42}, capacitores^{24,43}, dispositivos para armazenamento de energia^{44,45}, músculos artificiais⁴⁶);
- iii. Na formação de estados excitados no polímero (componente de dispositivos para óptica não-linear⁴⁷⁻⁴⁹);
- iv. Na morfologia/microestrutura do polímero (sensores químicos^{10,18,19,50-52}, catálise⁵³⁻⁵⁶).

A Figura 5 ilustra algumas aplicações conhecidas e outras propostas para os polímeros condutores, em função das suas propriedades²⁴.

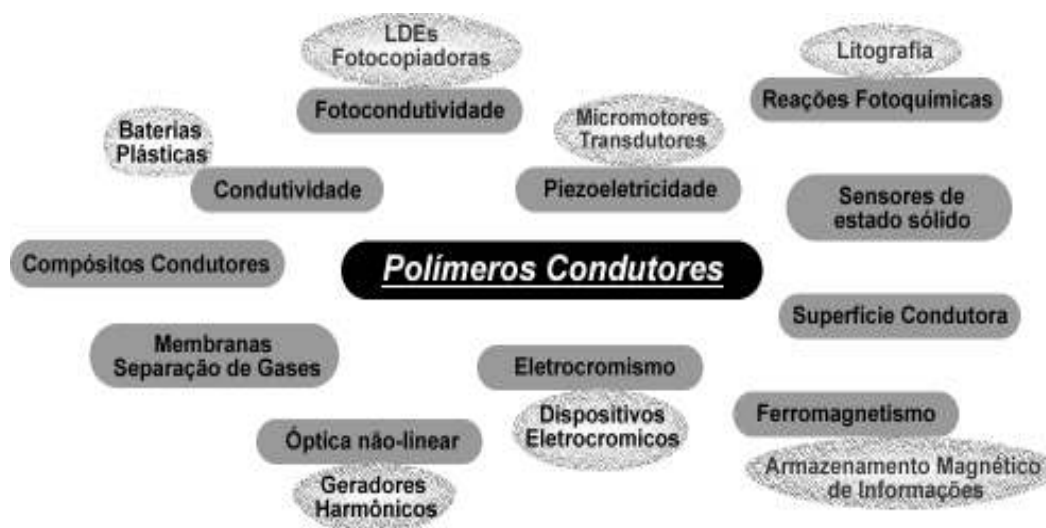


Figura 5: Esquema mostrando várias aplicações conhecidas e propostas para polímeros condutores, em função das suas propriedades²⁴.

Todavia, as propriedades destes polímeros são fortemente dependentes de sua microestrutura e morfologia, as quais estão relacionadas à presença de defeitos e reticulações, entre outros fatores, sendo determinadas pelo método de síntese, contrações e outras variáveis difíceis de serem controladas simultaneamente. Um dos maiores desafios para melhorar e garantir a performance destes materiais consiste, por conseguinte, na busca de polímeros com maior homogeneidade, estabilidade, baixa concentração de defeitos, maior organização entre as cadeias, reprodutibilidade e maiores valores de condutividade²⁴.

Modificações com camadas poliméricas são usadas para desempenhar um papel importante, especialmente na impressão, revestimento, embalagens de produtos alimentares, aplicações biomédicas e aeroespaciais.

1.1.4 – Mecanismo de condutividade

O mecanismo através do qual os polímeros conduzem eletricidade tem sido apresentado detalhadamente na literatura^{11,57}. A consideração mais importante do ponto de vista químico considera que “um aumento da condutividade eletrônica é obtido quando são preparados polímeros com maior ordenamento molecular e supramolecular”^{11,57-59}.

Polímeros mais ordenados molecularmente contêm poucos defeitos que interrompem a conjugação da cadeia polimérica, como por exemplo, carbonos com hibridação sp^3 . Em polímeros com elevada ordem supramolecular, as cadeias são ordenadas através de estiramentos e/ou cristalização. Com base nestas considerações, condutividades de até 10^5 S cm^{-1} foram determinadas para o poliacetileno altamente ordenado⁶⁰, aproximando-se, portanto, da condutividade do cobre à temperatura ambiente. Infelizmente, as formas “dopadas” do poliacetileno são tão reativas que impossibilitam a sua utilização na maioria das aplicações propostas para polímeros condutores⁶¹.

1.1.5 – Eletrodos modificados com polímeros

A modificação da superfície do eletrodo com polímeros ocorre com muitas monocamadas de espécies ativas. Tipicamente, os polímeros empregados apresentam sítios quimicamente e/ou eletroquimicamente ativos e respostas eletroquímicas maiores

e mais fáceis são obtidas quando maior quantidade de camadas é colocada na superfície do eletrodo. Vários métodos são usados para preparar eletrodos recobertos com filmes poliméricos^{19,62-64}:

1. **Cobertura por banho:** quando um eletrodo é mantido em solução do polímero, na qual o polímero é depositado por adsorção.
2. **Evaporação:** um pequeno volume da solução polimérica é colocado sobre a superfície do eletrodo e evapora-se o solvente. O eletrodo é usado em um eletrólito ou solvente onde o polímero seja insolúvel.
3. **Deposição oxidativa ou redutiva:** depende da solubilidade do polímero no estado iônico. O polímero oxidado (ou reduzido) em um solvente resulta em uma forma insolúvel que precipita na superfície do eletrodo.
4. **Cobertura e rotação:** o eletrodo é mantido girando após uma gota de solução polimérica ter sido colocada na sua superfície.
5. **Eletropolimerização:** os produtos da reação no eletrodo são poliméricos e insolúveis no solvente usado. A eletropolimerização de vários compostos monoméricos substituídos pode proporcionar ao eletrodo propriedades elétricas e analíticas interessantes.
6. **Polimerização por métodos não eletroquímicos:** polimerização ativada por plasma, foto-induzida por UV ou polimerização de organossilanos.

Embora as respostas eletroquímicas dos eletrodos modificados por polímeros sejam mais fáceis de detectar do que aquelas dos eletrodos modificados por monocamadas, elas também são complicadas pela sobreposição de processos como transporte e transferência de carga, movimento de contra-íons para dentro e fora do polímero, movimento do filme polimérico e inchaço com o solvente e difusão do analito no filme. Estes processos foram estudados para melhorar a interpretação da resposta voltamétrica⁶⁵. Apesar destes fatos, a modificação polimérica do eletrodo permanece um procedimento conveniente e simples para melhorar o desempenho de eletrodos apresentando uma infinidade de aplicações¹⁹.

Um fator importante e decisivo para atender à preparação de filmes poliméricos finos é ter estabilidade suficiente a longo prazo em diferentes ambientes⁶⁶. Neste contexto, o conhecimento da estrutura e resposta eletroquímica, mecanismo de

deposição, e cinética associadas a estas transições, dos polímeros baseados em metais, serão extremamente importantes nas aplicações práticas em reações eletrocatalíticas⁶⁷.

Além disso, plásticos, cerâmicas e demais tipos de materiais podem ser revestidos com estes polímeros, e esta modificação pode ser utilizada para a construção das chamadas placas de circuitos impressos, as quais apresentam diversas vantagens na aplicação em sistemas eletroquímicos miniaturizados^{20,68}.

1.2 – Polímeros aplicados em sensores

Durante os últimos 20 anos, a pesquisa e desenvolvimento global no campo de sensores têm expandido exponencialmente em termos de investimento financeiro, publicações na literatura e número de pesquisadores ativos. É bem conhecido que a função de um sensor é fornecer informações em nosso ambiente físico, químico e biológico¹⁸.

A legislação estimulou uma enorme demanda por sensores voltados para monitoramento ambiental, por exemplo, monitoramento de gases tóxicos e vapores em locais de trabalho ou contaminantes em águas naturais por efluentes industriais ou por agrotóxicos oriundos da agricultura. É esperado um grande avanço nesta área, dando origem a um grande número de sensores para aplicações em controle ambiental, bem como em controle de alimentos e tecnologia médica.

O elevado potencial de aplicação destes PC em sensores químicos e biológicos é uma das principais razões para intensiva investigação e desenvolvimento desses materiais.

Um sensor químico fornece informações sobre o seu ambiente e consiste de um transdutor físico e uma camada seletiva quimicamente^{69,70}. As modificações de superfícies sólidas são muitas vezes utilizadas para alterar propriedades como biocompatibilidade, umidade, aderência e de fricção⁶⁶.

Nas três últimas décadas, a síntese de novos polímeros conjugados manteve-se como tema de interesse, tanto do ponto de vista acadêmico quanto do industrial⁷¹⁻⁷³.

A preparação e propriedades dos eletrodos revestidos com filmes redox de materiais poliméricos têm sido assunto de investigações recentes^{28,74}. Vantagens oferecidas por esses sistemas sobre monocamadas ligadas diretamente e quimicamente incluem a fácil preparação, estabilidade, maiores sinais para caracterização mais simples e completa cobertura superficial²⁸. O grande impulso para o design e estudo de eletrodos

modificados com polímeros é justificado pela necessidade de desenvolver novas áreas em Eletroquímica e Novos Materiais para catálise, eletrocatalise, fotoeletroquímica, eletrônica, e fotoeletrônica⁷⁵.

Polímeros eletrocondutores, sob a forma de filmes finos depositados na superfície do eletrodo representam materiais promissores para aplicações em eletrocatalise^{67,68}, sensores⁷⁶, quimio e biossensores^{10,18,20,77}, transistores de efeito de campo⁷⁸, materiais biologicamente ativos^{79,80}, separação membranas e biomembranas⁸¹, baterias⁸²⁻⁸⁴, supercapacitores⁸⁵⁻⁸⁷, elementos micro e nanoeletrônicos⁸⁸, visores, espelhos, janelas⁸⁹, díodos emissores de luz⁹⁰⁻⁹², dispositivos fotovoltaicos⁹³, dispositivos eletrocromáticos^{94,95} e camadas protetoras⁹⁶⁻⁹⁸. Uma tendência recente nesta área é o uso de polímeros condutores básicos (PPI, PANI, PTF, etc.) funcionalizados com vários grupamentos⁹⁹⁻¹⁰¹.

Durante os últimos 25 anos o polímero condutor mais largamente utilizado foi a polianilina, devido a sua aplicação potencial em baterias recarregáveis, dispositivos eletrocromáticos, aparelhos de display, super capacitores, recobrimento anti-estático, biossensores, etc^{102,103}. De acordo com a literatura^{104,105} a oxidação anódica da anilina leva a dímeros, por acoplamentos cabeça-cauda, cabeça-cabeça, cauda-cauda, tanto quanto a produtos poliméricos, com a participação de cátions radicais eletrogerados. Entretanto, o estudo deste polímero é mais complexo devido à existência de duas formas redox diferentes, com a possibilidade de reações de protonação e/ou oxidação, as quais permitem a passagem de uma forma a outra. Por outro lado, o principal objetivo da pesquisa básica no sistema da polianilina tem sido investigar as propriedades de polianilinas substituídas^{32,106-110}.

Entre outras, a classe de monômeros funcionais como os aminofenóis tem sido estudada na produção de filmes poliméricos. Ao contrário do fenol¹¹¹, anilina¹¹², e outras anilinas substituídas¹¹³, eles apresentam dois grupos funcionais (NH₂ e OH) que podem ser oxidados. Portanto eles podem apresentar comportamento eletroquímico semelhante ao das anilinas¹¹²⁻¹¹⁴ e fenóis^{111,115}.

Poliaminofenóis são formados pela polimerização de aminofenóis em meio ácido, neutro ou básico^{116,117}. Na polimerização de aminofenóis, a posição relativa dos grupos amino e hidroxila são importantes, pois em cada uma das três estruturas orto, meta e para, estas apresentam propriedades diferentes como potenciais de oxidação e estabilização do cátion radical formado. O monômero em posição meta possui menos formas de ressonância que seus respectivos isômeros em posição orto e para. Isto faz

com que ele apresente um potencial de oxidação mais anódico. As posições ainda definem o tipo de estrutura que será formada durante o processo de eletropolimerização. Enquanto, a posição orto no aminofenol promove a formação de uma estrutura linear a posição meta promove a formação de uma estrutura não-linear¹¹⁸.

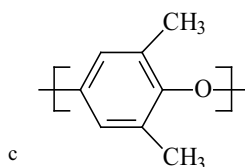
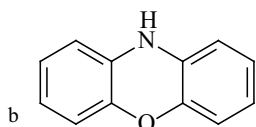
O *p*-aminofenol é um composto bem conhecido que, na sua forma simples, ou derivado¹¹⁹, foi utilizado como agente redox em fotografia. Em meio neutro, este é oxidado para complexos de corantes oligômeros que podem ser utilizados em ensaios enzimáticos¹²⁰.

Normalmente, a oxidação eletroquímica de *o*-aminofenol é melhor realizada em meio ácido e aquoso. Eletropolimerização de *o*-aminofenol em meio ácido é análoga ao mecanismo de anilina¹¹². A estrutura do filme de poli(*o*-aminofenol) é formado por unidades de fenoxazina^{b121,122}. O meio básico afeta o grupo hidroxila pela formação de ligações C-O-C, enquanto os grupos NH₂ são preservadas¹²³. A eletropolimerização da aminofenóis em meio básico leva à formação de polímeros com estrutura de óxido de fenileno^{c 124-126}.

A preparação de filmes poliméricos derivados de éteres alquil-arílicos e fenóis tem sido extensamente estudada pelo grupo LAFIP/NANOTEC^{116,117,127-132}. O interesse nestes monômeros está voltado principalmente para a aplicação em sensores biológicos, uma que vez, quando eletropolimerizado, geralmente os grupos funcionais são preservados, o que facilita a interação com o material biológico a ser imobilizado sobre os eletrodos modificados com estes filmes poliméricos¹²⁸⁻¹³². Unindo-se as propriedades do sensor com a especificidade do material biológico, temos os chamados biossensores.

1.3 – Biossensores

Um biossensor é um dispositivo que contém um material biológico, tal como enzimas, anticorpos/antígenos, DNA, bactérias, tecidos, etc. como agente de



reconhecimento interligado a um transdutor que converta o sinal biológico num sinal físico e/ou químico. Tais dispositivos são importantes ferramentas analíticas, devido ao crescimento no interesse em detecção, diagnóstico e determinação nas áreas de alimentos, controle da qualidade da água, saúde, segurança, e monitoramento ambiental¹³³. Uma gama de configurações destes dispositivos confere grande versatilidade no desenvolvimento dos biossensores, que podem ter aplicações diversas, dependendo das características do elemento biológico e do transdutor utilizado.

Os biossensores podem ser divididos basicamente em duas classes: os catalíticos, que utilizam enzimas imobilizadas e os de afinidade, que utilizam anticorpos, DNA ou peptídeos, como moléculas de bio-reconhecimento^{134,135}.

Os mecanismos de transdução mais comumente utilizados são apresentados na Tabela 1. O tipo de transdução de sinal esta diretamente relacionada à característica física ou química do produto gerado pelo componente biológico^{135,136}.

Tabela 1: Principais sistemas de transdução de sinal físico-químico.

Sistema de transdução	Medida
Eletroquímico	Amperometria
	Potenciometria
Elétrico	Condutividade
Óptico	Luminescência
	Fluorescência
	Índice de refração
Térmico	Calorimetria
Piezelétrico Massa	Microbalança de cristal de quartzo
	Ondas acústicas de superfície

O objetivo de qualquer metodologia de imobilização é reter a máxima atividade da biomolécula na superfície do transdutor, deste modo, a imobilização dos componentes de reconhecimento sobre a superfície modificada representa o fator determinante para o bom funcionamento do biossensor. Analisando os fatores que influenciam as biomoléculas, como as condições do meio ou o procedimento de imobilização, é possível definir a técnica que possui as condições mais adequadas ao sistema em estudo^{137,138}.

1.3.1 – Técnicas de imobilização

As técnicas de imobilização de biomoléculas, assim como as de imobilização de mediadores (compostos necessários para assegurar o mecanismo de transferência eletrônica) com maior utilização são as de formação de ligação covalente e adsorção¹³⁸. Outros processos como os de ligação cruzada (*cross-linking*) e oclusão (*entrapment*) também são utilizadas^{139,140}. Podemos destacar como característica de cada procedimento como:

- ✓ **Adsorção física:** baseia-se na formação de forças atrativas de Van der Waals, ligações de hidrogênio e complexos de transição de elétrons entre as biomoléculas e o eletrodo. Este método, não exige qualquer modificação química e possui a vantagem da simplicidade, requerendo apenas uma solução contendo o componente biológico^{141,142}.
- ✓ **Ligação covalente:** esta técnica baseia-se na reação entre grupos funcionais terminais da biomolécula, não essenciais à atividade biológica e grupos reativos da superfície do transdutor, dentre as diversas superfícies pode-se ter um filme polimérico. Embora esta técnica possua a vantagem de dificilmente o componente biológico se desprender da matriz de suporte, é extremamente relevante que durante a utilização, os sítios biológicos sejam preservados. Vários métodos são apontados para a formação da ligação covalente, por exemplo, a formação de ligações via grupos acila, diazônio e tióis^{143,144}.
- ✓ **Oclusão:** esta técnica é utilizada quando o componente biológico é preparado em conjunto com o produto de modificação da superfície do eletrodo, deixando assim as biomoléculas aprisionadas. Um exemplo clássico é a preparação de filmes poliméricos em soluções contendo biomoléculas, onde estas ficam presas dentro da matriz do polímero, durante a polimerização. Poliacrilamida, amido ou nylon, podem ser empregados para aprisionar biomoléculas^{145,146}. Usualmente esta camada de modificação é separada da solução teste por uma membrana semipermeável, de forma a retardar a lixiviação do componente biológico. O processo de interação pode ser puramente físico ou envolver ligações covalentes¹³⁸.
- ✓ **Ligação Cruzada:** baseia-se na imobilização como resultado da reação do componente biológico com um agente bifuncional em que se formam as ligações covalentes intermoleculares^{147,148}. Os reagentes que permitem o uso desta técnica contêm grupos reativos terminais específicos para os grupos funcionais (por

exemplo, aminas) que se encontram nas outras moléculas a imobilizar. A escolha do agente de “crosslinking” é feita, de acordo com os grupos funcionais presentes na biomolécula sendo, no entanto, a escolha final realizada de maneira empírica. Para a maioria das aplicações é necessário manter a estrutura original da proteína, por isso o “crosslinking” é feito em condições pouco agressivas tanto de pH como de tampões. É também importante obter um grau de conjugação entre o agente de “crosslinking” e a proteína, pois em alguns casos (incluindo enzimas em particular) é conveniente que não seja muito elevado de modo a permitir a manutenção da atividade biológica do fixado. A metodologia mais utilizada na aplicação é o mergulhar da superfície de suporte (por exemplo, um eletrodo) numa solução ativa contendo a enzima e o agente bifuncional (por exemplo glutaraldeído, carbodiimida, etc.) de forma a cobrir toda a superfície, esperar que se forme uma película (períodos que variam entre poucos minutos e várias horas, dependendo do agente) seguindo-se períodos de lavagem e secagem da superfície tratada¹³⁸.

A resposta das moléculas imobilizadas depende da área superficial, porosidade, carácter hidrofílico da matriz imobilizada, condições de reação e metodologia escolhida para a imobilização. De uma forma esquemática, as diferentes formas de imobilização, encontram-se representadas na Figura 6.

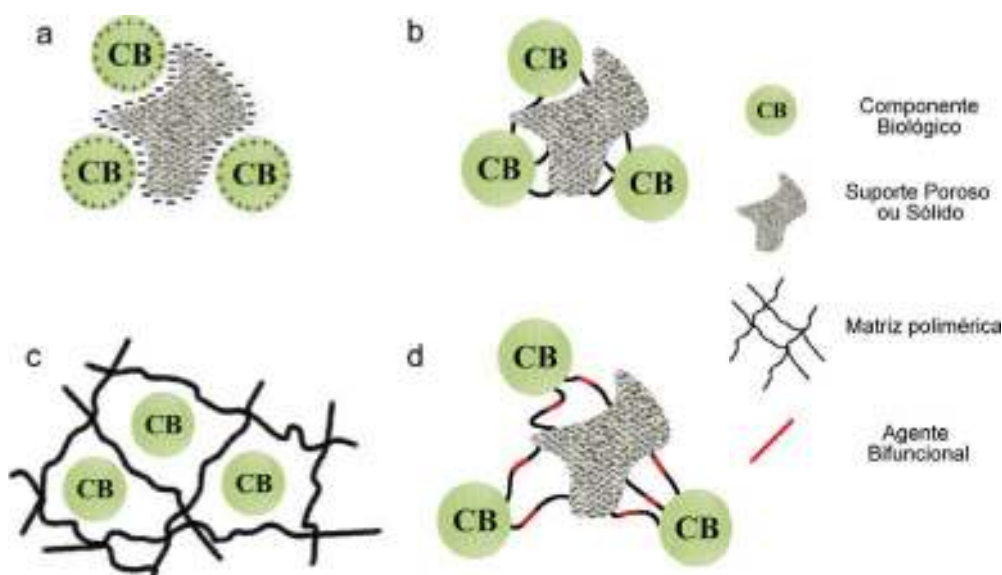


Figura 6: Esquema representativo dos quatro principais métodos de imobilização de biomoléculas. (a) adsorção, (b) ligação covalente, (c) Oclusão (d) ligação cruzada¹³⁸.

A Tabela 2, mostra a comparação das vantagens e desvantagens de cada procedimento de imobilização descrito para as biomoléculas. Observa-se que quando os métodos são comparados, a adsorção destaca-se pela simplicidade e aplicabilidade esperada no processo de imobilização, sendo o procedimento mais simples e de fácil execução. A utilização de superfícies funcionalizadas para incorporação de biomoléculas tem sido amplamente discutida na literatura^{149,150}.

Tabela 2: Comparação dos procedimentos de imobilização de biomoléculas¹³⁷.

Técnicas utilizadas para imobilização de biomoléculas		
Método	Vantagens	Desvantagens
<i>Adsorção^a</i> Van der Waals, ligações iônicas e hidrofóbicas.	Procedimento simples, condições brandas, menos dano à biomolécula.	Interações dependentes do pH, solvente e temperatura, baixa estabilidade.
<i>Oclusão^a</i> Membranas de diálise, polímeros.	Procedimento simples, não há problemas com o meio.	Resistência difusional, pode causar desnaturação da biomolécula causando baixa sensibilidade e limite de detecção.
<i>Ligação Cruzada^b</i> Glutaraldeído, bis-diazobenzidina, cloreto cianúrico.	Procedimento simples, ligações químicas fortes.	Dificuldade em controlar a reação, grande quantidade de biomolécula, baixa sensibilidade.
<i>Ligação covalente^b</i> Sobre membranas ou matrizes insolúveis.	Estável complexo matriz e biomolécula. Ligação entre grupos específicos biomolécula e matriz. Ideal para produção em massa e comercialização.	Complicado e elevado tempo de produção. Possibilidade de perda de atividade devido a reações envolvendo grupos essenciais da atividade biológica.

Processos físicos^a e químicos^b.

1.3.2 – Classificação dos biossensores

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o tipo de biomolécula imobilizada sobre o transdutor. Desta forma, são dadas as seguintes denominações para: Genossensores aos biossensores contendo oligonucleotídeos, produtos de PCR ou fragmentos de DNA; Biossensores enzimáticos: onde o componente biológico é uma enzima; Imunossensores aos biossensores contendo um antígeno ou anticorpo imobilizado, e Biossensores Microbiológicos, onde o componente biológico é representado por fungos, bactérias organelas vegetais e animais dentre outras.

O princípio de funcionamento de cada biossensor pode ser entendido como:

- ✓ **Biossensores Enzimáticos:** baseiam-se na imobilização de enzimas, tendo seu princípio de funcionamento baseado na atividade específica sobre um composto (substrato) ou uma determinada classe de compostos. O funcionamento desses biossensores, pode também envolver a inibição da enzima, pelos referidos compostos, afetando a quantidade de substrato consumido ou produto gerado, ou pelo monitoramento direto da espécie eletroativa gerada/consumida na catálise enzimática^{135,151}.
- ✓ **Biossensores Microbiológicos:** consiste na imobilização de células microbiológicas sobre o transdutor. O princípio de operação destes biossensores é baseado no uso das funções metabólicas e respiratórias do microorganismo para detectar um analito que seja o substrato ou um inibidor destes processos. Lei e colaboradores¹⁵², reportaram numa revisão sobre o assunto, algumas das recentes aplicações dos biossensores microbiológicos no monitoramento ambiental e para o uso em alimentos, fermentação e campos similares.
- ✓ **Genossensores** baseiam-se na imobilização de fragmentos de DNA ou oligonucleotídeos. A chamada simples fita (ssDNA), após interação com alvo complementar regenera a dupla fita (dsDNA), num processo denominado de hibridização. Este sinal pode ser detectado por meio de intercaladores como brometo de etídio, azul de metileno dentre outros compostos a base de cobalto e rutênio, para redução dos potenciais de oxidação¹⁵³⁻¹⁵⁷.

- ✓ **Imunossensores:** baseiam-se no uso de um anticorpo que reage especificamente com uma substância (antígeno) a ser testada. A imobilização do receptor (i.e., antígeno) sobre um substrato é conveniente para aplicações de reconhecimento biomolecular para detecção da molécula alvo (i.e., anticorpo) presente na solução. A especificidade da interação antígeno-anticorpo permite o desenvolvimento de imunossensores para diagnósticos clínicos, monitoramento ambiental, dentre outros¹³⁵.

1.4 – Biossensores aplicados ao diagnóstico de doenças infectocontagiosas

Em revisão recente, Goulart e colaboradores¹⁵⁸ apresentaram comparações entre metodologias de detecção convencional e com os biossensores obtidos a partir de peptídeos sintéticos, imobilizados sobre a superfície de eletrodos de grafite modificados com filmes poliméricos. O potencial de aplicação foi verificado para três doenças utilizadas como modelo (dengue, hanseníase e leishmaniose).

Outros trabalhos do grupo LAFIP/NANOTEC^d que utilizam fragmentos específicos de DNA, como os trabalhos diagnóstico da Dengue¹³⁰; para o diagnóstico da hanseníase^{137,159}; e para diagnóstico do câncer de próstata¹⁶⁰, estão reportados na literatura e demonstram o potencial de aplicação destas biomoléculas quando imobilizadas sobre superfícies funcionalizadas com filmes poliméricos.

Baseado nestes estudos, no presente trabalho destacou-se a utilização e construção de dois tipos de sensores biológicos os genossensores e imunossensores. Estes dispositivos foram construídos sobre plataformas funcionalizadas de filmes poliméricos, derivados do 4-HBA. Para melhor compreensão do mecanismo de funcionamento realizou-se uma abordagem mais específica e completa sobre cada biossensor.

1.5 – Genossensores

Os genossensores, conforme já definidos, são comumente conhecidos como biossensores de DNA. Estes dispositivos altamente seletivos resultam das propriedades específicas de interação das bases nitrogenadas presentes na molécula de DNA.

^d Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia – LAFIP/NANOTEC – IQ-UFU.

1.5.1 – Estrutura e propriedades da molécula de DNA

O ácido desoxirribonucléico (DNA ou ADN) é uma molécula longa, formada pela junção de um grande número de nucleotídeos, contendo a informação genética codificada. O DNA, encontrado no núcleo de toda célula humana. Ela constitui uma espécie de código que determina o que uma célula tem^{161,162}.

As informações no DNA: *i)* orientam a célula (junto com o RNA) na fabricação de novas proteínas que determinam todos os nossos traços biológicos; *ii)* passam (são copiados) de uma geração para outra.

Embora possa parecer complicado, o DNA é constituído por um padrão de quatro partes diferentes, chamadas nucleotídeos. Cada nucleotídeo consiste de um açúcar (desoxirribose) ligado de um lado em um grupo de fosfato e do outro lado a uma base nitrogenada. A Figura 7 mostra a estrutura básica de um nucleotídeo.

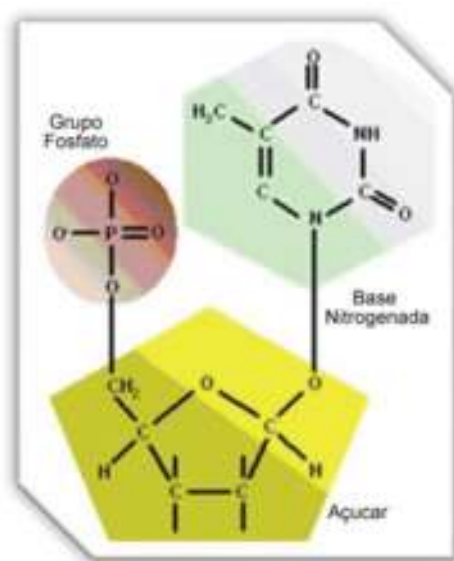


Figura 7: Fórmula estrutural de um nucleotídeo.

Existem duas classes de bases nitrogenadas: as chamadas purinas (estruturas com dois anéis) e as pirimidinas (estruturas com um anel). As quatro bases existentes no DNA são mostradas na Figura 8, sendo que a uracila está presente somente na estrutura do RNA.

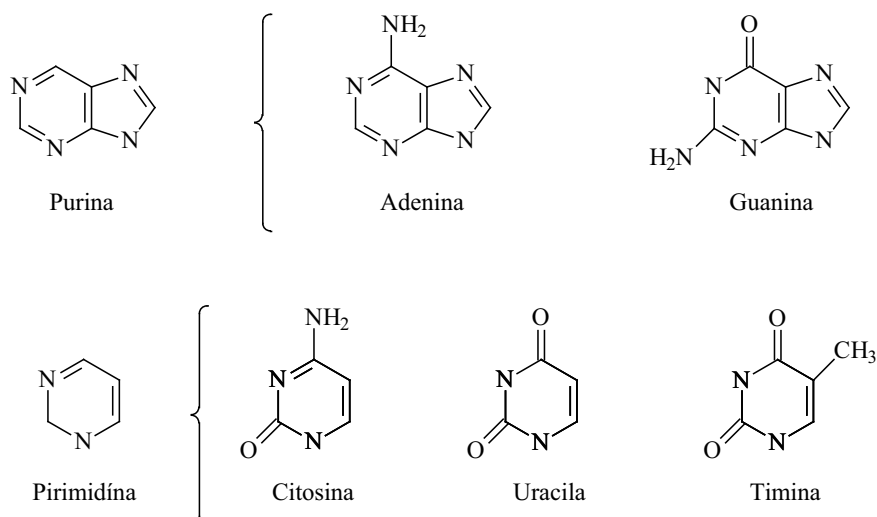


Figura 8: Bases nitrogenadas presentes na estrutura do DNA.

A orientação das ligações entre as três moléculas constituintes dos nucleotídeos é essencial para se determinar o sentido da dupla fita de DNA. A ligação entre a base nitrogenada e a pentose é feita covalentemente através de uma ligação N-glicosídica com a hidroxila ligada ao carbono-1 da pentose. A ligação entre o grupo fosfato e a pentose. Esta ligação é feita através de uma ligação fosfoéster com a hidroxila ligada ao carbono-5 da pentose^{161,162}, conforme pode ser observado na Figura 9.

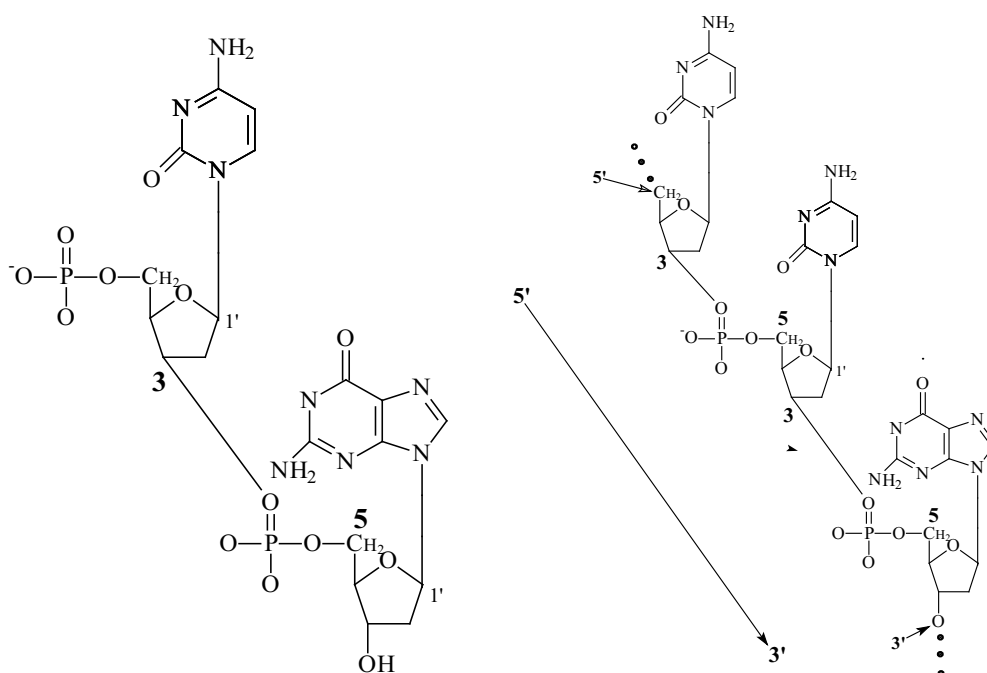


Figura 9: (A) Ligação fosfodiéster entre dois nucleotídeos e (B) crescimento da cadeia de DNA.

Para a formação da molécula de DNA é necessário que ocorra a ligação entre os nucleotídeos. Os nucleotídeos estão ligados covalentemente por ligações fosfodiéster formando entre si pontes de fosfato. O grupo hidroxila do carbono-3 da pentose de um nucleotídeo se liga ao grupo fosfato ligado à hidroxila do carbono-5 da pentose de outro nucleotídeo através de uma ligação fosfodiéster^{161,162}, conforme ilustrado na Figura 9-A.

Devido a esta formação, a cadeia de DNA fica com uma direção determinada, isto é, em uma extremidade temos livre a hidroxila do carbono-5 da primeira pentose e na outra temos livre a hidroxila do carbono-3 da última pentose. Isto determina que o crescimento do DNA se faça na direção de 5' para 3', conforme mostrado na Figura 9-B.

James Watson e Francis Crick¹⁶³ postularam um modelo tridimensional para a estrutura do DNA baseando-se em estudos de difração de raio-X, sendo indubitavelmente umas das maiores conquistas científicas da segunda metade do século XX. O DNA consiste de duas cadeias helicoidais de nucleotídeos, enroladas ao longo de um mesmo eixo, formando uma dupla hélice de sentido rotacional à direita. Ainda com base nestes estudos, concluiu-se que na dupla hélice, as duas fitas de DNA estão em direções opostas, isto significa que são antiparalelas. O termo antiparalelas deve-se ao fato de que uma das fitas tem a direção exata da sua síntese (5'---3') enquanto que a outra está invertida (3'----5'). A Figura 10, mostra as estruturas do DNA.

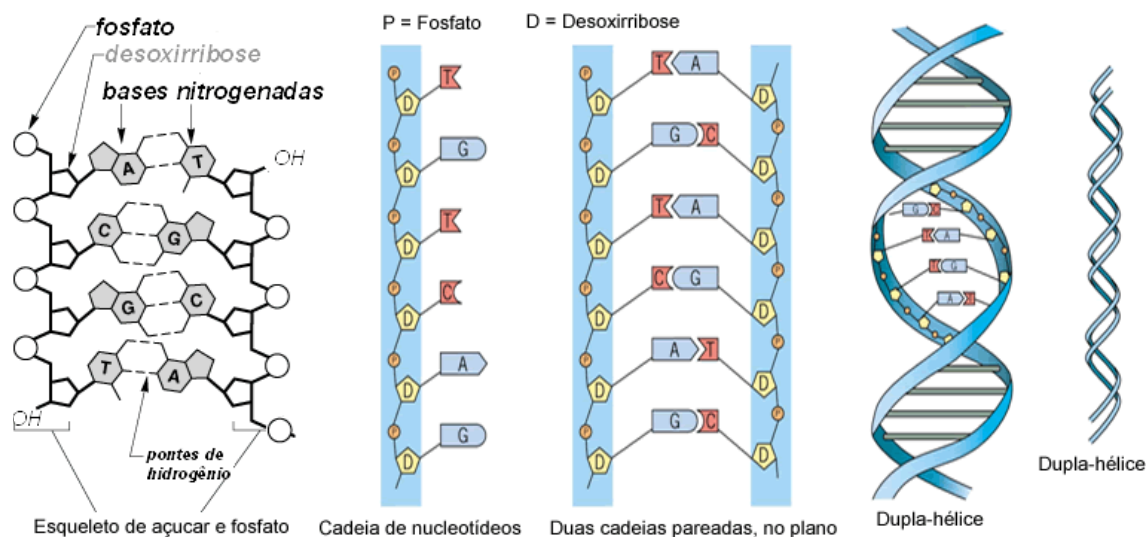


Figura 10: Esquemas da molécula de DNA no plano e retorcida.

Com base na estrutura de dupla hélice do DNA e nas características de hidrofobicidade das moléculas, a estrutura do DNA fica da seguinte forma:

- ✓ O grupo fosfato e o açúcar (parte hidrofílica) - estão localizados na parte externa da molécula.
- ✓ As bases nitrogenadas (parte hidrofóbica) - estão localizadas na parte interna da molécula.

A relação espacial entre as duas fitas cria um sulco principal e um sulco secundário (Figura 11). O pareamento das bases de cada fita se dá de maneira padronizada, sempre uma purina com uma pirimidina, especificamente: adenina com timina e citosina com guanina.

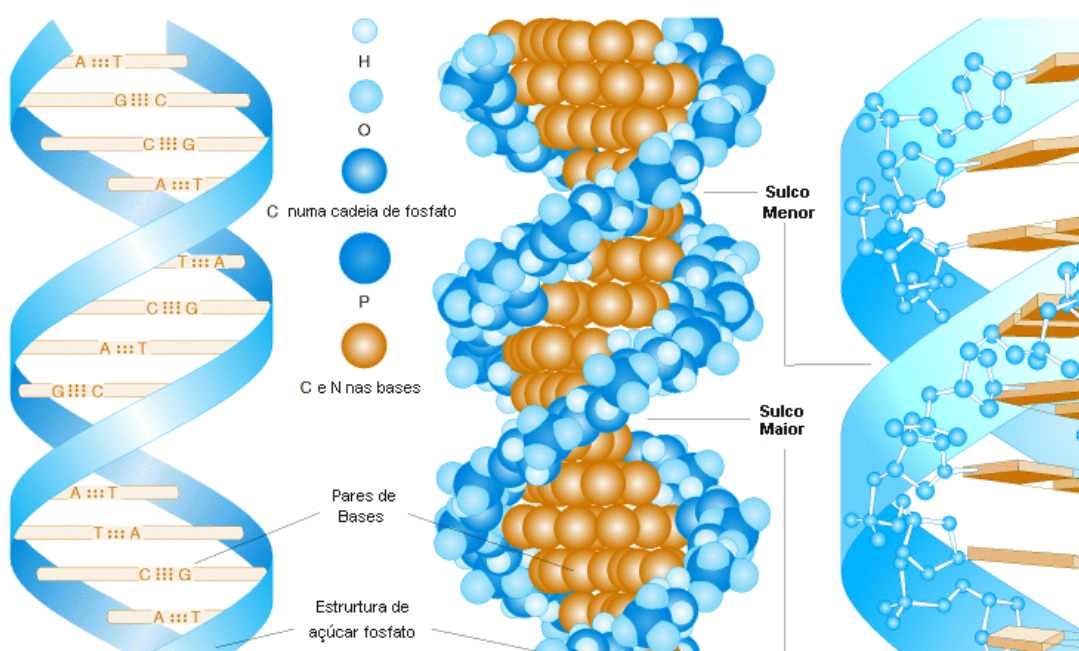


Figura 11: Formação dos sulcos na dupla hélice do DNA.

A proximidade destas bases possibilita a formação de pontes de hidrogênio, sendo que adenina forma duas pontes de hidrogênio com a timina e a citosina forma três pontes com a guanina, conforme mostrado na Figura 12. Desta forma, a dupla hélice é mantida unida por duas forças: pontes de hidrogênio formadas pelas bases complementares e interações hidrofóbicas, que forçam as bases a se "esconderem" dentro da dupla hélice.

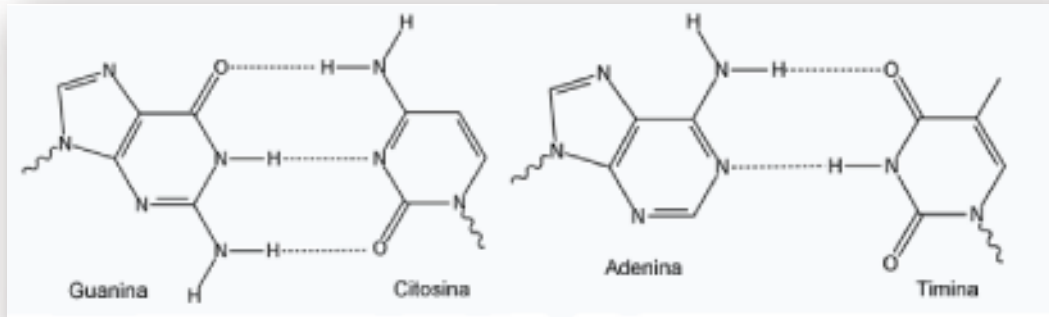


Figura 12: Formação das pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas.

As principais propriedades físicas e químicas do DNA, classificam-se como¹⁶²:

- ✓ Soluções de DNA, em pH = 7,0 e temperatura ambiente, são altamente viscosas;
- ✓ A altas temperaturas ou pH extremos o DNA sofre desnaturação, isto porque ocorre ruptura das pontes de hidrogênio entre os pares de bases. Esta desnaturação faz com que diminua a viscosidade da solução de DNA;
- ✓ Durante a desnaturação nenhuma ligação covalente é desfeita, ficando, portanto as duas fitas de DNA separadas;
- ✓ Quando o pH e a temperatura voltam ao normal, as duas fitas de DNA espontaneamente se enrolam formando novamente o DNA dupla fita. Este processo envolve duas etapas: *i)* a primeira é mais lenta pois envolve o encontro casual das fitas complementares de DNA, formando um curto segmento de dupla hélice; *ii)* a segunda etapa é mais rápida e envolve a formação das pontes de hidrogênio entre as bases complementares reconstruindo a conformação tridimensional.

O DNA é uma molécula longa. Por exemplo, uma bactéria típica, como a *E. coli*, possui uma molécula de DNA com aproximadamente 3.000 genes (um gene é uma sequência específica de nucleotídeos do DNA que se codifica para uma proteína. Se alongada, essa molécula de DNA teria cerca de 1 milímetro de comprimento. Entretanto, uma *E. coli* típica tem apenas 3 microns de comprimento. Para encaixar-se na célula, o DNA é totalmente enrolado e torcido em um cromossomo circular^{161,162}.

1.5.2 - Princípio de funcionamento dos genossensores

A dupla hélice do DNA é composta de duas “fitas” que se juntam através de ligações de pontes de hidrogênio (ligações fracas), entre os seus pares de bases, que podem ser quebradas (desnaturadas) por aquecimento ($\approx 100\text{ }^{\circ}\text{C}$), pH elevado (≈ 10) ou uso de solventes apróticos. A fita simples do DNA é relativamente estável, porém revertida às condições de desnaturação, a molécula irá se anelar (renaturar) dentro de sua configuração original. Esse fenômeno é conhecido como hibridização¹⁶⁴.

Nos biossensores de DNA são utilizadas sondas como elementos de reconhecimento específico do processo de formação do DNA-DNA, DNA-RNA e a interação entre proteínas ou moléculas reagentes ao DNA na superfície do sensor.

A detecção de seqüências de bases específicas de humanos, vírus, bactérias e ácidos nucleicos, está se tornando cada vez mais importante no diagnóstico de doenças¹⁶⁵⁻¹⁶⁹.

Em geral, a detecção de seqüências específicas do DNA é realizada utilizando eletroforese em gel de fragmentos de DNA, amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando *primers* que são seqüências específicas para a região selecionada do DNA.

Embora seja simples e eficaz para a detecção de produtos PCR, se a seqüência do alvo de DNA amplificado é a mesma que a pretendida, não pode ser determinada por eletroforese em gel. Visto estas desvantagens, brometo de etídio, que é um produto químico cancerígeno, é comumente utilizado como um agente revelador.

Há um grande interesse em desenvolver biossensores eletroquímicos de DNA para aplicações rápidas em análise genética como uma alternativa à eletroforese em gel. O biossensores DNA pode detectar a presença de genes mutantes ou genes associados a doenças humanas herdadas ou doenças infecciosas. Um biossensor eletroquímico de DNA geralmente é um eletrodo com um oligonucleotídeo imobilizado na superfície¹⁷⁰⁻¹⁷³.

Uma gama de técnicas de imobilização de sondas de DNA e suas respectivas técnicas de detecção estão reportadas na literatura^{174,175}. Dentre os transdutores mais promissores estão os piezelétricos, ópticos e eletroquímicos.

Na preparação dos biossensores de DNA, a imobilização da sonda é a etapa primordial que garante o desempenho e funcionamento do sensor utilizado. Sequências

específicas de oligonucleotídeos^e ou até mesmo fragmentos de DNA podem ser imobilizados por adsorção; complexos envolvendo biotina-avidina, ligações covalentes e imobilização sobre a superfície de eletrodos compósitos em solução. Pividori e colaboradores¹⁷⁵ relataram e discutiram as principais características de cada uma destas técnicas de imobilização.

O sistema de detecção eletroquímico apresenta diversas vantagens sobre os demais sistemas como, por exemplo, a ampla diversidade de modificação dos transdutores com procedimentos químicos ou eletroquímicos para melhor incorporação na incorporação da sonda. Recentemente, alguns estudos têm indicado que as técnicas eletroquímicas são as mais adequadas para medidas de eventos de hibridização^{171,174,176}.

O DNA é considerado um material funcional que pode interagir especificamente ou seletivamente com várias substâncias químicas. A ligação de compostos com o DNA pode ser classificada em três modos principais: intercalação, ligação aos sulcos e ligação covalente (cross-linking)^{177,178}. Além destas citadas, Minasyan e colaboradores¹⁷⁹, sugerem que a interação de substâncias de baixo peso molecular ligantes ao DNA podem ocorrer também por ligações não-covalentes e eletrostáticas. Isto pode alterar as conformações das macromoléculas de diferentes maneiras. A formação de vários complexos de DNA com ligantes pode levar a mudanças de sua estrutura e atividade funcional¹⁷⁹. Nestes tipos de interações, é sabido que, devido à estrutura planar dos compostos aromáticos, estes podem se intercalar entre os pares de bases do DNA¹⁸⁰.

Deste modo, a hibridização pode ser detectada diretamente¹⁸¹, por intercaladores de DNA¹⁸²⁻¹⁸⁷ ou por espécies eletroativas que interagem com as bases guanina das seqüências de DNA^{188,189}. Dentre a diversidade de compostos listados, dois dos principais utilizados para detecção dos eventos de hibridização são o azul de metileno (AM) e o brometo de etídio (BE). A Figura 13 mostra um esquema ilustrativo desta detecção envolvendo estes compostos

Quando a sonda entre em contato com o alvo complementar por certo período denominado tempo (incubação) ocorre à formação do híbrido (Figura 13-1). Após etapas de lavagem, para remoção de interações não-específicas, o sensor é colocado em

^e Oligonucleotídeo é um fragmento curto de uma cadeia simples de ácido nucléico (ADN ou ARN), tipicamente com 20 ou menos bases.

contato com o agente intercalador, que se liga preferencialmente a dupla hélice (Figura 13-2), com conseqüente acúmulo do mesmo na superfície híbrida

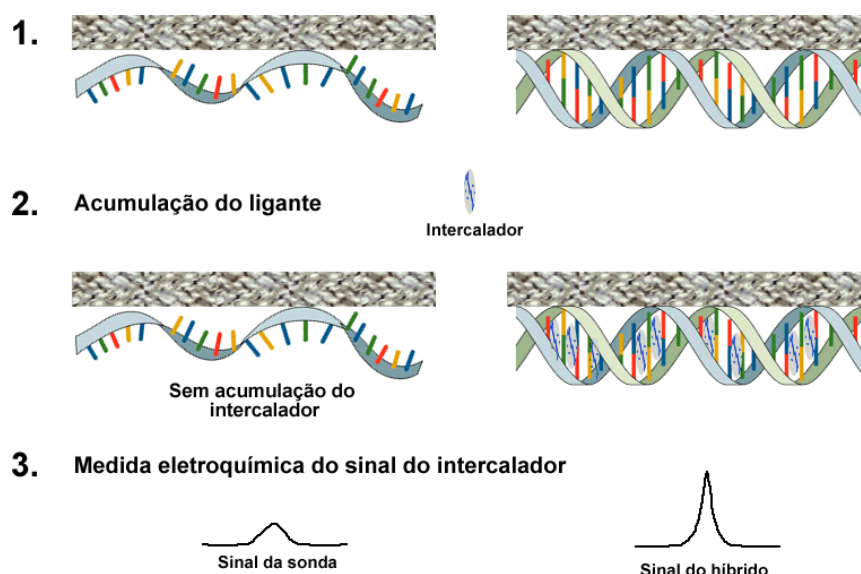
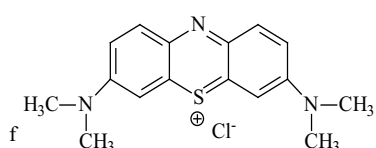


Figura 13: Esquema ilustrativo para as etapas de funcionamento de um genossensor eletroquímico, onde: (1) reação de hibridização; (2) intercalação do composto eletroativo ao híbrido formado e (3) detecção eletroquímica.

Devido às propriedades eletroativas destes compostos, os eventos de hibridização podem ser detectados indiretamente (Figura 13-3) pelo efeito da intercalação. Algumas das vezes, pode-se observar atividade eletroquímica do intercalador à ssDNA. Isto pode ser causado por interações não-específicas com a superfície do biossensor. Devido a isto, as etapas de lavagem são de fundamental importância no desempenho destes genossensores.

1.5.3 - Detecção da hibridização com Azul de Metileno

O azul de metileno (AM)^f é um corante orgânico pertencente à família dos fenotiazínicos, sólido azul escuro, solúvel em água, produzindo solução azul, quase



inodoro, com fórmula molecular: $C_{16}H_{18}ClN_3S$ e massa molar $319,85 \text{ g mol}^{-1}$, ponto de fusão $180 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (com decomposição) e solubilidade em água de 50 g L^{-1} ($20 \text{ }^{\circ}\text{C}$)^g. O azul de metileno é usado como um corante bacteriológico e como indicador. Têm muitas aplicações nos mais variados campos como a biologia e a química, tendo sido amplamente relatado e utilizado como um eficiente marcador eletroquímico para DNA^{188,190-192}.

Os tipos de interação e a cinética entre o AM e ssDNA ou dsDNA tem sido intensamente estudada^{155,188,193-200}. Outras interações como a ligação do AM com os sulcos do dsDNA, interações eletrostáticas, dependência da força iônica, relação da concentração AM/DNA e sequência de bases que constituem o DNA recebem considerável interesse como sonda eletroativa na detecção de eventos de hibridização do DNA^{191,194,201-204}. O AM interage através de interações eletrostáticas²⁰⁰, intercalação direta na dupla fita DNA²⁰⁵ ou pelas ligações preferenciais às bases de guanina livres presentes no ssDNA^{188,192}. A Figura 14 mostra a interação proposta por Henry entre o AM e a base purina guanina.

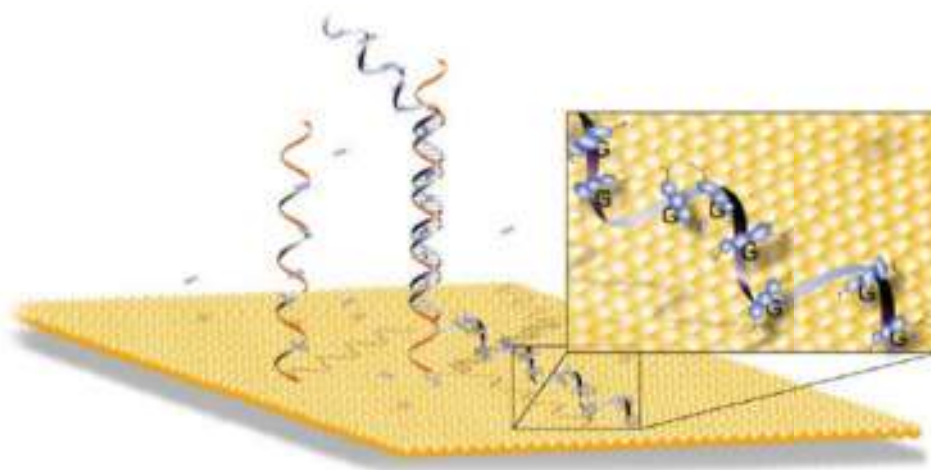


Figura 14: Esquema de detecção eletroquímica de hibridização utilizando a interação do azul de metileno com a guanina livre da superfície híbrida¹⁹³.

A utilização do AM para detectar hibridização do DNA é baseada na baixa afinidade do AM com a dsDNA comparada ao ssDNA. Tem sido demonstrado que o AM se liga especificamente a base purina guanina^{183,192}. Desta forma, o sinal de baixa

^g Informações obtidas pelo site: <http://brazil.merck.de/en/index.html> No. Catálogo: 159270, Acesso em 25/07/2009.

intensidade de corrente, observada após a hibridização, é devido à baixa interação do AM com dsDNA devido a inacessibilidade das bases guanina para o AM após hibridização.

Uma breve revisão na literatura demonstra a utilização deste corante como marcador eletroquímico. Dentre os estudos podemos citar os seguintes trabalhos:

Rohs e colaboradores²⁰² descreveram um estudo de modelagem para ligações do AM com uma sequência de DNA alternada com bases guanina-citosina.

Enescu e colaboradores²⁰⁶ investigaram a conformação do complexo AM-guanina por simulações moleculares. A posição e orientação dos complexos de AM-guanina foram determinadas em três modos: forma T, não-empilhados e face-a-face.

Kelly e colaboradores²⁰⁷ estudaram a intercalação do AM sobre monocamadas autocamadas de oligonucleotídeos terminadas em tiol sobre eletrodos de ouro por cronocoulometria, voltametria cíclica, elipsometria e métodos com marcadores de ³²P.

Tani e colaboradores²⁰⁸ demonstraram que há um deslocamento nos potenciais de pico nos sinais voltamétricos de onda quadrada do azul de metileno, obtidos de camadas automontadas de oligonucleotídeos terminados em tiol. A superfície de eletrodos de ouro contendo monocamadas automontadas de alcanotiol foi utilizada para detecção de hibridização do DNA²⁰⁹. As interações do AM com DNA e sondas de PNA foram descritas pelo uso de eletrodo de gota de mercúrio pendente e eletrodos de carbono¹⁹⁸.

1.5.4 – Detecção da hibridização com Brometo de Etídio

O brometo de etídio (BE) é um sólido que apresenta uma coloração vermelho escuro, quase inodoro, com formula molecular $C_{21}H_{20}BrN_3$, massa molar 394,31 g mol⁻¹, ponto de fusão entre 261-264 °C, e uma solubilidade em água de aproximadamente 40 g L⁻¹ (25 °C)^h. Como a maioria dos compostos fluorescentes, é uma substância aromática. A maior parte da molécula é uma estrutura tricíclica com grupos amino-benzenicos em cada lado de uma molécula piridínica. Esta estrutura dibenzopiridínica é conhecida com o nome de fenantridina²¹⁰. A estrutura do brometo de etídio é mostrada na Figura 15.

^hInformações obtidas pelo site: <http://brazil.merck.de/en/index.html> No. Catálogo: 111615, Acesso em 25/07/2009.

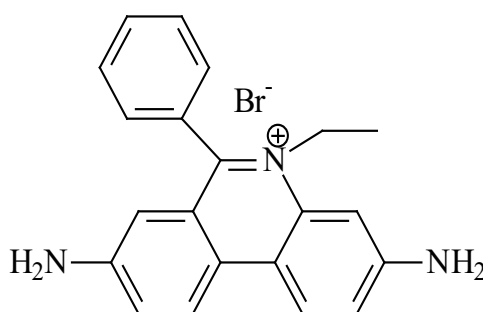


Figura 15: Estrutura molecular do brometo de etídio.

O BE é um agente intercalante usado comumente como marcador de ácidos nucleicos em laboratórios de biologia molecular para processos como a electroforese em gel de agarose. Quando se expõe esta substância a luz ultravioleta, emite uma luz vermelho alaranjada, que se intensifica umas 20 vezes depois de haver-se unido a uma cadeia de DNA (Figura 16).

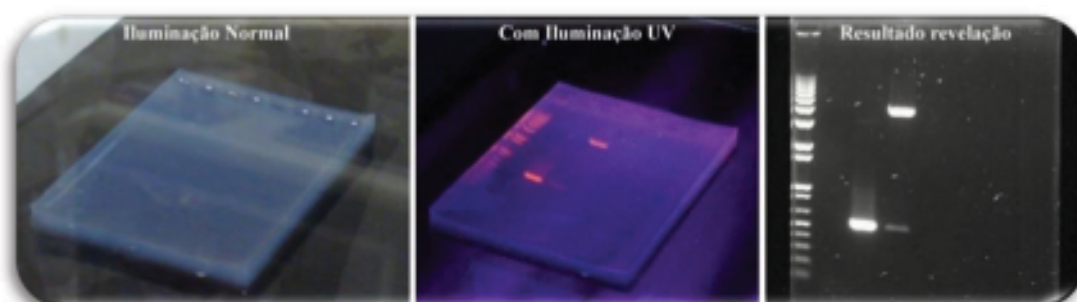


Figura 16: Eletroforese em gel de agarose, mostrando a fluorescência do brometo de etídio intercalado ao DNA, sobre exposição UVⁱ.

Como o brometo de etídio se intercala no DNA, esta substância tem um poderoso efeito mutagênico e, possivelmente pode ser cancerígeno ou teratogênico. Vários procedimentos são descritos para a destruição do brometo de etídio, principalmente sua adsorção em carvão ativo seguida de incineração do conjunto^{211,212}, enquanto que outros procedimentos incluem a destruição com agentes redutores e oxidantes^{210,213}, como permanganato de potássio e hipoclorito de sódio. Alguns autores,

ⁱ Imagens obtidas através do projeto de pesquisa sobre o vírus da hepatite B, do grupo da Universidade de Otago. Disponível em: <http://mrna.otago.ac.nz/Bioinfo/Brownlab.htm>, acesso em 25/07/2009.

entretanto, não recomendam essa prática, pois há indícios da produção de resíduos também tóxicos²¹⁰. Além disso, as baixas concentrações do brometo de etídio nos resíduos também dificultam sua destruição²¹³.

Liu e colaboradores¹⁸⁴ sugerem que a ligação de intercalação do BE ao DNA ocorre através do empilhamento dos grupos aromáticos planares entre os espaços dos pares de bases (Figura 17-A). Para que um intercalador encaixe entre os pares de bases, as bases tem de se separar, distorcendo as cadeias de DNA, desenrolando a cadeia dupla (Figura 17-B). O efeito de intercalação inibe tanto a transcrição como a replicação do DNA, causando toxicidade e mutações, devido a isto que a maioria dos intercaladores de DNA são muitas vezes carcinogénicos.

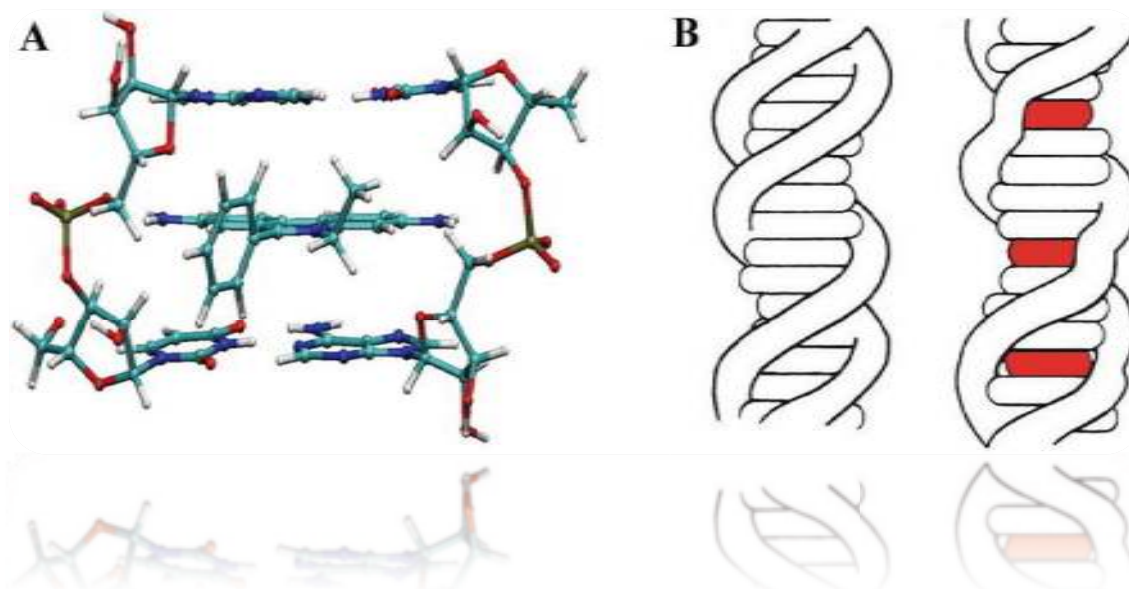


Figura 17: (A) Brometo de etídio intercalado entre dois pares de base adenina e uracila. (B) Distorções estruturais induzidas pela intercalação, Esquerda: DNA não-intercalado. Direita: DNA intercalado em três regiões (áreas vermelhas).

A ligação do BE ao DNA tem sido estudada por vários métodos, dentre eles podemos citar os de absorção, fluorescência e RMN ²¹⁴⁻²¹⁶. Recentemente o uso de métodos eletroquímicos para estudar a intercalação de moléculas ao DNA tem tido uma progressão emergente^{177,179,184,217-219}. As investigações eletroquímicas da interação de moléculas ao DNA pode proporcionar um complemento aos métodos espectrofotométricos para espécies não-absortivas¹⁷⁹. O métodos eletroquímicos, diferem em sua sensibilidade, simplicidade e versatilidade provendo informações sobre o

mecanismo de ligação. Berg e Eckardt²²⁰, realizaram os primeiros estudos sobre a interação das moléculas ligadas ao DNA baseada em suas diferentes atividades eletroquímicas livres ou ligadas ao DNA.

A possibilidade de interação do BE com ssDNA pode ocorrer por vários modos^{215,221}. Resultados experimentais existentes para a formação do complexo do BE com ss-polinucleotídeos são relevantes para as condições não excluindo a presença de sítios-ds no DNA^{215,219}.

Dentre alguns trabalhos reportados na literatura, encontram-se em destaque os seguintes trabalhos.

Liu e colaboradores¹⁸⁴, estudaram a imobilização de uma sequência específica de DNA, imobilizando covalentemente a ssDNA sobre eletrodos de grafite modificados com grupos amino. As moléculas foram imobilizadas por ligações fosforamidas entre os grupos fosfatos das moléculas de DNA e os grupos aminos na superfície do eletrodo. Os eventos de hibridização foram detectados utilizando a oxidação do brometo de etídio. Os autores observaram aumento na I_{pa} do BE quando em contato com o alvo complementar, sendo linear na faixa de $1,0 \times 10^{-4}$ mg mL⁻¹ a $1,0 \times 10^{-6}$ mg mL⁻¹. O limite de detecção do sistema para o alvo complementar foi de $2,0 \times 10^{-7}$ mg mL⁻¹.

Matsumoto e colaboradores¹⁷⁷, desenvolveram um eletrodo de carbono vítreo modificado com filmes de DNA, obtidos por irradiação UV, e utilizaram o BE como intercalador eletroativo. O eletrodo modificado foi utilizado para detecção de dibenzofuran, um poluente ambiental, inativo que também se intercala ao DNA. As medidas foram baseadas na variação da resposta do BE acumulado no eletrodo, pela reação de competição de intercalação aos sítios do DNA entre o BE e o poluente. Os autores indicaram a possibilidade de utilização deste sensor como mecanismo de detecção do dibenzofuran.

Minasyan e colaboradores¹⁷⁹, estudaram a interação do BE com DNA eletroquimicamente por voltametria de pulso diferencial (VPD) em diferentes forças iônicas (0,154 e 0,02 mol dm⁻³ [Na⁺], pH 7,00). Valores da constante de ligação (k) e o número de bases correspondente a um sítio do ligante (n) foram determinados. Os valores de k foram iguais a $1,9 \times 10^6$ e $5,6 \times 10^5$ mol⁻¹ dm³, e o n igual a 9 e 3,6 para as fortes interações em força iônica igual a 0,02 e 0,154 respectivamente.

Guo e colaboradores²¹⁷, investigaram as características eletroquímicas da imobilização de moléculas de ssDNA e dsDNA de calf thymus na superfície de nanotubos de carbono por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância

eletroquímica (EIE). As moléculas de DNA foram imobilizadas via ligação covalente à superfície dos nanotubos por interação dos grupos carboxílicos dos nanotubos com os grupos amino das bases do DNA. O BE foi utilizado como marcador para investigar a interação entre as moléculas imobilizadas com os nanotubos. Os autores observaram que os valores de I_{pa} para o par redox ferro/ferricianeto nos VC diminuem e os valores de R_{tc} obtidos nos diagramas de Nyquist aumentam devido a imobilização das moléculas de DNA (ssDNA e dsDNA) sobre os nanotubos. Desta forma os autores sugerem que as moléculas imobilizadas sobre os nanotubos apresentam a habilidade de interagir com pequenas moléculas como o BE.

Qi e colaboradores²¹⁸, também utilizando nanotubos de carbono, desenvolveram um método de detecção para os eventos de hibridização usando eletrodos de pasta modificados com filmes poliméricos de polipirrol. Os eventos de hibridização foram verificados utilizando-se o BE como intercalador, monitorando-se suas correntes de oxidação quando em contato com a sonda e alvo complementar. Como esperado, foram observados maiores valores de corrente do BE, quando o mesmo se intercala a dsDNA. O sensor se mostrou linear na faixa de $1,0 \times 10^{-10}$ a $1,0 \times 10^{-8}$ mol dm⁻³ em função do logaritmo da concentração do alvo complementar com a corrente de pico do BE. O limite de detecção foi estimado em de $8,5 \times 10^{-11}$ mol dm⁻³. Isto implica que a combinação do sensor com o material biológico é uma promissora estratégia para imobilização de elementos biológicos.

1.6 – Imunossensores

Imunossensores são biossensores baseados na reação imunológica de um antígeno (A_g) com o anticorpo (A_c), formando o correspondente complexo antígeno-anticorpo.²²² Nestes casos, quando o A_g ou A_c é imobilizado na superfície do eletrodo, dependendo do tipo de resposta de transdução do sinal, a construção de diversos tipos de dispositivos podem ser obtidos^{223,224}. Um fato que deve ser considerado é não somente a seletividade, mas também a sensibilidade gerada pelo transdutor.

1.6.1 – Considerações sobre antígenos-anticorpos

Os antígenos possuem estruturas químicas que favorecem a complementaridade com o anticorpo, através de ligações não-covalentes

(Figura 18-A). Essas interações são semelhantes ao que acontece com reações envolvendo enzimas. Portanto são reversíveis e possuem afinidades diferentes com diversas substâncias. Como um anticorpo pode se relacionar com antígenos com afinidades diversas, ele pode ligar-se com um que não seja o seu antígeno de melhor complementaridade através de ligações mais fracas com regiões semelhantes, mas não idênticas, àquele que o induziu. Essa ligação é chamada de reação cruzada.

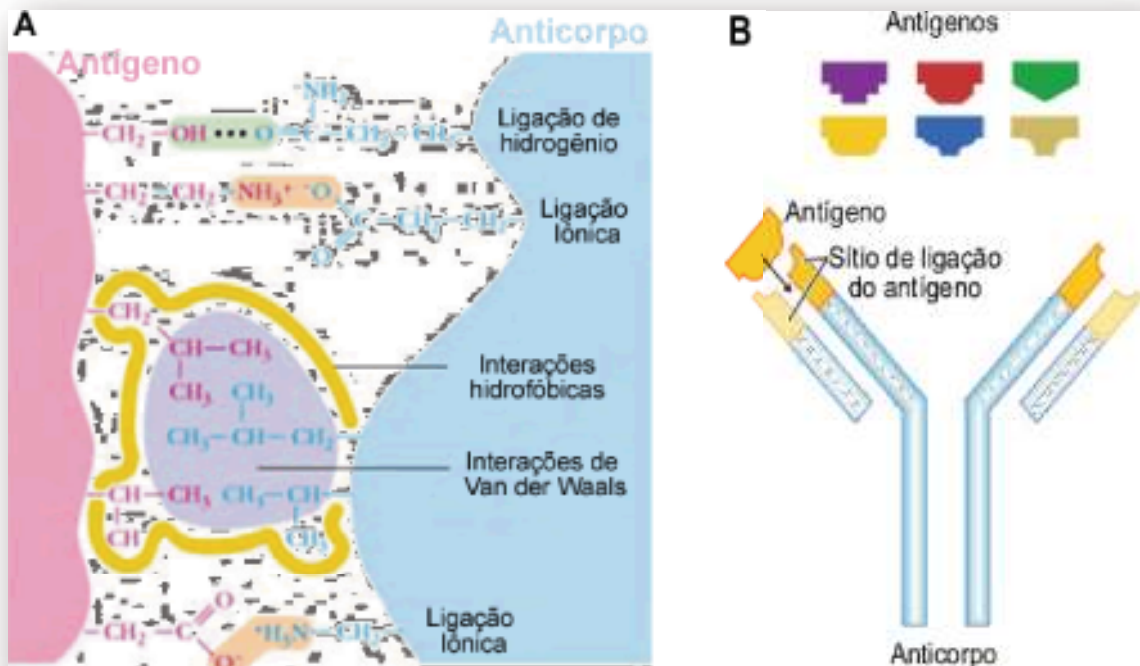
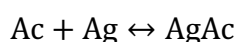


Figura 18: Esquema simplificado para as interações (A) covalentes entre antígeno e anticorpo e (B) sistema de seletividade do anticorpo.

Os anticorpos (Ac) pertencem à família das glicoproteínas denominada imunoglobulinas (Ig) e são produzidos pelos animais em resposta à presença de substâncias estranhas denominadas imunógenos ou antígenos. Os anticorpos produzidos pelas células, funcionam como receptor para os Ag (Figura 18-B). A maneira mais simples e direta dos Ac protegerem o hospedeiro contra agentes patogênicos ou seus produtos tóxicos é através da neutralização. Nesse mecanismo o Ac se liga ao patógeno (ou toxina) bloqueando o acesso destes as células que poderiam ser infectadas ou destruídas. Em seguida, o patógeno neutralizado é fagocitado por macrófagos. Esse mecanismo é importante, por exemplo, contra patógenos como os vírus que ao serem neutralizados pelos Ac são impedidos de penetrar nas células e replicarem.

No imunoensaio, o anticorpo combina-se especificamente com o correspondente antígeno ou hapteno (substância de baixo peso molecular que por si não é imunogênica, mas pode se ligar ao anticorpo específico), formando um complexo, conforme a Equação 1. Essa interação é caracterizada pela constante de afinidade, K_a , definida pelas concentrações do complexo (AgAc), do antígeno livre (Ag) e dos sítios livres dos anticorpos (Ac) no equilíbrio, de acordo com a Equação 2.

Equação 1:



Equação 2:

$$K_a = \frac{[AgAc]}{[Ac][Ag]}$$

Os valores das constantes de afinidade entre 10^4 e $10^{12} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ resultam na alta sensibilidade dos imunoensaios. Embora estudos para a determinação das constantes tenham sido realizados, para determinação do anticorpo, antígeno ou hapteno, freqüentemente, o valor da constante não é diretamente empregado. Sob o ponto de vista analítico, a formação do complexo pode ser monitorada pelo método direto (sem qualquer marcador), porém grande parte dos imunoensaios lançam mão de marcadores (método indireto). Tanto o antígeno quanto o anticorpo podem ser marcados e, então, são denominados conjugados²²². Os primeiros imunoensaios empregavam marcadores radioativos, mas a restrição quanto ao emprego de radioisótopos conduziu ao desenvolvimento de ensaios com compostos fluorescentes ou enzimas, sendo o ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), o mais amplamente utilizado em análises clínicas e biológicas.

Duas grandes classes no desenvolvimento destes dispositivos se destacam, sendo os chamados imunossensores amperométricos, nos quais enzimas são empregadas como marcadores, e os imunossensores impedimétricos, no qual são realizadas medidas diretas das propriedades elétricas da superfície são monitoradas. Há uma intensa literatura no campo dos imunossensores impedimétricos. No presente trabalho utilizou-se a detecção impedimétrica para detecção do anticorpo para Leishmaniose Visceral.

Nos imunossensores impedimétricos, a transdução do sinal biológico é realizada através de medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

A EIE é uma das técnicas mais poderosas e sensíveis para investigação das propriedades elétricas da superfície de eletrodos modificados²²⁵⁻²³⁰. A EIE mede a resposta (corrente e sua fase) de um sistema eletroquímico a um potencial de oscilação aplicado em diferentes frequências sobre um potencial d.c. Um importante fator a ser considerado é a ligação de biomoléculas carregadas na superfície. É uma técnica não-destrutiva^j e informativa na qual pode ser usada para estudar as propriedades elétricas da interface do dispositivo sensível e investigar as reações que ocorrem nele^{230,231}. Medidas de impedância não requerem reagentes especiais e é receptiva para operação livre de marcadores²³². As vantagens da EIE comparadas aos métodos voltamétricos é a natureza não-invasiva²³³. Entretanto, um problema normalmente encontrado na EIE é a dificuldade em determinar o significado físico da resposta no domínio das frequências frente ao sistema investigado²³⁴⁻²³⁷.

Para biossensores, a EIE apresenta algumas vantagens importantes sobre a amperometria. Para biossensores amperométricos diretos, a enzima é imobilizada sobre um eletrodo condutor e a transferência eletrônica é detectada durante uma reação redox mediada biologicamente. Entretanto, o sítio ativo deve estar muito próximo da superfície do eletrodo e facilmente acessível ao analito em solução. Em muitos casos, a transferência eletrônica ocorre muito distante da superfície do eletrodo e a taxa de transferência eletrônica cai exponencialmente com a distância²³⁷. Este problema pode ser reduzido através do uso de mediadores redox, mas a detecção então se torna limitada pela transferência de massa do mediador²³⁸.

Biossensores amperométricos indiretos detectam o produto de uma reação catalisada biologicamente, normalmente peróxido de hidrogênio. Entretanto, o analito normalmente contém espécies adicionais (por exemplo, ureato ou ascorbato) que podem também ser eletroquimicamente oxidados ou reduzidos. Então, biossensores amperométricos indiretos não são seletivos. Uma das vantagens mais significantes da detecção por impedância para biossensores é que a interação antígeno-anticorpo pode ser diretamente detectada, permitindo o desenvolvimento de imunossensores. A

^j Isto depende do potencial de circuito aberto E_{ocp} .

principal desvantagem dos métodos de impedância para biossensores é a necessidade de uma engenharia interfacial para reduzir adsorções não-específicas^{225 239,240}.

Em imunossensores, resultados de EIE podem confirmar que o anticorpo está imobilizado com sucesso na superfície do eletrodo²³⁹. Vários grupos demonstraram a potencialidade do uso desta técnica para imunorreações diretas^{225,226,236,238-244}.

1.6.2.1 – Descrição teórica de EIE

A EIE tem ampla aplicação na área de caracterização dos materiais sendo utilizada rotineiramente na caracterização de coberturas, pilhas, células combustíveis, fenômenos de corrosão, eletrocatalise heterogênea dentre outras. Também tem sido extensivamente utilizada como ferramenta para estudar mecanismos em eletrodeposição, eletrodissolução, passividade, corrosão, difusão de íons através de membranas, estudos de interface de semi-condutores e biossensores.

A 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. A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica é uma ferramenta que pode prever a maneira como o revestimento dos eletrodos se comportará com o tempo, em relação a processos corrosivos ou outros processos.

EIE é um método AC que descreve a resposta de uma interface eletroquímica a um sinal de voltagem senoidal de baixa amplitude em função da frequência. A onda senoidal de corrente resultante difere no tempo (deslocamento de fase) com respeito a onda de perturbação (voltagem) e a razão $V(t)/I(t)$ é definida como a impedância (Z), contando para a oposição combinada de todos os componentes dentro da célula eletroquímica (resistores, capacitores, indutores) para o fluxo de elétrons e íons^{234,238,242}.

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 o qual é imposta uma variação senoidal de potencial com pequena amplitude (Figura 19). 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, se $E = E_{ocp}$. Além disto, é possível perturbar o sistema usando diferentes valores de frequência, pois a onda de potencial é senoidal. Na EIE 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).

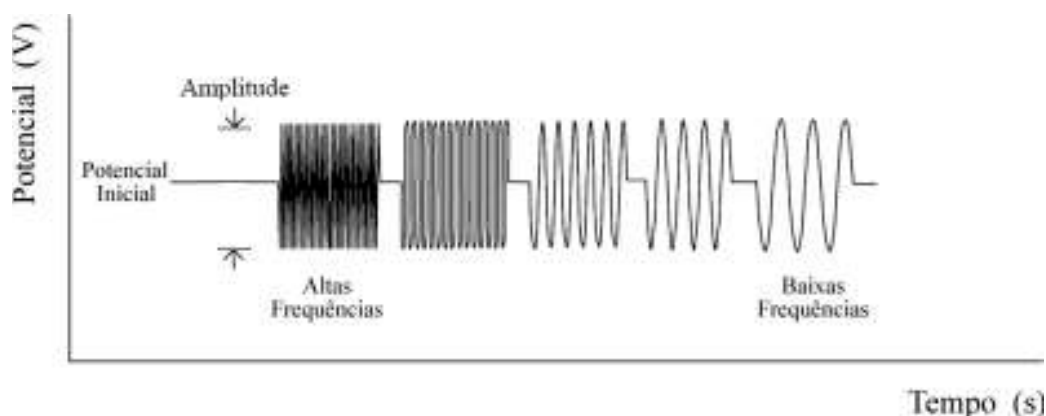


Figura 19: Diagrama da onda de potencial aplicada em função do tempo para realização das medidas de EIS a potencial constante.

As medidas são realizadas variando-se os valores de altas frequências para baixas frequências. Desta forma, diferentes processos físicos e químicos podem 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 imaginário da impedância) vs Z' (componente real da impedância), como também o diagrama de Bode, onde ϕ (ângulo de fase) e $\log |Z|$ 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 são complementares²³⁰.

O desenvolvimento de métodos visando o monitoramento direto da interação antígeno-anticorpo é particularmente atrativo. O design do conceito de sonda baseado na afinidade livre de marcadores é o objetivo de muitas pesquisas atuais nos meios acadêmicos e industriais, através do estabelecimento de métodos alternativos aos já

existentes imunoenaios baseados em ELISA. Imunossensores impedimétricos tem recebido atenção especial por possuírem um número de características atrativas associadas ao uso de transdutores eletroquímicos²³⁴.

De acordo com Prodromidis²³⁴, baseado na natureza do sinal de medida, o imunossensor de impedância pode ser classificado em duas categorias principais:

- a) **Capacitiva**, onde a superfície do eletrodo está completamente coberta por uma camada dielétrica e todo o eletrodo se comporta como um isolante. Neste tipo de sensor, nenhuma sonda redox está presente na solução de medida e a corrente capacitiva é medida sobre um sinal de voltagem senoidal de baixa amplitude, a baixa frequência de excitação (tipicamente 10-1000Hz). De acordo com a discussão acima, interações Ac-Ag são esperadas devido ao decréscimo da medida de capacitância.
- b) **Faradáica ou impedimétrico faradáico**, onde a superfície do eletrodo, o qual está parcialmente ou completamente coberto por uma camada não-isolante, ou parcialmente coberto por uma camada isolante é capaz de catalisar uma sonda redox, a qual existe na solução de medida. Neste caso, o parâmetro de medida é a resistência à transferência de carga e, para as interações Ac-Ag, é esperado aumento no seu valor, uma vez que a reação faradaica se torna impedida com o tempo. De modo geral, imunossensores impedimétricos faradaicos exibem uma alta sensibilidade a interações entre Ac-Ag. Entretanto, as espécies redox podem ter um efeito na estabilidade e na atividade do eletrodo.

Muitos artigos mostram a EIE como uma ferramenta para caracterizar monocamadas automontadas sobre as superfícies. Um capacitor é formado entre o eletrodo condutor e o eletrólito²³⁸. A impedância absoluta é relatada à frequência pela Equação 3:

Equação 3:

$$|Z''| = \frac{1}{2\pi fC}$$

onde f é a frequência (em Hz) na qual Z'' é medida.

O espectro de impedância inclui uma porção de semicírculo a altas frequências, correspondendo ao processo limitante de transferência eletrônica e uma porção linear a baixas frequências resultando da etapa limitante de difusão do processo eletroquímico. O diâmetro do semicírculo exibe a magnitude da resistência à transferência eletrônica (R_{tc}) da camada a qual mostra seu comportamento isolante para o par redox. Assim, o diâmetro pode ser usado para descrever as propriedades de interface do eletrodo e seu valor crescente caracteriza exatamente a imobilização para cada etapa²²⁶.

O outro parâmetro, disponível em imunossensores impedimétricos é a capacitância, onde um decréscimo da capacitância total, devido ao aumento da distância entre as placas é assim esperado sobre a ligação do analito ao seu receptor específico²³⁴. Em um imunossensor, portanto, a capacitância total (C_{dc}) é determinada pela capacitância do anticorpo imobilizado (C_{Ac}). Quando o antígeno se liga, uma camada hidrofóbica é formada no contato com o anticorpo, com a capacitância C_{Ag} e C_{dc} diminuindo, de acordo com a Equação 4^{234,238}.

Equação 4:

$$\frac{1}{C_{dc}} = \frac{1}{C_{Ac}} + \frac{1}{C_{Ag}}$$

Para ajustar o espectro medido com o espectro de impedância fora dos elementos ideais, os elementos ideais foram trocados por elementos de fase constantes (EFC)²⁴².

Equação 5:

$$Z_{CPE} = K\omega^{-\alpha}$$

O expoente de frequência é $\alpha = 1$ e $K=1/C$ para uma capacitância ideal; $\alpha = 0$ e $K=R$ para uma resistência ideal e se $\alpha = 1/2$ o resultado é a impedância de Warburg, a qual está associada ao processo de difusão semi-infinita. O expoente α pode ser obtido quando a capacitância da membrana (ou camada de capacitância) for trocada pelo elemento de fase constante. Os desvios do expoente α dos valores ideais são atribuídos às homogeneidades da camada analisada, como defeitos e rugosidade²⁴². Conforme já descrito, os resultados de impedância são normalmente ajustados a circuitos equivalentes de resistores e capacitores. O circuito mais simples e comumente utilizado

para um sistema redox com transporte difusional conhecido como circuito de Randles é mostrado na Figura 20-A. Este circuito é normalmente usado para interpretar sistemas eletroquímicos simples. Este circuito equivalente fornece o diagrama do plano complexo também denominado de diagrama de Nyquist mostrado na Figura 20-B, no qual fornece percepção visual dentro da dinâmica do sistema^{234,238,242}.

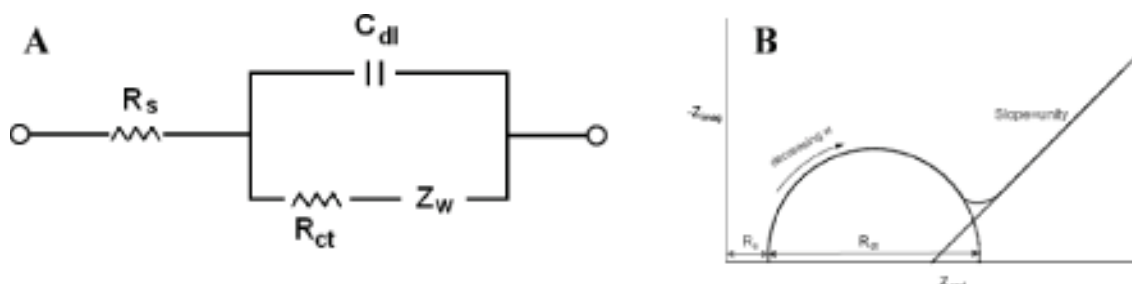


Figura 20: (A) Circuito equivalente de Randles para um sistema eletroquímico simples e (B) gráfico de Nyquist proveniente do circuito de Randles mostrado em A.

Na Figura 20, R_{tc} é a resistência à transferência de carga, a qual é inversamente proporcional à taxa de transferência eletrônica; C_{dl} é a capacitância da dupla camada elétrica; R_s é a resistência total da solução; e Z_w é impedância de Warburg que descreve a difusão linear semi-infinita. Se o analito afeta um ou mais desses parâmetros do circuito equivalente e esses parâmetros não são afetados por espécies interferentes, então o método de impedância pode ser usado para a detecção do analito. R_s surge primeiramente da resistência do eletrólito e é analiticamente útil, principalmente nos sensores de condutividade. A impedância de Warburg, a qual pode ser usada para medir efetivamente os coeficientes de difusão, é raramente usada para aplicações analíticas. Os elementos do circuito equivalente na Figura 20, que são normalmente usados para detecção de analito são R_{tc} e C_{dl} . As medidas de capacitância normalmente surgem de uma série de combinações de vários elementos tais como ligação do analito a uma camada sensível sobre o eletrodo²³⁸.

1.6.3 – Desenvolvidos recentes em imunossensores

Vários tipos de imunossensores, com detecção por medidas de EIE, têm sido desenvolvidos e descritos na literatura. Estes imunossensores são baseados nas mudanças das propriedades elétricas resultantes da interação antígeno/anticorpo sobre a superfície dos eletrodos.

As técnicas de amplificação de impedância podem ser implementadas através da deposição de materiais isolantes eletricamente tais como precipitados insolúveis ou complexos biomoleculares sobre a superfície do eletrodo, via rota mediada por analito. Foi mostrado que a interação Ac-Ag poderia ser ampliada pelo uso de complexos de proteínas-estreptavidina marcadas com biotina em medidas de EIE^{226,241}.

Chen e colaboradores²²⁶ desenvolveram um imunossensor impedimétrico altamente sensível usando um novo procedimento de amplificação com a aplicação de Ac marcados com ouro coloidal como sonda amplificadora primária e uma amplificação de múltiplos passos, alternando o tratamento do sistema resultante com Ac secundário marcado com ouro coloidal e Ac marcado com ouro coloidal. O analito, IgG humano foi detectado através de medidas de impedância com a interface sensível modificada pelo Ac IgG anti-humano de coelho. Os aumentos de impedância foram observados linearmente dependentes da concentração de IgG na faixa de 15,3 a 328,3 ng L⁻¹ com um limite de detecção de 4,1 ng.L⁻¹.

Uma etapa crítica na construção de imunossensores é o bloqueio da superfície para evitar interações não-específicas após a imobilização do Ac. Para esse propósito, albumina de soro bovina (BSA) tem sido largamente utilizada. Tan e colaboradores²²⁵ e Zhang e colaboradores²³⁹ observaram que quando BSA é usado sobre os filmes para bloquear sítios não-específicos, o diâmetro do semicírculo de altas frequências aumenta. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de que propriedades não-condutoras do BSA obstruiriam a transferência eletrônica da sonda eletroquímica. Isto confirma a imobilização de Ac sobre a superfície do eletrodo. Entretanto, os passos de funcionalização do imunossensor têm sido analisados por meios de EIE.

Varela e colaboradores²⁴⁵ investigaram os imunossensores condutimétricos e suas etapas de funcionalização foram caracterizadas por métodos de afinidade química e EIE. No estudo, um novo imunossensor condutimétrico para detecção de atrazina foi desenvolvido. Este imunossensor é baseado principalmente em Ac marcados com nanopartículas de ouro. Além disso, o imunossensor consiste de um arranjo de dois micro-eletrodos metálicos interdigitados não-passivantes coplanares e imunorreagentes especificamente desenvolvidos para detectar este pesticida. Detecção imunoquímica da

concentração de atrazina é alcançada por reação competitiva, que ocorre antes da inclusão dos Ac marcados. É mostrado que nanopartículas de ouro fornecem uma amplificação do sinal condutor e torna possível detectar atrazina por meio de medidas DC simples. O imunossensor desenvolvido detecta atrazina com limite de detecção na ordem de 0,1 a 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

No mesmo campo, para determinação de atrazina, Varela e colaboradores²⁴³ utilizaram um imunossensor impedimétrico. Esse novo método inclui experimentos de impedância realizados diretamente sem qualquer sonda redox, medindo a ligação específica de um Ac não marcado com o antígeno coberto. O imunossensor e suas etapas de funcionalização foram caracterizados por meios de afinidade química e EIE. O imunossensor mostrou um limite de detecção de 8,34 a 1,37 $\mu\text{g L}^{-1}$, o qual é menor do que o nível de resíduo máximo (100 $\mu\text{g L}^{-1}$). Esses autores mostraram que a fabricação do sensor descrito acima é rápida, simples e com baixo custo na produção em massa, sendo os resultados sensíveis e de fácil manuseio. O uso de micro-eletrodos interdigitados não-passivantes aumentou a sensibilidade do dispositivo às mudanças na camada sensível química ao custo de se usar tampão de baixa condutividade ao invés de tampões isotônicos convencionais.

Yang e colaboradores²²⁷ demonstraram o uso de microeletrodos interdigitados sem marcadores usando EIE, alcançando um LD de $3,45 \times 10^6$ CFU mL^{-1} para células de suspensão de *Salmonella* em tampão PBS. CFU é descrito como unidades formadoras de Colônias. Sorotipos de *Salmonelas* estão entre as bactérias mais comuns responsáveis pela gastroenterite e pode ser classificada como microorganismo potencial para bioterrorismo. Aproximadamente 200 doenças alimentícias resultam em mais de 5000 mortes por ano reportadas somente nos EUA²³.

Ionescu e colaboradores²³⁶ têm usado EIE combinado com tecnologia de imunossensores para a determinação de traços de antibióticos ciprofloxacina pertencentes à família fluoroquinolona. Ciprofloxacina, introduzida em 1987, é uma dos primeiros antibióticos da família das quinolonas a ser desenvolvido e aprovado para uso nos humanos. Ciprofloxacina tem um espectro de atividade contra muitas bactérias patogênicas gram-negativas e gram-positivas, pertencentes especialmente a *Enterobacteriaceae*, e é usada primariamente no tratamento de infecções urinárias. O eletrodo sensor foi baseado na imobilização de Ac anti-ciprofloxacina por ligação química em um filme de polipirrol-NHS eletrogerado em um substrato de ouro sólido. O acoplamento de tanto Ac ou da ciprofloxacina no polímero resultou em um aumento

de impedância. Assim, um aumento de resistência total de 1139 para 2391 $\Omega \text{ cm}^2$ confirma a formação de uma camada de Ag homogênea compacta e um bom acoplamento das entidades do Ac com ciprofloxacina ancoradas ao polímero. A imunorreação da ciprofloxacina no Ac diretamente inicia um sinal via EIE o qual permite a detecção de concentrações extremamente baixas de 10 pg mL^{-1} de ciprofloxacina caracterizada pelo aumento da resistência de 96 $\Omega \text{ cm}^2$. A reprodutibilidade dos imunossensores fabricados foi estimada. Assim, o RSD para três imunossensores testados usando o método de impedância foi encontrado com 4,7 %.

Hnaien e colaboradores²⁴² descreveram o desenvolvimento de um sensor imunológico baseado na funcionalização de eletrodos de ouro permitindo a detecção do antígeno da raiva. A raiva constitui uma dos mais perigosos vírus causando muitas mortes a cada ano. Cada ano, aproximadamente 55.000 pessoas morrem de raiva com alta percentagem em crianças. Altas porcentagens (99%) dos casos registrados ocorreram na Ásia e África. O biossensor é baseado na imobilização de Ac específicos da raiva sobre microeletrodos funcionalizados de ouro. As medidas de EIE foram realizadas após a ativação da superfície de ouro com EDC e NHS. Após cada etapa, da construção do biossensor, aquisições de dados de EIE em PBS foram realizadas. Os autores observaram que cada camada depositada na superfície do imunossensor gerava um aumento na medida de impedância. O LD deste sensor foi de 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em ordem a provar a seletividade do sensor, o imunossensor foi exposto à solução contendo o vírus antígeno da doença de Newcastle (interação não-específica). Os autores observaram que há apenas uma pequena variação da impedância após a adição do vírus. Entretanto, uma larga resposta para a impedância absoluta na presença do antígeno específico e não-específico. A razão entre ambas as respostas confirma a especificidade do sensor em 80%.

Radi e colaboradores²⁴⁴ reportaram um imunossensor eletroquímico impedimétrico livre de marcadores para a detecção de ochratoxina A (OTA). OTA pertence à família de metabólitos fúngicos secundários produzidos por várias classes de *Penicillium* e *Aspergillus*. Entre elas, OTA está recebendo muita atenção em todo o mundo devido ao perigo aos seres humanos. A meia-vida no sangue é estimada em 35 dias, após ingestão oral. OTA foi detectada em uma variedade de alimentos tais como cereais, sementes oleosas, feijões de café, vinho, carne, cacau, pimentas, etc. Os Ac de OTA foram então imobilizados fazendo-se uso da química da carbodiimida. As mudanças nas impedâncias, devido à imunointeração específica na superfície do

imunossensor foram utilizadas para detectar OTA. O aumento nos valores de resistência a transferência de carga foram linearmente proporcionais à concentração de OTA na faixa de 1 a 20 ng mL⁻¹, com um LD de 0,5 ng mL⁻¹, baseado em 3x o desvio padrão do sinal da linha de base. O desvio padrão relativo variou de 3,7 a 5,5 % para 5 medidas de repetição com OTA.

Wang e colaboradores²⁴⁰ estudaram um imunossensor de impedância baseado em arranjo de microeletrodos interdigitados desenvolvido como uma nova aplicação para a detecção sensível, específica e rápida do vírus da influenza aviária H5N1. Influenza aviária (AI) é um problema mundial significativa para a saúde dos humanos e animais. Nos últimos anos, epidemias contínuas do patógeno H5N1 e casos de infecções humanas têm causado preocupação de interesse internacional crescente de que o vírus atual se torne capaz de ser transmitido de humanos para humanos, gerando uma pandemia global. O H5N1, descoberto nos anos 90, é um vírus do RNA de fita negativa em forma de bastão com um genoma segmentado que pertence ao tipo A na família Orthomyxoviridae. O imunossensor impedimétrico poderia detectar o alvo H5N1 a uma concentração maior do que 10³ EID₅₀/mL dentro de duas horas. A resposta da interação Ac-Ag mostrou ser dependente da concentração e uma faixa linear para a detecção do vírus foi encontrada como 10³ e 10⁷ EID₅₀/mL e uma equação correspondente foi descrita como: $R_{ct} = 3,23 \text{ LogN} - 4,60$ ($R^2 = 0,97$) onde R_{tc} foi expressa em ohms e N (concentração do vírus) em EID₅₀/mL.

1.6.4 - Imunossensor para Leishmaniose

A Leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar e febre negra, é a forma mais severa de leishmaniose. É o segundo maior assassino parasitário no mundo, depois da malária, responsável de uma estimativa de 60.000 que morrem da doença cada ano entre milhões de infecções mundiais. O parasita migra para os órgãos viscerais como fígado, baço e medula óssea e, se deixado sem tratamento, quase sempre resultará na morte do anfitrião mamífero. É uma doença crônica grave, potencialmente fatal para o homem, cuja letalidade pode alcançar 10% quando não se institui o tratamento adequado. É causada por espécies do gênero *Leishmania*, pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*. No Brasil, o agente etiológico é a *L. chagasi*, espécie semelhante à *L. infantum* encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia²⁴⁶. A Figura 21 mostra algumas imagens dos danos causados pelo parasita.

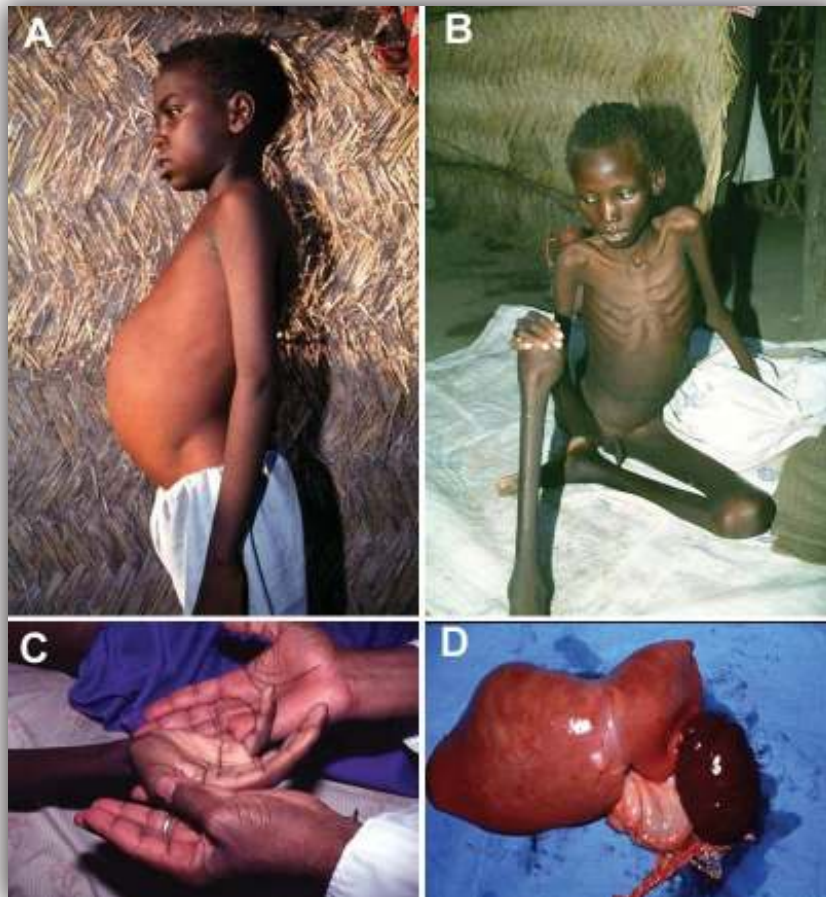


Figura 21: (A) Vista de perfil de um garoto adolescente, onde se observa esplenomegalia (aumento volume baço), abdômen distendido e severa perda muscular; (B) garoto de 12 anos, com esplenomegalia e severa perda muscular; (C) mãos ictericas de um paciente e (D) Aumento do baço e fígado em uma autópsia de uma criança. Todos os casos são decorrentes da leishmaniose visceral^k.

Atualmente, a LV é endêmica em 62 países, com um total estimado de 200 milhões de pessoas sob risco de adquirirem a infecção²⁴⁷. Aproximadamente 90% dos casos ocorrem em 5 países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil²⁴⁸.

A Figura 22, mostra os dados do Ministério da Saúde, de casos confirmados e notificados no Brasil no período de 2001 a 2008. Observa-se um crescente aumento no número de casos, apesar de campanhas de controle do vetor.

^k Imagens obtidas através do site: <http://pathmicro.med.sc.edu/parasitology/blood-proto.htm>; Acesso em: 06/08/2009.

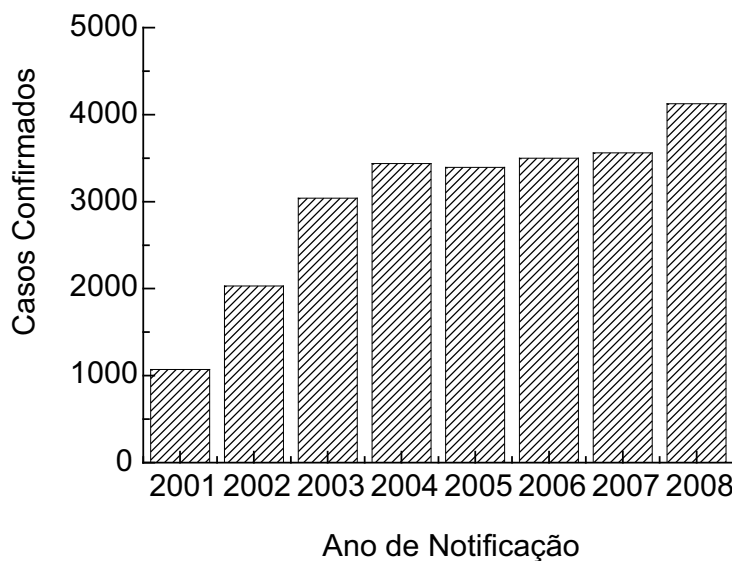


Figura 22: Casos confirmados de Leishmaniose visceral notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan¹.

No Brasil, a LV clássica acomete pessoas de todas as idades, mas na maior parte das áreas endêmicas, 80% dos casos registrados ocorrem em crianças com menos de 10 anos. A principal forma de transmissão do parasita para o homem e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília Phebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos. A *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* é a principal espécie transmissora da *L. chagasi* no Brasil. Os hospedeiros silvestres da *L. chagasi* até agora conhecidos são as raposas e os marsupiais. O fato destes animais possuírem hábitos sinantrópicos poderia promover a ligação entre os ciclos silvestre e doméstico. No ambiente doméstico, o cão é considerado um importante hospedeiro e fonte de infecção para os vetores, sendo um dos alvos nas estratégias de controle²⁴⁶. A Tabela 3, mostra o número de casos confirmados por estado no período de 2007 a 2008.

¹ **Fonte:** Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net, disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php> Acesso em: 29/07/2009.

Tabela 3: Casos confirmados de Leishmaniose visceral notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação por estado e ano notificação.

UF Notificação	2007	2008	Total
Rondônia	3	0	3
Amazonas	1	4	5
Roraima	2	2	4
Pará	370	365	735
Amapá	1	1	2
Tocantins	424	503	927
Maranhão	301	404	705
Piauí	363	475	838
Ceará	550	589	1139
Rio Grande do Norte	71	98	169
Paraíba	25	37	62
Pernambuco	76	92	168
Alagoas	32	26	58
Sergipe	75	40	115
Bahia	233	195	428
Minas Gerais	423	561	984
Espírito Santo	0	3	3
Rio de Janeiro	3	0	3
São Paulo	264	313	577
Paraná	3	3	6
Santa Catarina	1	1	2
Mato Grosso do Sul	234	260	494
Mato Grosso	31	59	90
Goiás	19	29	48
Distrito Federal	57	65	122
Total	3562	4125	7687

Observa-se que a doença atinge principalmente as populações pobres do país como os estados do Pará, Tocantins, Maranhão, Piauí, Ceará, Bahia e Mato Grosso do Sul. São Paulo e Minas Gerais também têm se destacado nesses dois últimos anos com um número significativo de casos notificados. Segundo informações do SINAN/Net em

Uberlândia foram notificados 11 casos de LV, no período de 2001 a 2008, sendo 5 destes somente no ano de 2008.

Dye & Willians²⁴⁹, baseados em dados de áreas endêmicas do Brasil, concluíram que crianças são mais susceptíveis à leishmaniose visceral quando são mais jovens e mais desnutridas, porém permanece desconhecida se a imunidade à leishmaniose visceral adquirida com a idade é sempre adquirida com resultado de infecção.

Embora existam métodos de diagnóstico e tratamento específicos, grande parte da população não tem acesso a estes procedimentos, elevando os índices de mortalidade. Segundo Dourado e colaboradores²⁵⁰ em áreas endêmicas, afastadas dos grandes centros, há carência de profissionais para a realização do diagnóstico da LV e muitas vezes são aplicados apenas critérios básicos como características clínicas e aspectos epidemiológicos.

Loureiro e colaboradores²⁵¹ analisaram, através de revisão da literatura, os diferentes exames diagnósticos utilizados nas formas cutânea, cutâneo mucosa e cutâneo difusa da leishmaniose, discutindo sua metodologia e indicação no curso evolutivo desta doença endêmica em muitas áreas do Brasil.

Segundo Gontijo e Melo²⁵², diferentes técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana e canina. Muitos avanços têm ocorrido nos últimos anos, mas a despeito do grande número de testes disponíveis para o diagnóstico da LV, nenhum apresenta 100% de sensibilidade e especificidade.

O diagnóstico clínico é complexo, pois a doença no homem pode apresentar sinais e sintomas que são comuns a outras patologias presentes nas áreas onde incide a LV, como, por exemplo, Doença de Chagas, Malária, Esquistossomose, Febre Tifóide e Tuberculose. Pacientes com LV apresentam febre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, leucopenia, anemia, hipergamaglobulinemia, tosse, dor abdominal, diarreia, perda de peso e caquexia. Por outro lado o diagnóstico parasitológico consiste na demonstração do parasito pode ser feita em material de biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos. A especificidade destes métodos é de 100%, mas a sensibilidade é muito variável, pois a distribuição dos parasitas não é homogênea no mesmo tecido²⁵².

Os métodos moleculares implantados a partir da década de 80, propõem várias técnicas de biologia molecular para a detecção e identificação precisa dos parasitas do gênero *Leishmania*, sem necessidade de isolamento do parasita em cultura. Métodos de hibridização com sondas específicas e técnicas de amplificação de ácidos nucleicos,

incluindo a reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (RTPCR), para detecção de RNA, e PCR para detecção de DNA, estão disponíveis para identificação do parasita. Schallig e Oskan²⁵³, investigaram vários sistemas baseados em produtos de PCR para *Leishmania*. Nos estudos com LV, a PCR tem sido utilizada com várias finalidades além do diagnóstico, tais como o monitoramento do tratamento e estudos epidemiológicos.

No diagnóstico imunológico, diferentes técnicas sorológicas têm sido utilizadas no diagnóstico da LV humana e canina. Os testes diferem em sua sensibilidade e especificidade, na sua aplicação prática nas condições de campo e na disponibilidade de reagentes. Os testes têm limitações, podem permanecer positivos durante longo tempo após o tratamento, não permitindo avaliação do efeito da terapia e podendo ocorrer reações cruzadas com outras doenças²⁵². Atualmente são usados os testes de aglutinação direta (DAT), reação de imunofluorescência indireta (RIFI), e ensaio imunoenzimático (ELISA), que utilizam antígenos brutos e são limitados em termos de especificidade e reprodutibilidade^{250,254}.

No Brasil, os testes mais utilizados no diagnóstico de LV humana e canina são a RIFI e ELISA, sendo considerados, sobretudo este último, testes de escolha para inquéritos populacionais. A RIFI apresenta baixa especificidade, exige na sua execução pessoal treinado, é uma reação dispendiosa e não está adaptada para estudos epidemiológicos em larga escala. Uma das principais limitações da técnica é a ocorrência de reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, doença de Chagas, malária, esquistossomose e tuberculose pulmonar²⁵⁴. Isto dificulta a interpretação dos dados epidemiológicos, pois no Brasil ocorre superposição da LV, sobretudo com leishmaniose tegumentar e doença de Chagas. O teste de ELISA é o mais utilizado para imunodiagnóstico de leishmaniose visceral. É um teste rápido, de fácil execução e leitura, sendo um pouco mais sensível e um pouco menos específico que a RIFI. O teste é sensível, permitindo a detecção de baixos títulos de anticorpos, mas é pouco preciso na detecção de casos subclínicos ou assintomáticos²⁵⁵. Os antígenos utilizados nos testes diagnósticos são quase sempre derivados de promastigotas de cultura, parasitas intactos ou moléculas solúveis. Estes antígenos apresentam reações cruzadas com outras espécies da família Trypanosomatidae, e mesmo com microrganismos filogeneticamente distantes²⁵⁴. Portanto, no diagnóstico sorológico da LV é necessário considerar o diagnóstico diferencial com outras doenças²⁵². Devido a isto, para a pesquisa de novos antígenos deve ser dada ênfase à componentes de antígenos

purificados que possam ser utilizados como ferramenta para obtenção de um diagnóstico específico, assegurando maior sensibilidade e especificidade aos testes.

Um antígeno recombinante bem estudado e já testado no Brasil é o rK39, específico para as espécies do complexo *L. donovani*. Este antígeno, quando empregado no ELISA, mostrou 100% de especificidade e 98% de sensibilidade²⁵⁶. Uma importante característica deste antígeno é que ele pode ser empregado em pacientes co-infectados com HIV, nos quais os níveis de anticorpos contra rK39 declinam rapidamente com o sucesso do tratamento²⁵⁷. Um teste imunocromatográfico simples e rápido, baseado na reação do soro ou sangue do paciente, foi desenvolvido utilizando-se o rK39 fixado em papel (Teste Rápido Anticorpo Leishmania donovani - TRALd)²⁵⁸. O TRALd pode apresentar reação cruzada com malária, febre tifóide e tuberculose. No Brasil, quando aplicado em cães de área endêmica, a sensibilidade foi de 92% e a especificidade de 99,5%²⁵².

No Brasil, a importância da leishmaniose visceral reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição, mas também na possibilidade de assumir formas graves e letais quando associada ao quadro de má nutrição e infecções concomitantes. Os métodos disponíveis para o diagnóstico e tratamento não apresentam a eficácia e aplicabilidade desejadas, embora avanços promissores tenham sido alcançados com as pesquisas de novos testes diagnósticos e drogas terapêuticas²⁴⁶.

Burns e colaboradores²⁵⁷, relataram a clonagem e expressão do antígeno rK39, demonstrando sua efetividade para a LV. O rK39 contém 39 amino ácidos que é parte de uma proteína de 230 kDa em tecidos amastigotas da *L. chagasi*. Esta proteína tem peso molecular de 32,7 kDa e pI 4,40 apresentando 6,5 repetições²⁵⁹: A sequência dos 39 amino ácidos que se repetem ao longo da proteína rk39, pode ser expressa como^m:

Leu Glu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Glu Glu Arg Ala Ala

Glu Leu Ala Ser Gln Leu Glu Ala Thr Ala Ala Ala Lys

Met Ser Ala Glu Gln Asp Arg Glu Asn Thr Arg Ala Thr

^m Disponível em: <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p1&u=%2Fnethtml%2FPTO%2Fsearchbool.html&r=6&f=G&l=50&col=AND&d=PTXT&s1=rK39&OS=rK39&RS=rK39>; Acesso em 02/08/2009.

OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral e justificativas

O objetivo geral do trabalho é investigar e caracterizar a eletropolimerização de um polímero, ainda não reportado na literatura, derivado do ácido 4-hidroxibenzóico (4-HBA). O 4-HBA é um material eletroquimicamente ativo que apresenta em sua estrutura química dois grupos funcionais, uma hidroxila (-OH) e uma carboxila (-COOH). A utilização deste monômero se deve ao fato deste possuir os grupos funcionais que podem interagir com as biomoléculas, formando ligações com estas, garantindo assim maior estabilidade na construção de biossensores e diminuindo efeitos como os de lixiviação. É bem conhecido que as propriedades físicas e químicas do polímero dependem fortemente das condições de síntese, tais como técnicas eletroquímicas, solvente e pH. Desta forma foi investigada a síntese e caracterização eletroquímica do poli(4-HBA) bem como a extração do polímero e caracterização por técnicas como: calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TG), fluorescência, infravermelho (FTIR), para contribuir para a compreensão do mecanismo de polimerização bem como para visualizar possíveis aplicações para este novo material.

As plataformas de poli(4-HBA) foram avaliadas na construção de genossensores e imunossensores. Para os genossensores avaliou-se a imobilização de oligonucleotídeos contendo 16 pares de base, poliGA (guanosina e adenosina monofosfato) e posterior detecção com o alvo complementar poliCT (citossina e timidina monofosfato). A detecção dos eventos de hibridização foi realizada utilizando-se BE e AM como intercaladores. No caso dos imunossensores, investigou-se a imobilização do antígeno rK39, sobre as plataformas funcionalizadas. O reconhecimento do anticorpo específico pra leishmaniose visceral foi conduzido por medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica.

2.2 – Objetivos específicos

- ✓ Eletropolimerizar o ácido 4-hidroxibenzoico sobre eletrodos de grafite;
- ✓ Caracterizar eletroquimicamente o poli(4-HBA) pela técnica de voltametria cíclica;
- ✓ Avaliar a estabilidade eletroquímica do poli(4-HBA);
- ✓ Caracterizar a morfologia dos eletrodos de grafites modificados;
- ✓ Eletropolimerizar o 4-HBA em função do pH do meio reacional;
- ✓ Caracterizar por voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica e microbalança eletroquímica de cristal de quartzo o poli(4-HBA) eletropolimerizado em diferentes valores de pH;
- ✓ Extrair o poli(4-HBA) para análises estruturais, fotoquímicas e ópticas;
- ✓ Caracterizar as propriedades térmicas do polímero gerado por calorimetria diferencial exploratória e análise termogravimétrica;
- ✓ Caracterizar as propriedades de fluorescência e UV-Vis do poli(4-HBA);
- ✓ Reconhecer os grupos funcionais presentes no polímero por análises de FTIR;
- ✓ Propor o mecanismo da reação de eletropolimerização;
- ✓ Avaliar as plataformas de poli(4-HBA) na imobilização de biomoléculas;
- ✓ Avaliar a construção do genossensor com detecção direta de oligonucleotídeos imobilizados sobre os filmes poliméricos de poli(4-HBA)
- ✓ Avaliar a resposta do genossensor utilizando-se intercaladores eletroativos como o AM e BE, para detecção dos eventos de hibridização dos oligonucleotídeos;
- ✓ Avaliar a construção do imunossensor impedimétrico para Leishmaniose visceral pela imobilização do antígeno rK39, e posterior reconhecimento do anticorpo IgG.

SEÇÃO EXPERIMENTAL

3.1 – Materiais e Soluções

Todas as soluções utilizadas no procedimento de eletropolimerização bem como as de análise de caracterização foram preparadas imediatamente antes de cada procedimento, e deaeradas com N₂ por cerca de 40 minutos, antes do uso.

Todos os reagentes químicos utilizados neste trabalho foram de grau analítico, sendo utilizados sem procedimentos de purificação. Para preparo das soluções aquosas, foi utilizada água ultra purificada em sistema Millipore Milli-Q, com resistividade ≥ 18 M Ω cm.

O procedimento de preparo para cada solução utilizada no contexto deste trabalho é descrito abaixo:

-  ***Solução de Ácido Perclórico (0,50 mol dm⁻³):*** pipetou-se 43,20 cm³ de HClO₄ concentrado (Merck, 98%) e o volume foi transferido para um balão volumétrico de 1,0 dm³ sendo completado com água deionizada.

-  ***Solução de ferro/ferricianeto de potássio (5,00 mmol dm⁻³;contendo 0,10 mol dm⁻³ de KCl):*** pesou-se 0,1646 g de K₃Fe(CN)₆ (Reagen, 99%) ; 0,2112 g de K₄Fe(CN)₆.3H₂O (Vetec, 99%) e 0,7456 g de KCl (Vetec, 99%). As massas foram transferidas para um balão volumétrico de 100,0 cm³ e o volume completado com água deionizada.

-  ***Solução de ferro/ferricianeto de potássio (5,00 mmol dm⁻³;contendo 1,00 mol dm⁻³ de KCl):*** pesou-se 0,1646 g de K₃Fe(CN)₆ (Reagen, 99%) ; 0,2112 g de K₄Fe(CN)₆.3H₂O (Vetec, 99%) e 7,4560 g de KCl (Vetec, 99%). As massas foram transferidas para um balão volumétrico de 100,0 cm³ e o volume completado com água deionizada.

-  ***Solução de cloreto de hexaaminrrutênio(II) (5,00 mmol dm⁻³;contendo 0,10 mol dm⁻³ de KCl):*** pesou-se 0,0343 g de [Ru(NH₃)₆]Cl₂ (Aldrich, 99,9%) e 0,1864 g de KCl (Vetec, 99%). As massas foram transferidas para um balão de 25,0 cm³ e o volume completado com água deionizada.

- ✚ **Solução de 4-HBA ($2,50 \text{ mmol dm}^{-3}$):** pesou-se 0,0345 g de 4-HBA (Acros Organics, 99%), transferiu-se para um balão de $100,0 \text{ cm}^3$ e o volume foi ajustado com solução aquosa de HClO_4 $0,50 \text{ mol dm}^{-3}$.
- ✚ **Solução de NaOH ($0,10 \text{ mol dm}^{-3}$):** pesou-se 0,4000 g de NaOH (Vetec, 99%), transferiu-se a massa para um balão volumétrico de $100,0 \text{ cm}^3$, sendo o volume completado com água deionizada.
- ✚ **Solução Tampão Fosfato ($0,10 \text{ mol dm}^{-3}$; pH 7,40):** foram pesadas 4,3500 g de Na_2HPO_4 (Vetec, 99%) e 2,3200 g de NaH_2PO_4 (Vetec, 99%). As massas foram transferidas para um balão volumétrico de $500,0 \text{ cm}^3$ e o volume ajustado com água deionizada. Antes de completar o volume desejado, o pH da solução foi ajustado para 7,40 com solução de NaOH $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$.
- ✚ **Solução Tampão TBS (50 mmol dm^{-3} de Tris-HCl; pH 7,50, contendo 150 mmol dm^{-3} de NaCl):** pesou-se 3,9410 g de Tris-HCl (Ultra pure, 99%) e 4,3830 g de NaCl (Vetec, 99%). As massas foram transferidas para um balão volumétrico de $500,0 \text{ cm}^3$, antes de completar o volume, o pH foi ajustado para o valor de 7,50 com solução de NaOH $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$.
- ✚ **Solução poliGA ($0,063 \text{ mmol dm}^{-3}$):** os oligonucleotídeos sintéticos de poliGA foram obtidos como pó liofilizados da Invitrogen, contendo a seguinte sequência com 16 pares de base: 5'-GGGGGGGGAAAAAAA-3'. De acordo como número de mols rotulado no frasco, o volume foi ajustado com água deionizada até a concentração desejada. Esta solução foi denominada como sonda.
- ✚ **Solução poliCT ($0,183 \text{ mmol dm}^{-3}$):** os oligonucleotídeos sintéticos de poliCT foram obtidos como pó liofilizados da Invitrogen, contendo a seguinte sequência com 16 pares de base: 5'-CCCCCCCCTTTTTTTT-3'. De acordo como número de mols rotulado no frasco, o volume foi ajustado com água deionizada até a concentração desejada. Esta solução foi denominada como alvo, sendo sua concentração 3x maior que a sonda.

✚ **Solução de AM ($5,00 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, contendo 20 mmol dm^{-3} de NaCl):** pesou-se 0,0016 g de $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{ClS}$ (Vetec, 98-103%); 0,0117 g de NaCl (Vetec, 99%). As massas foram transferidas para um balão volumétrico de $10,0 \text{ cm}^3$ e o volume completado com água deionizada.

✚ **Solução de BE ($5,00 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, contendo 20 mmol dm^{-3} de NaCl):** pesou-se 0,0020 g de $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$ (Vetec, 97%); 0,0117 g de NaCl (Vetec, 99%). As massas foram transferidas para um balão volumétrico de $10,0 \text{ cm}^3$ e o volume completado com água deionizada.

✚ **Solução de BSA (0,5 %):** pesou-se 0,0500 g de albumina de soro bovino - BSA (Gold Lab), transferiu-se para um balão volumétrico de $10,0 \text{ cm}^3$, sendo o volume ajustado com água deionizada.

✚ **Solução de rK39 ($6,67 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$):** as amostras do antígeno rK39 foi preparada a partir de diluições da solução estoque fornecidas pelo INGEB-UFU. Desta forma, da amostra dosada como $2,00 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, pipetou-se $0,5 \mu\text{L}$ e completou-se com solução tampão TBS para o volume final de $150 \mu\text{L}$.

✚ **Solução de IgG+ ($66,7 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$):** as amostras do anticorpo IgG+ (Visceral) foi preparada a partir da diluição da solução estoque fornecidas pelo INGEB-UFU, contendo $11,8 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. Assim, pipetou-se $0,5 \mu\text{L}$ do anticorpo positivo para LV, e completou-se com solução tampão TBS para o volume final de $150 \mu\text{L}$.

✚ **Solução de IgG- ($66,7 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$):** as amostras do anticorpo IgG- (contraprova) foi preparada a partir da diluição da solução estoque fornecidas pelo INGEB-UFU, contendo $6,87 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. Assim, pipetou-se $1,5 \mu\text{L}$ do anticorpo negativo para LV, e completou-se com solução tampão TBS para o volume final de $150 \mu\text{L}$.

3.2 – Procedimento Experimental

3.2.1 – Preparação e construção dos eletrodos de trabalho

Os eletrodos de grafite foram preparados conforme procedimento apresentado na Figura 23. Barras de grafite (100 x 0,6 mm) foram obtidas da Alfa Aesar (99,9999%). Na etapa I, utilizando-se uma micro-retífica, as barras foram cortadas em tamanhos menores, para construção dos eletrodos. Neste processo, a espessura do grafite obtida foi de $\pm 1-2$ mm.

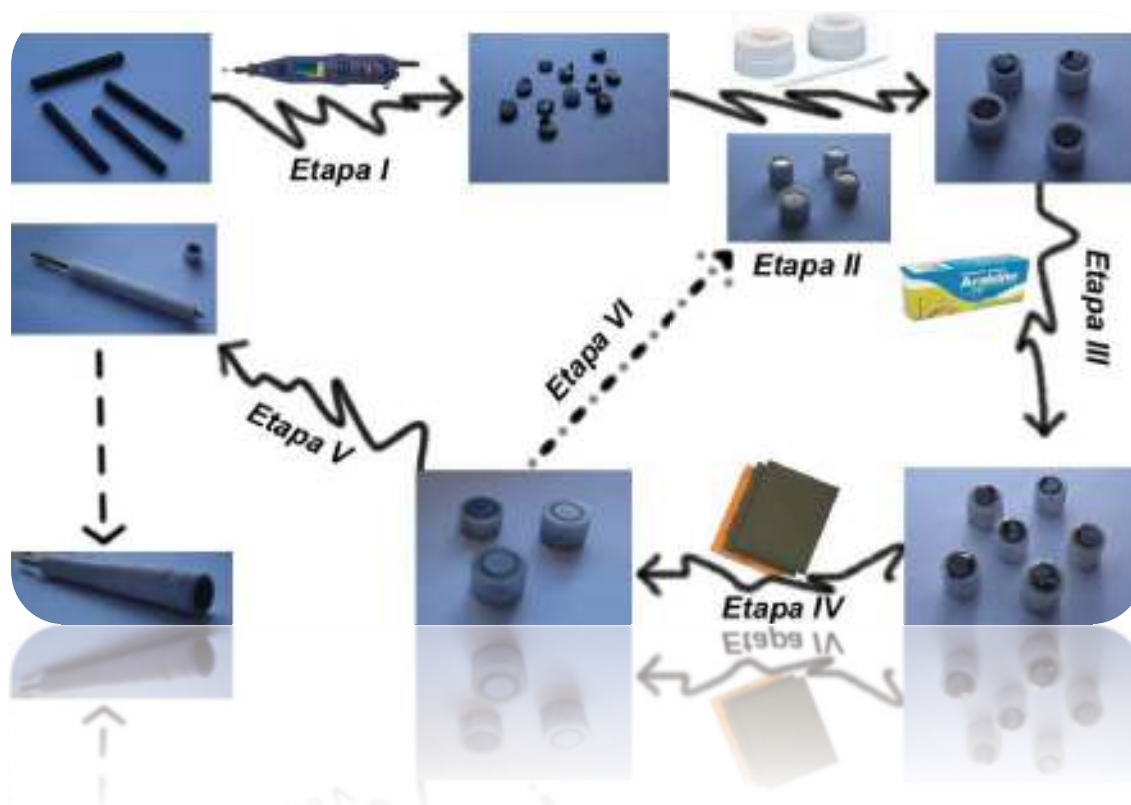


Figura 23: Procedimento de preparação dos eletrodos de grafite.

Posteriormente, o grafite foi colado sobre uma base de teflon, contendo no interior latão, neste processo cola de prata foi utilizada, para diminuir a resistência entre o grafite e o latão (Etapa II). Na etapa III, após o tempo de cura da cola de prata, estimado em cerca de 24 h, os espaços vazios entre a base e o teflon foi preenchido com cola Araldite® 24 h. Após o período de 24 h, estes eletrodos foram lixados primeiramente em lixa d'água 200 e em seguida 1200 (Marca 3M), para remoção do excesso de Araldite® e polimento da superfície do eletrodo. Assim, o polimento final

foi realizado com suspensão aquosa de alumina 0.30 μm (Micropolish A, Buehler) sobre feltro (Etapa IV), então o eletrodo foi limpo em água com ultrassom por 10 min., e enxaguado com água destilada em abundância e seco com N_2 ultra puro. Finalmente estes eletrodos de grafite são conectados ao suporte de base para utilização, conforme mostrado na etapa V. Após a utilização dos eletrodos para as medidas, os mesmos eram desmontados da base de teflon, e o processo de preparo dos mesmo era reiniciado, conforme a etapa VI.

3.2.2 – Condicionamento e seleção dos eletrodos

Antes do procedimento de eletropolimerização, os eletrodos foram condicionados eletroquimicamente. Neste procedimento os EG foram ciclados sucessivamente com 3 ciclos de potencial na faixa de +0,00 a +1,40 V em solução de HClO_4 . Posteriormente, os eletrodos foram lavados com água deionizada, secos sob fluxo de N_2 e analisados em solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, cobrindo a faixa de potencial de -0,20 a +0,80 V. Os VC foram registrados para posterior análise.

Eletrodos de Ag/AgCl, KCl (3,00 mol dm^{-3}) e placa de platina (área 1,0 cm^2) foram utilizados como eletrodos de referência e auxiliar, respectivamente para todas as análises realizadas neste trabalho. Os potenciostatos utilizados foram CH Instruments modelo 760C, e EcoChemie modelo 302N com módulo FRA2.

3.2.3 – Eletropolimerização do 4-HBA

Para eletropolimerização do 4-HBA foi utilizada célula eletroquímica de três compartimentos, com volume total de trabalho em cerca 25 mL (Figura 24-A). O eletrodo de trabalho utilizado foi um disco de grafite, com área geométrica nominal de aproximadamente 29,7 mm^2 .

A eletropolimerização utilizando-se VC como técnica eletroquímica. Foram realizados 100 ciclos de potencial com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , na faixa de potencial de +0,00 a +1,40 V em solução aquosa contendo do 4-HBA.

Nas investigações da eletropolimerização em função do pH, utilizou-se o mesmo procedimento, contudo as soluções de 4-HBA foram ajustadas para os respectivos pH de análise com solução de NaOH. Os valores de pH selecionados foram pH 0,50; 7,03 e 12,13. Para cada pH estudado a faixa de potencial investigada foi alterada sendo: +0,00

a +1,40 V (pH 0,50); -0,40 a +1,20 V (pH 7,03) e -0,40 a +0,90 V (pH 12,13). Foram mantidos constantes a velocidade de varredura e o número de ciclos. Todos os experimentos foram realizados a temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$).



Figura 24: Materiais utilizados nos estudos com poli(4-HBA): (A) célula eletroquímica, (B) eletrodo de cristal de quartzo, (C) eletrodos cilíndricos de grafite.

Após eletropolimerização, os eletrodos contendo os filmes poliméricos de poli(4-HBA) foram lavados com água em abundância, e secos sob fluxo de N_2 . Posterior a este procedimento os eletrodos foram mergulhados em solução contendo somente HClO_4 na ausência do monômero, e 10 ciclos de potencial foram realizados na mesma faixa de eletropolimerização para remoção do “*monômero residual*”.

Análises do comportamento eletroquímico do eletrodo de grafite modificado com poli(4-HBA), foram conduzidas em solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, na faixa de potencial de $-0,20$ a $+0,80$ V e em solução de HClO_4 na faixa de $+0,20$ a $+0,90$ V. Quando avaliado o comportamento do EG/4-HBA eletropolimerizado em valores de pH 7,03 e 12,13, a solução de HClO_4 foi ajustada para o respectivo pH, utilizando-se NaOH , e as faixas de varredura foram de $-0,40$ a $+0,50$ V (pH 7,03) e $+0,00$ a $+0,40$ V (pH 12,13).

3.2.4 – Transporte iônico

Os EG/4-HBA foram caracterizados por voltametria cíclica em função da velocidade de varredura cobrindo o intervalo de 5 a 300 mV s^{-1} . Neste procedimento os VC foram obtidos em solução aquosa HClO_4 na ausência de monômero. Os processos eletroquímicos do poli(4-HBA) foram caracterizados pelos valores de I_{pa} em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.

3.2.5 – *Propriedades de troca iônica*

As propriedades de troca de iônica para os eletrodos EG e EG/4-HBA foram investigadas pelo estudo da reação de transferência eletrônica nas superfícies modificadas utilizando-se dois diferentes pares redox denominados ferrocianeto/ferricianeto de potássio (sonda redox negativa) e cloreto de hexaaminrutênio (III) (sonda redox positiva). Medidas por voltametria cíclica foram conduzidas em $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ na faixa de potencial de -0,20 a +0,80 V e de $Ru(NH_3)_6Cl_2$ na faixa de potencial de -0,40 a +0,15V. Estudos também foram conduzidos somente em solução do eletrólito suporte (solução aquosa de KCl), na mesma região de potencial utilizada na investigação dos pares redox, afim de verificar a contribuição da eletroatividade dos filmes de poliméricos no processo de transferência eletrônica dos pares redox utilizados.

3.2.6 – *Medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica*

Os espectros de impedância eletroquímica dos eletrodos de grafite modificados com poli(4-HBA) nos diferentes pHs de eletropolimerização foram obtidos em solução aquosa de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$. A solução de análise foi deaerada com nitrogênio ultra puro por cerca de 40 min, e os eletrodos modificados permaneceram em contato com a solução por cerca de 15 minutos. O intervalo de frequência investigado foi de 10^6 a 10^{-2} Hz. A amplitude de excitação senoidal foi de 10 mV (p/p) sendo potencial aplicado de +0,30V. O ajuste dos resultados experimentais, a um circuito equivalente apropriado foi realizado com software provido pelo equipamento.

3.2.7 – *Medidas de Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo*

Para as medidas de frequência ressonante do cristal de quartzo, foi utilizado potenciostato da CH Instruments Modelo 420A. Neste caso, o eletrodo de trabalho é um cristal de quartzo, com corte AT de 8 MHz com depósitos de filmes de ouro em ambos os lados do cristal que tem 0,25 cm de diâmetro (Figura 24-B). Um eletrodo de fio de platina foi utilizado como eletrodo auxiliar e fio de Ag/AgCl, KCl (3,00 mol dm^{-3}) como eletrodo de referência. Antes da eletropolimerização, o eletrodo de trabalho foi lavado com éter de petróleo, acetona e água deionizada e seco com N_2 .

Foi realizado um polimento eletroquímico, para limpeza e homogeneização da superfície do eletrodo de ouro, com ciclos de potencial entre -0,25 V a +1,25 V em solução de H_2SO_4 0,20 mol dm^{-3} . As medidas de frequência em função do potencial foram registradas concomitantemente com os voltamogramas cíclicos. Os experimentos foram realizados em velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , com 10 ciclos de potencial para cada experimento. Investigações sobre a eletropolimerização foram conduzidas em função do pH, nos valores de 0,80, 7,04 e 12,13. A equação de Sauerbrey²⁶⁰ foi utilizada para calcular as mudanças de massa no cristal de quartzo através das medidas de mudança de frequência, utilizando-se a seguinte relação:

$$\Delta f = \frac{-2f_0^2 \Delta m}{A\sqrt{\mu\rho}}$$

onde, A é a área do disco de ouro ($A = 0,205 \text{ cm}^2$), ρ é a densidade do cristal de quartzo ($\rho = 2,648 \text{ g.cm}^{-3}$), μ é o modulo cisalhamento do cristal ($\mu = 2,947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$), f_0 é a frequência fundamental do cristal (f_0 mostra ser entre 7.995 MHz e 7.950 MHz). Os valores de f_0 para cada experimento foram: 7,982 MHz para pH 0,80, 7,982 MHz para pH 7,04 e 7,980 MHz para pH 12,04.

3.2.8 – Medidas de estabilidade eletroquímica

As análises de estabilidade eletroquímica foram realizadas em solução aquosa de ácido perclórico, utilizando-se os EG/4-HBA eletropolimerizados nos diferentes valores de pH, por meio de sucessivos ciclos de potencial na região de atividade eletroquímica dos filmes obtidos, ou seja, +0,20 a +0,90 V (pH 0,50); -0,40 a +0,50 V (pH 7,03) e +0,00 a +0,40 V (pH 12,13). Foram realizados 100 ciclos e as velocidades de varredura investigadas foram de 10, 20, 50 e 100 mV s^{-1} .

3.2.9 – Microscopia de força atômica

A Morfologia dos filmes foi investigada utilizando-se microscopia de força atômica (MFA), em instrumento da Nanoscope IIIa, Digital Instruments. A rugosidade dos filmes foi estimada pelo software provido pelo equipamento.

3.2.10 – Medidas de UV-Vis

Os espectros de absorção na região do UV-Vis foram obtidos usando espectrofotômetro da Shimadzu modelo UV-1650PC. As medidas foram realizadas em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm. Acetonitrila (Vetec, UV/HPLC espectroscópico 99,8%), e soluções de HClO_4 , tampão fosfato e NaOH foram utilizadas como solventes para as amostras analisadas.

3.2.11 – Extração do poli(4-HBA)

O procedimento para eletrogeração do poli(4-HBA) em quantidade suficiente para que se pudesse realizar análises químicas foi análogo ao descrito no item 3.2.3. Contudo neste procedimento, a eletropolimerização foi conduzida utilizando-se o monômero em concentração de $25,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, em meio de ácido perclórico $2,50 \text{ mol dm}^{-3}$. Foram utilizados 200 ciclos de potencial, cobrindo-se o intervalo de potencial de +0,00 a +1,30 V, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} sobre eletrodos de cilindro de grafite (30 x 0,6 mm), com área geométrica de aproximadamente $6,21 \text{ cm}^2$ (Figura 24-C). Eletrodos cilíndricos de grafite e Ag/AgCl, KCl ($3,00 \text{ mol dm}^{-3}$) foram utilizados como auxiliar e referência, respectivamente. Após eletropolimerização os eletrodos foram lavados em água deionizada e secos em fluxo de N_2 ultra puro.

Após este procedimento os eletrodos de trabalho foram imersos em acetonitrila (Vetec, UV/HPLC Espectroscópico 99,8 %) e levados a ultrassom por cerca de 2 h. Após este período esta solução foi tratada com sulfato de sódio anidro (Vetec, 99,0%) para remoção de água. A solução foi filtrada em algodão e a extração do poli(4-HBA) foi conduzida a partir da solução resultante por rotoevaporação do solvente a vácuo e temperatura controlada de 35°C . O material sólido coletado foi então utilizado para as análises de caracterização, sendo este mantido protegido da luz e umidade em dessecador a vácuo durante o período de utilização do material para as análises.

3.2.12 – FTIR

Espectros de FTIR foram obtidos para o monômero e o polímero extraído em pastilhas de KBr, em faixa de comprimento de onda de 500 a 4500 cm^{-1} , utilizando-se 20 ciclos e resolução de 2 ou 4 cm^{-1} , conforme necessidade. O equipamento utilizado foi

o IR Prestige-21 da Shimadzu. Espetros de FTIR também foram registrados após tratamento do poli(4-HBA) sobre aquecimento em mufla, por 15 minutos, em atmosfera inerte de nitrogênio, a temperaturas de 150, 300, 450 e 600 °C.

3.2.13 – DSC e TG

Foram obtidas medidas para informações das transições de fase por calorimetria diferencial exploratória para o monômero e polímero extraído, usando-se equipamento da Rheometric Scientific DSC-SP sobre fluxo de nitrogênio de 20 cm³ min⁻¹ com velocidade de aquecimento de 20 °C min⁻¹ de 25 a 400 °C.

A estabilidade térmica foi obtida por meio de análise termogravimétrica (TG), conduzida sobre atmosfera de nitrogênio (70 cm³ min⁻¹), com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ de 25 a 800 °C em equipamento SDT da TA Instruments.

3.2.14 – Análises de Fluorescência

Os respectivos espectros fluorescência para o monômero e poli(4-HBA) extraído foram registrados em concentração do monômero de 0,010 g L⁻¹ e do poli(4-HBA) em 0,40 g L⁻¹, em meio de HClO₄ (pH 0,30) e NaOH (pH 13,7).

Investigações foram conduzidas variando-se a polaridade dos solventes para ambas as amostras. Neste caso, utilizou-se água, etanol, acetonitrila, dimetilssulfóxido e dimetilformamida. Todas os espectros de fluorescência foram realizadas a temperatura ambiente utilizando-se Fluorímetro Hitachi F-4500.

3.2.15– Microscopias ópticas

Imagens de Microscopia Óptica foram obtidas em Microscópio da Olympus modelo BX41M. As amostras foram submetidas a ampliações variadas, sendo as imagens processadas e analisadas pelo software do equipamento.

3.2.16 – Procedimento de construção do genossensor

Os eletrodos de EG/4-HBA, antes do procedimento de imobilização das biomoléculas foram colocados em contato com a solução tampão fosfato por cerca de

30 min. Este procedimento garante maior estabilização da linha base para as medidas, devido à estabilização do filme polimérico neste meio. Registros da linha base foram obtidos até estabilização da mesma, utilizando-se VPD, VC ou VL foram utilizados cerca de 15 voltamogramas. Após o procedimento, o eletrodo foi retirado da solução tampão e seco imediatamente com fluxo de N₂ ultra puro.

A imobilização da sonda foi realizada por adsorção da solução de poliGA diretamente sobre esta superfície. Utilizou-se cerca de 18 µL da solução de poliGA, sendo este volume suficiente para cobrir a área do eletrodo de trabalho. O eletrodo foi mantido em ambiente controlado a 42 °C até evaporação desta solução, cerca de 20 min. Após este período o eletrodo foi lavado em solução tampão por 6 s, sob agitação constante, para remoção de adsorções não específicas e seco com N₂ ultra puro.

O procedimento de hibridização foi realizado com este eletrodo contendo a sonda. Neste caso, o mesmo procedimento foi realizado, contudo a solução alvo (18 µL de poliCT) foi adicionada sobre a superfície mantendo-se o eletrodo a 42 °C por 15 min. Novamente realizou-se lavagem em tampão fosfato por 6 s, e posterior secagem com N₂.

Medidas de detecção direta da oxidação das bases guanina e adenina, foram realizadas em tampão fosfato na faixa de +0,60 a +1,30 V, utilizando-se voltametria linear de varredura.

Quando utilizado os intercaladores AM e BE, cerca de 18 µL de cada um destes foi colocado em contato com a superfície dos eletrodos ssDNA/EG/4-HBA e dsDNA/EG/4-HBA por 5 min, sendo então lavados em tampão fosfato por 6 s, e secos com N₂. A detecção indireta do evento de hibridização foi então conduzida pela eletroatividade do intercalador. Para o AM utilizou-se a redução da faixa de potencial de +0,30 a -0,70 V e para o BE a oxidação na faixa de potencial de +0,30 a +0,90 V. Os parâmetros de VPD utilizados para ambos os intercaladores foram: amplitude: 25 mV; período do pulso: 0,20 s; velocidade de varredura: 20 mV s⁻¹.

3.2.17 – Procedimento de construção do imunossensor

As amostras do antígeno rK39, específico para Leishmaniose Visceral em concentração de 2,0 µg µL⁻¹ foram fornecidas pelo Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, coordenador do Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

As amostras dos anticorpos foram obtidas de soros de pacientes diagnosticados positivamente para Leishmaniose Visceral cedidos pelo Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, onde foram caracterizados. A doutoranda, Juliana Franco Almeida, responsável pela purificação dos anticorpos, utilizou o seguinte procedimento de purificação que está descrito no item 3.2.17.1.

3.2.17.1 – Purificação dos anticorpos

A purificação de imunoglobulinas foi realizada por imunocromatografia a partir de um pool destes soros, utilizando coluna de proteína A sepharose. A coluna foi equilibrada com 10 volumes de tampão fosfato ($0,10 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 8,00). As amostras de soro diluídas (v/v) foram acrescentadas à resina e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, a coluna foi lavada com tampão fosfato, sendo a absorbância a 280 nm monitorada em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro – Amersham Biosciences) até igualar-se a zero. Cada amostra foi eluída com tampão glicina ($0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ pH 2,70), sendo coletada frações de 1,00 mL que foram também monitoradas por leitura espectrofotométrica. As frações com maiores leituras foram reunidas e o pH neutralizado com NaOH $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$. Assim, foram transferidas para membrana de diálise, concentradas em açúcar comercial (1 h, 4°C) e em seguida dialisadas em 3,00 L de tampão fosfato durante toda a noite em câmara fria a 4°C .

A quantidade de anticorpos obtida foi estimada pelo método de detecção e quantificação de proteínas descrito por Johnstone e Thorpe²⁶¹, onde:

$$C_{\text{amostra}} = \frac{\text{Absorbância}_{280\text{nm}}}{\text{Coeficiente de extinção}_{280\text{nm}} \times 10 \text{ mg dm}^{-3}}$$

onde; o coeficiente de extinção é 13,6 para IgG.

A visualização das amostras foi realizada por SDS PAGE 16%.

3.2.17.2 – Imobilização e detecção das biomoléculas

A estabilização dos eletrodos na solução de medida foi realizada com o mesmo procedimento utilizado na imobilização dos oligonucleotídeos. Porém, nos ensaios de imobilização e detecção do imunossensor foi utilizado tampão TBS e não fosfato.

Depois de registrados os VPD da estabilização da linha base dos EG/4-HBA, o antígeno foi imobilizado sobre a superfície funcionalizada. Para este procedimento, 18 μL da solução de rK39, foi colocada sobre a superfície do eletrodo, e o mesmo foi mantido a 42 °C, até evaporação do solvente. Posteriormente o eletrodo foi lavado em tampão TBS por 6 s, e seco com N_2 .

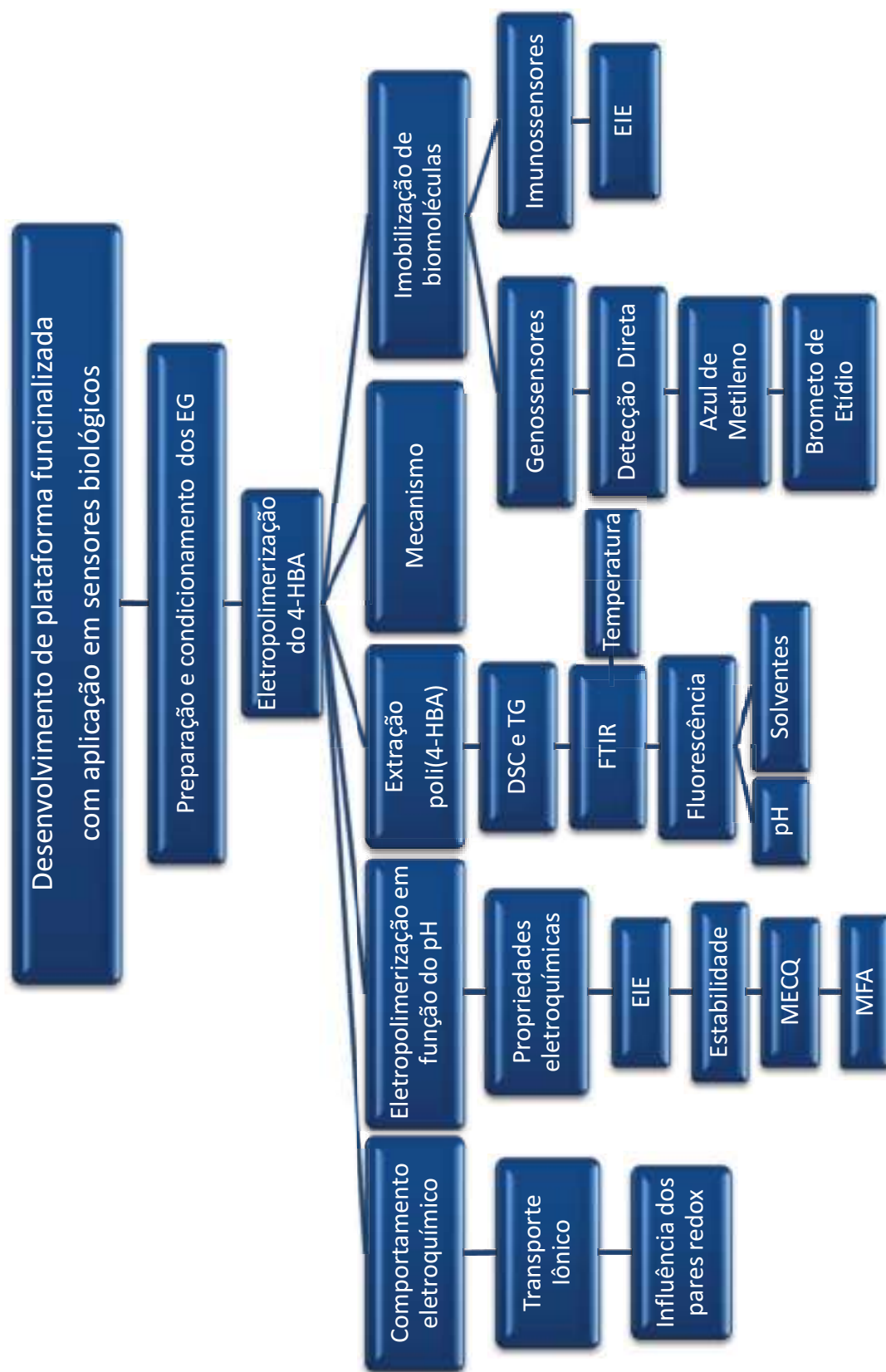
Contudo, antes da imobilização dos anticorpos, a superfície contendo a sonda rK39, foi imersa em solução BSA, por 20 min a 42 °C. Este procedimento, garante o bloqueio da superfície do eletrodo contra adsorções inespecíficas. Após o período o eletrodo foi lavado também em solução de tampão TBS por 6 s, e seco com N_2 .

Posteriormente, realizou-se imobilização dos anticorpos positivo (IgG+) e negativo (IgG-, contra prova) para a leishmaniose visceral. Cerca de 18 μL de cada anticorpo foi adicionada sobre a superfície do eletrodo contendo rK39/BSA, por um período de 20 minutos a 42 °C, para promover a reação de formação do complexo antígeno-anticorpo. Os imunossensores foram lavados por 6 s, em tampão TBS e seco com N_2 ultra puro.

Medidas de EIE foram utilizadas para detecção da superfície contendo o Ag e Ag-Ac. O procedimento foi similar as medidas de EIE para o EG/4-HBA, mas neste caso variou-se apenas o potencial aplicado, o qual foi definido em +0,25 V e a excitação senoidal em 5 mV. Os espectros de EIE foram obtidos imediatamente após contato com a solução de ferrocianeto/ferricianeto. Outro parâmetro avaliado nas medidas de EIE com o imunossensor foi a concentração do eletrólito suporte que foi aumentada em 10x, mantendo-se os parâmetros constantes.

Todos os experimentos de detecção das biomoléculas, exceto as medidas de impedância, foram realizados em célula eletroquímica de um compartimento, com capacidade total de 1,0 cm^3 .

3.3 – Fluxograma do procedimento experimental



RESULTADOS E DISCUSSÕES

Estudos sobre a eletropolimerização do 4-HBA foram realizados objetivando a construção de plataformas funcionalizadas para incorporação de biomoléculas a serem utilizadas e aplicadas na construção de sensores biológicos. A modificação eletroquímica de eletrodos com filmes poliméricos tem sido muito utilizada para proteger a superfície contra impurezas, interferentes, e fornecer biocompatibilidade com as amostras e analitos de interesse. Assim, estudos como: estabilidade, eficiência no transporte de corrente, quantidade e eletroatividade do material eletrogerado, dentre outros parâmetros foram avaliados. É importante ressaltar que nenhuma literatura foi encontrada para esse composto até o presente momento, com este objetivo bem como a aplicação/eletropolimerização do ácido 4-hidroxibenzóico.

4.1 – Eletropolimerização, atividade e estabilidade eletroquímica dos filmes poliméricos derivados do ácido 4-hidroxibenzóico

4.1.1 – Preparação e condicionamento dos eletrodos

Antes do procedimento de eletropolimerização, os eletrodos de grafite foram selecionados e condicionados para o uso. Os perfis dos voltamogramas cíclicos padrão para os eletrodos a serem utilizados são mostrados na Figura 25.

Os parâmetros de interesse obtidos em um VC são a relação das correntes de pico (I_{pa}/I_{pc}) e a separação dos potenciais de pico ($E_{pa} - E_{pc}$). Para uma onda nernstianaⁿ, com um produto estável, a relação $I_{pa}/I_{pc} = 1$ independente da velocidade de varredura²⁶².

No parâmetro referido como seleção, os eletrodos de grafite foram avaliados utilizando-se solução aquosa do par redox $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,0 mmol dm⁻³ contendo KCl 0,10 mol dm⁻³ como eletrólito suporte. A escolha deste par redox se deve ao fato do mesmo apresentar comportamento eletroquímico muito bem conhecido e definido, sendo considerado portanto como um padrão eletroquímico²⁶².

ⁿ Seguem a Equação de Nernst ($E = E^0 - 0,0592/n \log[oxi]/[red]$; sendo n = numero elétrons envolvidos), para reações reversíveis concentrações das espécies oxidadas (oxi) e reduzida (red) são função do potencial, possuindo portanto um comportamento nernstiano.

Para uma reação reversível, os picos de corrente catódica e anódica são aproximadamente iguais em valores absolutos, mas com sinais opostos. Desde modo para uma reação reversível, a diferença entre os potenciais de pico ΔE_p é descrita de acordo com a Equação 6:

Equação 6:

$$\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| = \frac{59 \text{ mV}}{n}$$

onde n é o numero de elétrons envolvidos na semi-reação.

A irreversibilidade causada por cinéticas lentas de transferência de elétrons resulta em valores de ΔE_p que excedem os valores previstos, ou seja maiores que 60 mV/n. Contudo na prática, valores de ΔE de até 100 mV são considerados para reações reversíveis.

Para uma reação reversível, ou seja, uma reação que ocorre com velocidade suficientemente alta para estabelecer um equilíbrio dinâmico de transferência de massa na interface, a etapa de transferência de massa irá governar a velocidade global do processo. A corrente do pico (em amperes) neste caso, é dada pela equação de Randles-Sevcik²⁶², (Equação 7):

Equação 7:

$$I_{p,a} = 2,686 \times 10^5 n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2}$$

onde: n é o número de elétrons envolvidos no processo, A é a área do eletrodo (cm²), D é o coeficiente de difusão (cm² s⁻¹) e C é a concentração da espécie em solução (mol dm⁻³) e v é a velocidade de varredura (V s⁻¹).

De acordo com a Equação 7, para as reações reversíveis a corrente de pico deve variar linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura.

Uma vez que, todos os parâmetros são constantes (concentração do par redox e concentração do eletrólito suporte), uma seleção dos eletrodos através da relação das correntes de pico (anódica e catódica) bem como o ΔE , pode ser diretamente relacionada à área eletroquímica efetiva dos eletrodos de grafite.

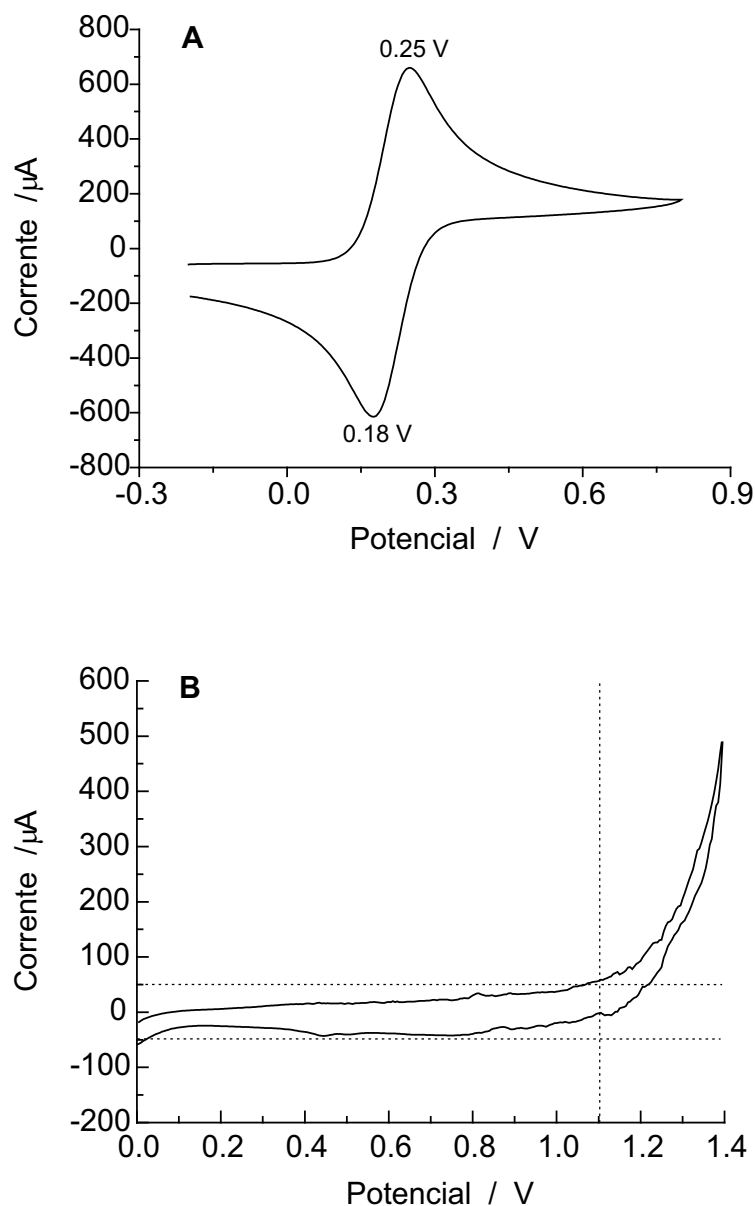


Figura 25: VC do eletrodo de grafite em: (A) solução $5,00 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ contendo $0,10 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KCl}$ e (B) solução HClO_4 $0,50 \text{ mol dm}^{-3}$. $v_A = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e $v_B = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

A Figura 25-A, mostra o comportamento eletroquímico típico do par redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio sobre os eletrodos de grafite. Observa-se um ΔE de 70 mV e uma relação de $I_{p,a}/I_{p,c}$ de 1,08, satisfazendo as condições do processo

reversível. O perfil adequado para os eletrodos a serem utilizados, foi definido como uma variação máxima de 10% destes dois parâmetros.

Com relação ao parâmetro de condicionamento, os eletrodos foram submetidos a sucessivos ciclos de varredura de potencial (cerca de 3 ciclos) na região de +0,00 a +1,40 V, em solução de ácido perclórico 0,50 mol dm⁻³. Isto garante uma limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo para melhor utilização no processo de eletropolimerização. O perfil desejado é mostrado na Figura 25-B, onde valores de corrente inferiores a 50 µA são obtidos na faixa de +0,00 a +1,10 V, e valores máximos de corrente em 500 µA para os potenciais acima de 1,10 V.

4.1.2 – Eletropolimerização do ácido 4-hidroxibenzóico

Posteriormente após seleção dos eletrodos adequados para utilização foi realizado uma investigação da região de atividade eletroquímica do 4-HBA. Desta forma, investigações preliminares sobre o comportamento eletroquímico do ácido 4-hidroxibenzóico (4-HBA) foram realizadas sobre eletrodos de grafite utilizando-se ácido perclórico como eletrólito suporte. A Figura 26 mostra o VC referente ao primeiro ciclo de varredura do 4-HBA.

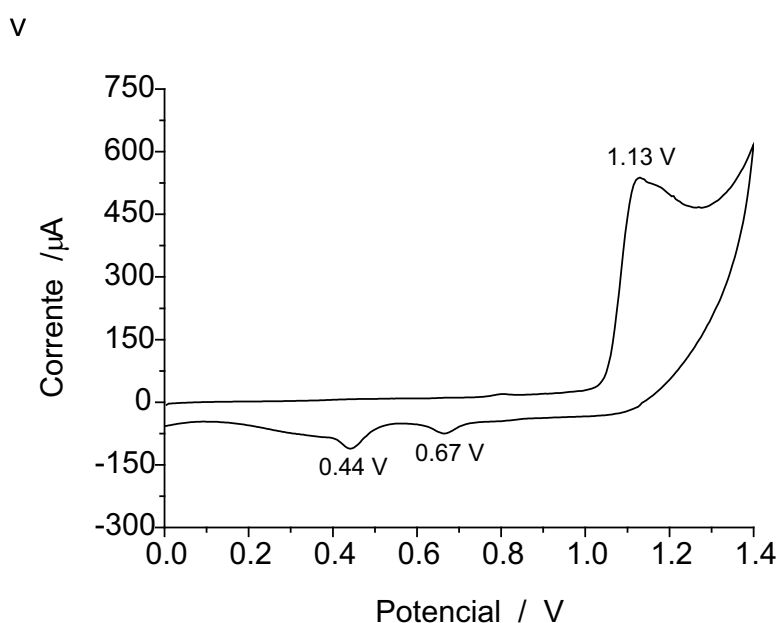


Figura 26: Voltamograma cíclico em solução 2,50 mmol dm⁻³ de 4-HBA sobre eletrodo de grafite. Eletrólito suporte: HClO₄ 0,50 mol dm⁻³; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Pode-se observar em cerca de +1,13 V a onda de oxidação eletroquímica do 4-HBA. Dois processos catódicos são observados em potencial de retorno, um em +0,67 V e outro em +0,44 V os quais podem ser atribuídos a redução do material adsorvido na superfície do eletrodo. Isto é afirmado devido ao crescimento das correntes de pico de tais processos com sucessivos ciclos de varredura de potencial, conforme será discutido posteriormente.

Para a obtenção do poli(4-HBA) VC consecutivos seriam realizados por sucessivos ciclos de potencial, na faixa de potencial utilizada pelo VC da Figura 26. Deste modo, para garantir que todo processo eletroquímico observado fosse resultante da eletropolimerização do 4-HBA, um procedimento de varredura de potencial nesta região foi realizado para o eletrodo de grafite somente em contato com o eletrólito suporte, ou seja, na ausência do monômero. A Figura 27, mostra o comportamento eletroquímico do eletrodo de grafite através de 100 ciclos de varredura de potencial em solução 0,50 mol dm⁻³ de ácido perclórico.

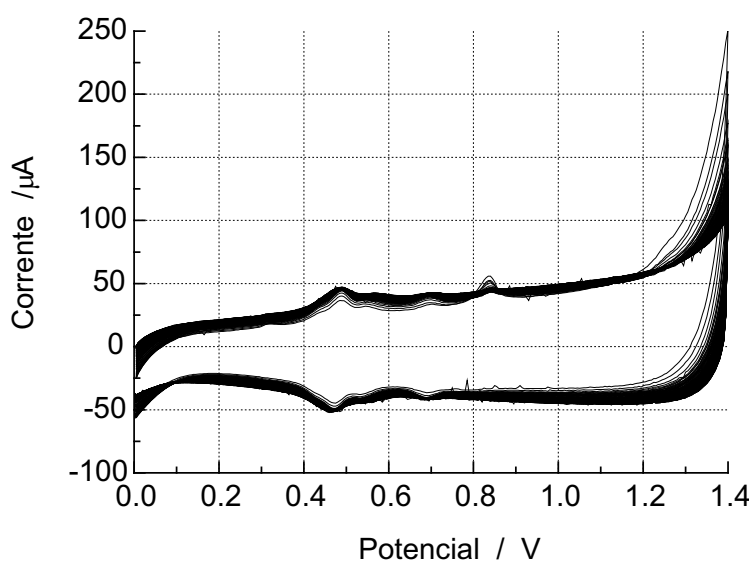


Figura 27: VC consecutivos do eletrodo de grafite em solução de 0,50 mol dm⁻³ de ácido perclórico. Número de ciclos = 100; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

A Figura 27 mostra uma baixa atividade eletroquímica quando se submete o eletrodo de grafite a ciclos consecutivos de potencial, na faixa de +0,00 a +1,40 V, somente no eletrólito de eletropolimerização. Observa-se apenas um pequeno aumento da corrente capacitiva, sendo que as correntes residuais ficaram em torno de 50 µA.

Após avaliação dos parâmetros descritos acima, investigações preliminares sobre a eletropolimerização do monômero em concentração de $2,50 \text{ mmol dm}^{-3}$ foram realizadas utilizando-se 100 ciclos de potencial na faixa de $+0,00$ a $+1,40 \text{ V}$ contendo solução $0,50 \text{ mol dm}^{-3}$ de ácido perclórico como eletrólito suporte. A velocidade de varredura foi definida em 50 mV s^{-1} sendo este parâmetro não investigado e sim atribuído em acordo com trabalhos já desenvolvidos pelo grupo LAFIP/NANOTEC^{116,117,127-132}.

A Figura 28 mostra os VC referentes aos sucessivos ciclos de potencial do 4-HBA. Pode-se observar a oxidação do monômero em cerca de $+1,15 \text{ V}$ conforme já descrito na Figura 26, que se refere à formação do cátion-radical, sendo evidente que à medida que se aumenta o número de ciclos de potencial há um decréscimo nos valores de $I_{p,a}$. Isto implica no consumo de monômero próximo a superfície do eletrodo, para a formação e deposição do material resultante da eletropolimerização do 4-HBA.

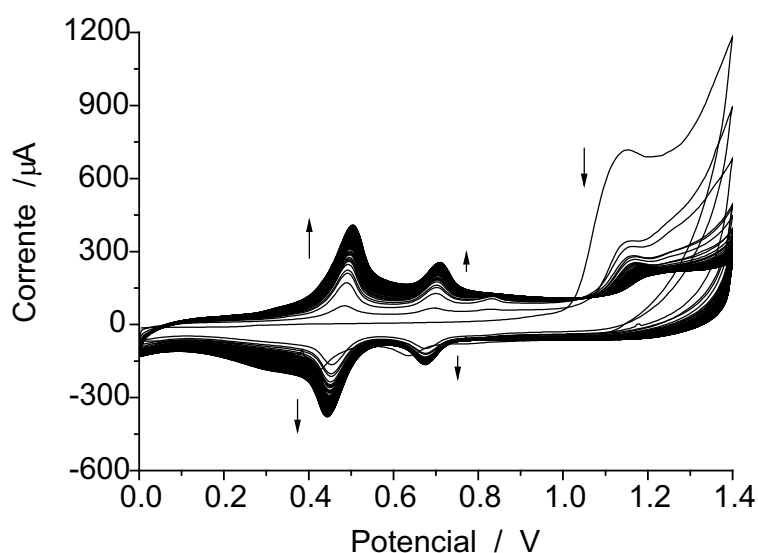


Figura 28: VC consecutivos do eletrodo de grafite em solução de $2,50 \text{ mmol dm}^{-3}$ de 4-HBA. Eletrólito suporte: $0,50 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$; Número de ciclos = 100; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

A Figura 28 mostra que no primeiro ciclo de potencial já se observa o aparecimento de duas ondas de redução localizadas em $+0,45$ e $+0,68 \text{ V}$, potencial referente ao 100º ciclo. À medida que se realiza os sucessivos ciclos de potencial os respectivos processos de oxidação correspondentes, aparecem em $+0,51$ e $+0,68 \text{ V}$. O valor de ΔE e a relação de I_{pa}/I_{pc} , no 100 ciclo de varredura, para o primeiro par redox é

determinado como $\Delta E_1 = 60$ mV e $I_{pa,1}/I_{pc,1} = 1,07$ e para o segundo par redox $\Delta E_2 = 35$ mV e $I_{pa,2}/I_{pc,2} = 1,5$.

Os dois processos redox satisfazem a condição de reações reversíveis, e mostram aumento nos valores de corrente com os sucessivos ciclos de potencial. Isto indica a formação/adsorção de um material eletroativo sobre o eletrodo de grafite.

4.1.3 – Comportamento eletroquímico dos filmes de poli(4-HBA)

Após o procedimento de eletropolimerização os eletrodos de grafite modificados com filmes poliméricos de poli(4-HBA) – EG-4HBA, foram submetidos a ciclos de potencial, na mesma faixa de eletropolimerização da Figura 28. Este procedimento visa à remoção do monômero residual que podem ter sido “aprisionados” durante a eletropolimerização. A Figura 29 mostra 10 ciclos de varredura de potencial obtidos para o eletrodo modificado com poli(4-HBA) somente em solução do eletrólito suporte. Os VC foram obtidos após o EG/4-HBA ter sido retirado da solução monomérica, lavado e seco com N_2 ultra puro.

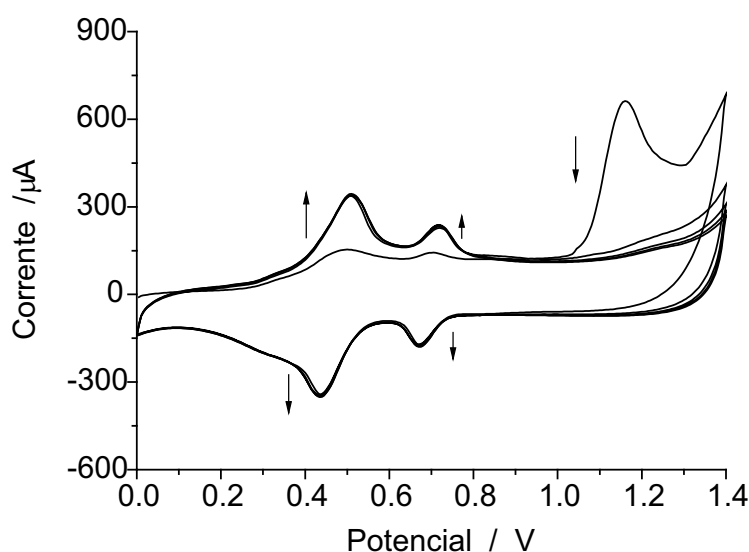


Figura 29: VC do eletrodo do EG/4-HBA após eletropolimerização, somente em solução $0,50 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HClO}_4$. Número de ciclos = 10; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Observa-se que há no primeiro ciclo de potencial uma forte intensidade de $I_{p,a}$ em $+1,15$ V, que praticamente desaparece após o segundo ciclo de varredura de potencial, ficando evidente o processo de oxidação referente ao monômero. Este

monômero residual que pode ser sido adsorvido durante a eletropolimerização. As intensidades de corrente relacionadas aos processos de atividade eletroquímica do filme se tornam praticamente constante após a segunda varredura. Este procedimento de “limpeza de monômero residual” é um fator importante para se eliminar possíveis interferências de atividades eletroquímicas relacionadas a este processo em análises subsequentes. A modificação do eletrodo de grafite é confirmada quando se compara os perfis eletroquímicos do EG e EG/4-HBA. A Figura 30 mostra a região de atividade eletroquímica do eletrodo modificado com poli(4-HBA) comparado ao do eletrodo não-modificado.

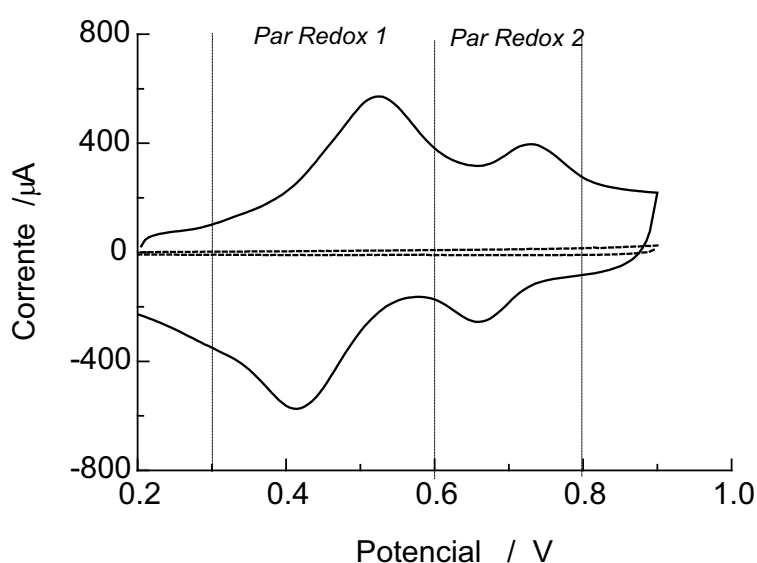


Figura 30: VC obtidos após eletropolimerização, somente em solução $0,50 \text{ mol dm}^{-3}$ de ácido perclórico, na ausência do monômero, para os eletrodos de grafite: (---) não-modificado e (—) modificados com poli(4-HBA). $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Pode-se observar nitidamente que há modificação na superfície do eletrodo de grafite após o procedimento de eletropolimerização. Os valores de correntes para os dois processos eletroquímicos são comparáveis aos VC da Figura 28, o que implica que o material eletropolimerizado fica imobilizado sobre a superfície do eletrodo.

Segundo Benyoucef e colaboradores²⁶³, em seu estudo na eletropolimerização do ácido 4-aminobenzóico, monômero similar ao 4-HBA, o aparecimento destes dois pares redox assemelham-se com as características apresentadas pela polianilina²⁶⁴, sendo atribuídos à formação de pólarons e bipólarons no esqueleto polimérico.

Os filmes de poli(4-HBA) eletropolimerizados sobre eletrodos de grafite foram caracterizados por voltametria cíclica em função da velocidade de varredura entre 5 e 300 mV s^{-1} em solução aquosa 0,50 mol dm^{-3} de HClO_4 ausente de monômero. Os correspondentes VC são mostrados na Figura 31, juntamente com as relações de I_p vs. $\sqrt{v}$.

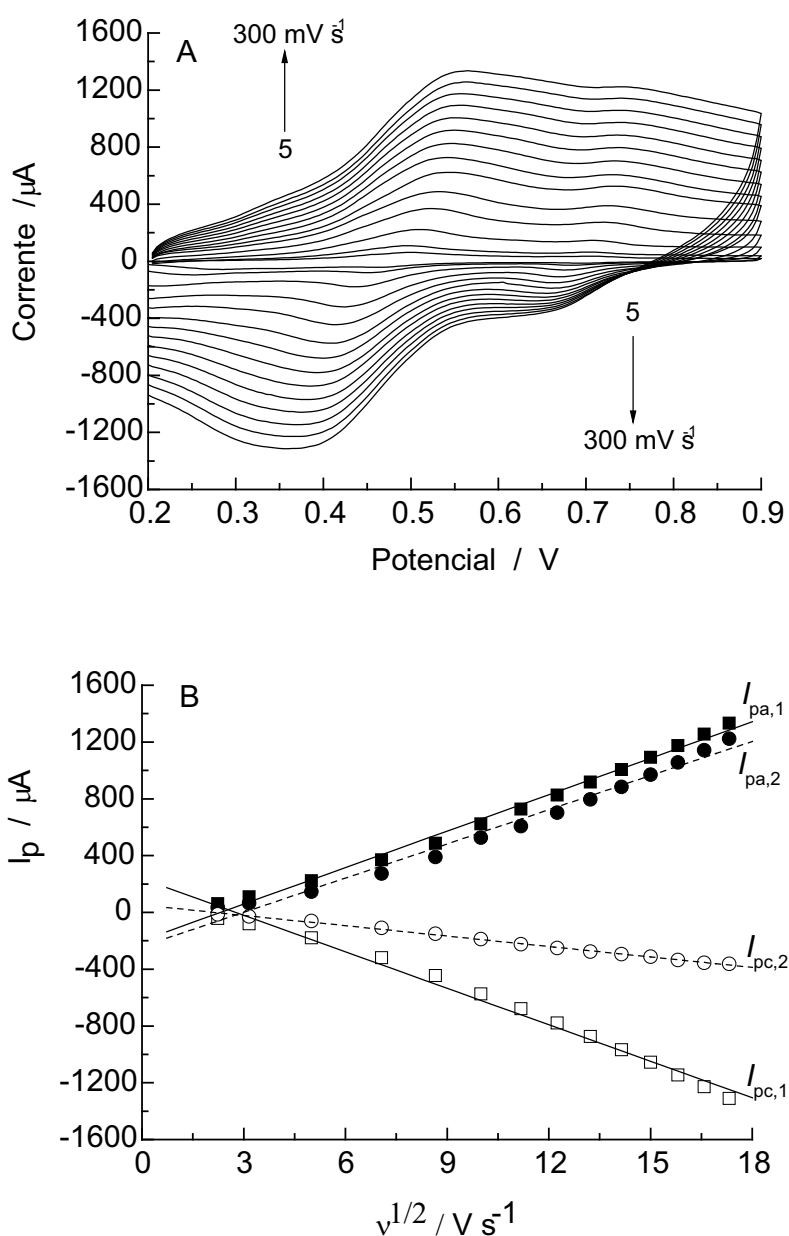


Figura 31: (A) VC obtidos para o EG/4-HBA em função da velocidade de varredura. (B) dependência das correntes de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Eletrólito suporte: HClO_4 0,50 mol dm^{-3} .

A Figura 31-A, mostra que com o aumento da velocidade de varredura é observado aumento nos valores de corrente para ambos os pares redox, sugerindo que a atividade eletroquímica do polímero é controle pelo transporte difusional. Isto evidencia a presença de uma camada eletroativa imobilizada no eletrodo.

Na Figura 31-B é observado a relação observada entre I_{pa} e I_{pc} com a raiz quadrada da velocidade de varredura indicando a tendência de um processo eletroquímico controlado por difusão. Também é observada pela Figura 31-A, uma resistência elevada do sistema em função do aumento da velocidade de varredura.

De acordo com Laviron e colaboradores²⁶⁵ outro parâmetro que pode ser utilizado para identificar se o processo é controlado por difusão é o gráfico do logaritmo da corrente de pico versus logaritmo da velocidade de varredura, onde para uma reação ideal controlada por difusão os valores de slope são observados em 0,50. Os valores encontrados para o EG/4-HBA foram de 0,74 e 0,87 para $I_{pa,1}$ e $I_{pa,2}$, respectivamente. Considerando-se que o processo de difusão é referente a um material eletroativo adsorvido na superfície do eletrodo, o desvio do valor teórico é esperado.

4.1.5 – Influência dos pares redox $Fe(CN)_6^{2-}/Fe(CN)_6^{3-}$ e $Ru(NH_3)_6^{2+}$ no comportamento eletroquímico do poli(4-HBA)

Quando uma substância eletroativa é adsorvida na superfície de um eletrodo, o comportamento deste sistema é afetado. A capacidade no bloqueio de eletrodos modificados no processo de transferência eletrônica tem sido usualmente avaliada no estudo das reações redox utilizando-se complexos de ferrocianeto/ferricianeto de potássio e cloreto de hexaaminrutênio como sondas redox de investigação²⁶⁶⁻²⁷².

Neste sentido, para investigar as propriedades cinéticas de transporte de troca iônica dos filmes poliméricos de poli(4-HBA), voltamogramas cíclicos foram registrados em solução aquosas contendo duas sondas redox denominadas como ferrocianeto/ferricianeto de potássio (sonda aniônica) e cloreto de hexaaminrutênio(II) (sonda catiônica). A natureza das interações do poli(4-HBA) com as sondas redox, fornece importantes informações sobre a própria estrutura do material polimérico. Isto é devido às interações eletrostáticas que podem existir entre a sonda redox e o polímero, permitindo predizer um conhecimento prévio das propriedades elétricas e estruturais do

poli(4-HBA). Posteriormente no item 4.2.4, as propriedades elétricas serão melhor avaliadas por EIE.



A voltametria cíclica é uma importante técnica para investigar as propriedades de bloqueio do filme de poli(4-HBA) utilizando a difusão dos pares redox como sonda. A Figura 32-A mostra os VC dos eletrodos de grafite e grafite modificado com poli(4-HBA) em solução 0,50 mmol dm⁻³ ferrocianeto/ferricianeto de potássio contendo 0,10 mol dm⁻³ de KCl como eletrólito suporte em velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

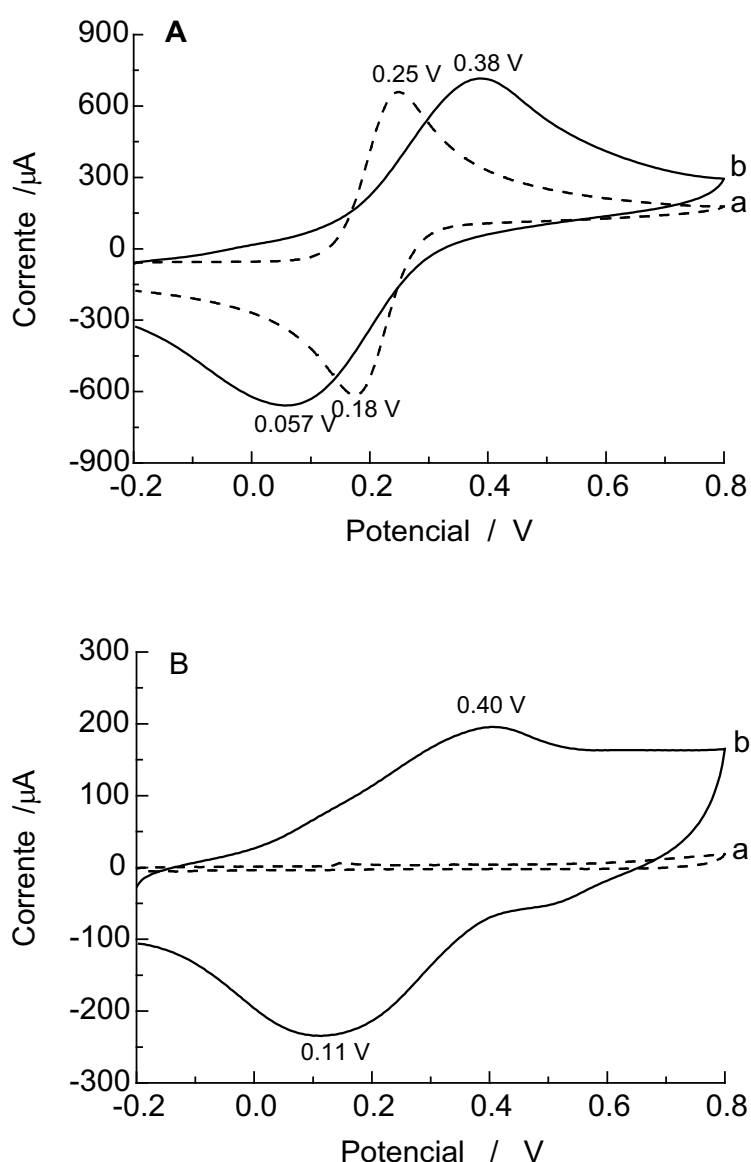
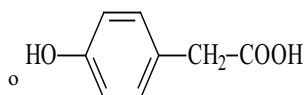


Figura 32: VC obtidos para medidas das propriedades de troca aniônica dos eletrodos: (a) EG e (b) EG/4-HBA em solução aquosa de: (A) 5,00 mmol dm⁻³ de K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆ contendo KCl 0,10 mol dm⁻³ e (B) 0,10 mol dm⁻³ de KCl. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Como pode ser observado na Figura 32A-a, o eletrodo de grafite mostra um comportamento reversível ($\Delta E = 71$ mV) para o par redox, indicando que a reação de transferência eletrônica é completamente controlada por difusão, conforme já discutido no item 4.1.1. Em contraste ao eletrodo não-modificado, para o eletrodo de grafite contendo poli(4-HBA) é observado um $\Delta E = 327$ mV, indicando que a reação do par redox aniônico é inibida. Conforme pode ser visualizado na Figura 32A-b há um comportamento de bloqueio imperfeito, ou seja, não há um bloqueio total na transferência eletrônica do par redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio.

Para se garantir, que este efeito observado estivesse relacionado somente ao par redox, VC foram obtidos somente em solução do eletrólito suporte, uma vez que já fora observado eletroatividade do material depositado (Figura 30). A Figura 32-B, mostra os VC para os eletrodos de grafite não-modificado e modificado com poli(4-HBA) somente em solução aquosa de $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ de KCl, na ausência do par redox. É claramente observado na Figura 32B-b que o filme polimérico apresenta eletroatividade na solução do eletrólito suporte, apresentado um pico de oxidação em $+0,40$ V e outro de redução em $+0,12$ V, ($\Delta E = 288$ mV), definindo-se como um processo quase-reversível. Para o eletrodo de grafite Figura 32B-a, nenhuma atividade eletroquímica é observada. Esta eletroatividade do poli(4-HBA) em solução do eletrólito suporte é exatamente na mesma região do par redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio. Desta forma, na Figura 32A-b, tem-se uma contribuição da eletroquímica do polímero com a do par redox. Considerando-se este efeito, tem-se que *ca.* de 28% de contribuição nos valores de corrente anódica e catódica apresentado na Figura 32A-b é resultante somente da atividade eletroquímica do filme polimérico no eletrólito suporte. Isto permite dizer que quando se compara os VC na Figura 32A para os eletrodos de grafite não-modificado e modificado há uma queda real de 30% nos valores de corrente para a oxi-redução do ferrocianeto/ferricianeto de potássio.

Oliveira e colaboradores²⁷³ realizando o mesmo estudo com filmes poliméricos derivados do ácido 4-hidroxifenilacético (4-HFA)^o, um monômero similar ao 4-HBA, e também estudado pelo grupo LAFIP/NANOTEC, demonstra que o efeito da sonda redox aniônica é completamente inibido para o poli(4-HFA). Neste caso, não é observado nenhum pico no VC, o que indica a ausência de qualquer processo redox.



Isto indica que eletrodos modificados com poli(4-HFA) inibem totalmente a reação do par redox aniônico. Estudos com o mesmo monômero utilizando-se outro par redox catiônico mostraram efeito adverso, sugerindo que o poli(4-HFA) apresenta um esqueleto polimérico aniônico, repulsando eletrostaticamente o ferrocianeto/ferricianeto de potássio e inibindo seu processo redox.

Os filmes de poli(4-HBA) foram também submetidos a ciclos sucessivos de varredura de potencial em solução aquosa de KCl 0,10 mol dm⁻³, e os VC obtido após estabilização nesta solução são mostrados na Figura 33.

O eletrodo modificado foi então ciclado no mesmo eletrólito na presença de 5,00 mmol dm⁻³ de Ru(NH₃)₆Cl₂ (Figura 33A). Em comparação, o mesmo procedimento foi realizado utilizando-se EG em solução aquosa de 0,10 mol dm⁻³ de KCl e 5,00 mmol dm⁻³ de Ru(NH₃)₆Cl₂ contendo o eletrólito suporte.

O processo redox, o qual aparece na Figura 33A-a em *ca.* -0,11 V, corresponde a oxidação do par Ru(NH₃)₆^{2+/3+} com conseqüente redução do par Ru(NH₃)₆^{3+/2+} em -0,19 V, sobre EG, onde tem-se um $\Delta E = 85$ mV. Pode-se notar que para o eletrodo de grafite modificado com poli(4-HBA) o potencial de oxidação do Ru(NH₃)₆^{2+/3+} é significativamente menor em *ca.* -0,13 V, e o de redução em -0,19 V, com $\Delta E = 63$ mV. Isto sugere que a transferência eletrônica é facilitada sobre os eletrodos modificados, no qual se obteve um decréscimo no valor do $\Delta E = 20$ mV.

Para os eletrodos EG e EG/4-HBA analisados somente em solução do eletrólito suporte (Figura 33B), não foi observado nenhum pico de oxi-redução, o que garante que nenhuma atividade eletroquímica do filme contribui para os VC obtidos na Figura 33A.

Desde modo, no caso do eletrodo modificado com poli(4-HBA), pode-se concluir que a transferência eletrônica do Ru(NH₃)₆^{2+/3+} é facilitada pelo polímero, ocorrendo na superfície do filme polimérico e não na superfície do eletrodo de grafite após a difusão das espécies. Isto sugere que os filmes de poli(4-HBA) apresentam uma característica aniônica, atraindo eletrostaticamente os íons catiônicos da sonda redox.

Este fato é melhor compreendido, quando se analisa os VC da Figura 34, a qual mostra o comportamento eletroquímico do eletrodo de poli(4-HBA) com sucessivos ciclos de varredura de potencial após a imersão deste eletrodo em solução da sonda redox catiônica.

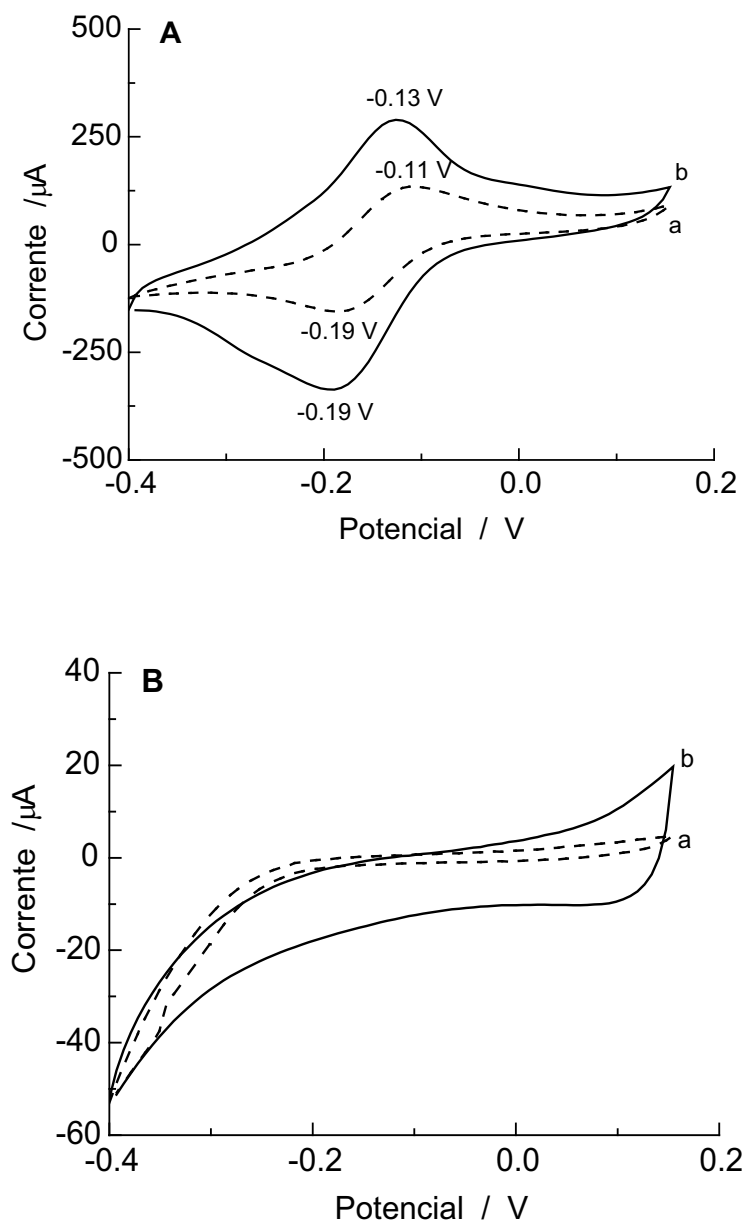


Figura 33: VC obtidos para medidas das propriedades de troca catiônica dos eletrodos: (a) EG e (b) EG/4-HBA em solução aquosa de: (A) 5,00 mmol dm⁻³ de Ru(NH₃)₆Cl₂ contendo KCl 0,10 mol dm⁻³ e (B) 0,10 mol dm⁻³ de KCl. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Pode-se observar na Figura 34 que a incorporação do Ru(NH₃)₆²⁺ é relativamente rápida tendo-se em vista que as ondas de oxidação/redução atingem valor máximo de corrente após o 9º ciclo de varredura de potencial. Isto pode ser explicado pela atração das interações eletrostáticas entre a espécie entre a sonda carregada positivamente e o comportamento aniônico dos filmes de poli(4-HBA).

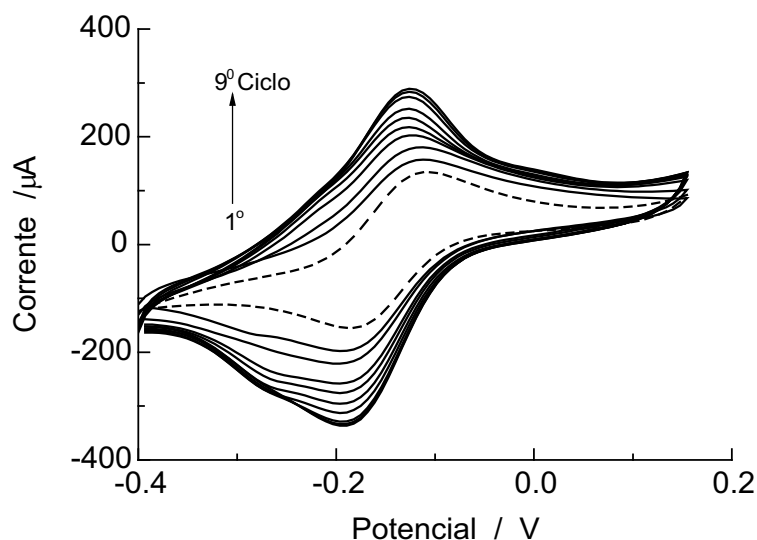


Figura 34: VC consecutivos para o EG/4-HBA em solução aquosa de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2$ $5,00 \text{ mmol dm}^{-3}$ contendo KCl $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$. Sendo: (---) EG. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Este tipo de interação eletrostática promove o transporte do complexo de rutênio para a superfície do eletrodo resultando, portanto, conforme observado num aumento da corrente de pico. Isto pode ser enfatizado quando se compara o comportamento do poli(4-HBA) com o par redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio, o qual resulta num comportamento inverso.

Na literatura são descritos estudos semelhantes como os de Sonmez e colaboradores²⁷⁴, que demonstraram as propriedades de troca catiônica em solução de cloreto de hexaaminrutênio(III) com o uso de um polieletrólito sulfonado como dopante. Os autores observaram um aumento nas correntes de pico para os eletrodos modificados com os filmes poliméricos quando comparado aos eletrodos não-modificados.

Ganesh e colaboradores²⁷⁵ utilizando-se monocamadas auto-montadas de tiol^p estudaram o efeito do tamanho da cadeia alquílica e verificaram a influência no bloqueio frente a duas sondas de pares redox denominados ferrocianeto/ferricianeto de potássio e cloreto de hexaaminrutênio(III). Foi observado que para ambos os pares redox há um bloqueio no processo de transferência eletrônica, contudo quando exposto ao par redox de ferrocianeto/ferricianeto de potássio este efeito é mais pronunciado.

^p R-S-H

De acordo com Matyszevska e Bilewicz²⁷⁶ em seus estudos sobre a influência do ácido perfluorooctanossulfônico^q no modelo de membranas fosfolipídicas, sobre eletrodos de ouro, utilizando-se sondas catiônicas e aniônicas de pares redox. É observado um aumento de corrente de pico quando o eletrodo foi investigado em solução da sonda catiônica. Ao contrário, quando avaliado em solução aquosa contendo a sonda negativa, os autores observaram uma inibição no processo de transferência eletrônica do par redox, dada pelas interações eletrostáticas entre o eletrodo modificado e as sondas redox.



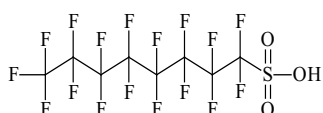
4.2 – Investigação e caracterização dos filmes de poli(4-HBA) em função do pH

As alterações na composição das estruturas químicas que ocorrem em função do pH, podem ser visualizadas pelo gráfico da concentração relativa de equilíbrio, α , em função do pH da solução. Assim a eletropolimerização do 4-HBA em diferentes valores de pH foi estudada para avaliar a eficiência em se obter filmes poliméricos, a fim de serem aplicados na construção de biossensores.

A modificação eletroquímica de eletrodos com filmes poliméricos tem sido muito utilizada para proteger a superfície contra impurezas, interferentes, e fornecer biocompatibilidade com as amostras e analitos de interesse. Assim investigações como estabilidade, eficiência no transporte de corrente, quantidade e eletroatividade do material eletrogerado foram realizadas.

A estrutura molecular do ácido 4-hidroxibenzóico apresenta um anel aromático ligado a uma carboxila e uma hidroxila, as quais podem sofrer processos de protonação/desprotonação devido às variações de pH do meio, conforme pode ser observado na Figura 35.

q



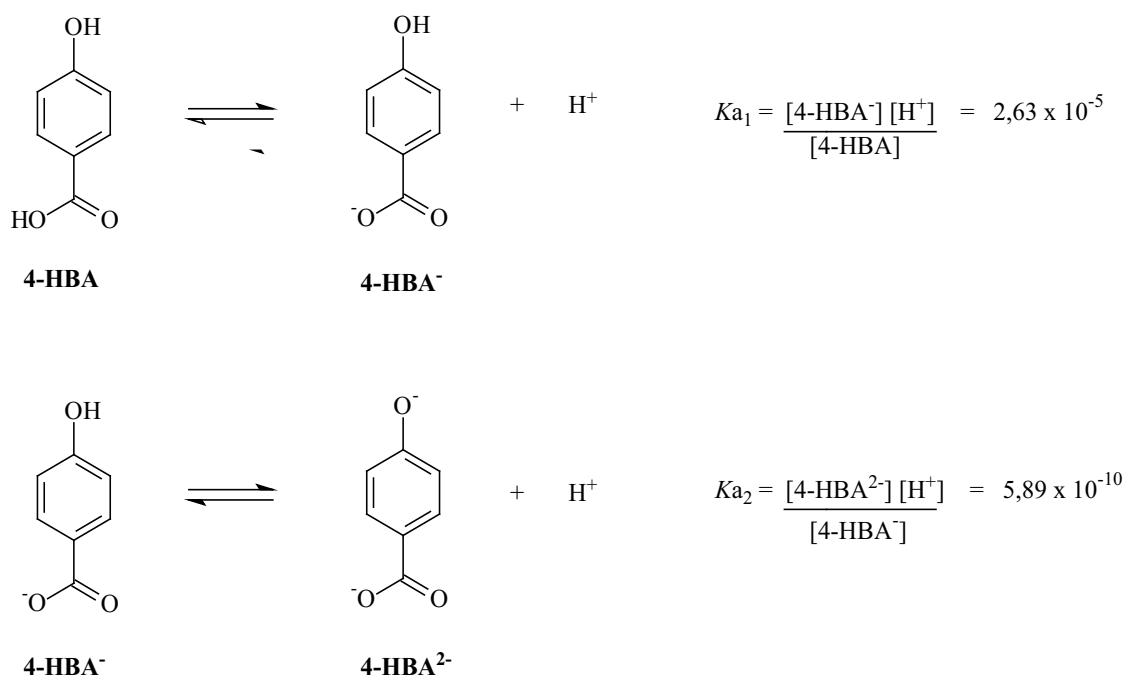


Figura 35: Estruturas do 4-HBA e suas respectivas formas dissociadas^{277,278}.

Os valores de α são úteis na visualização das variações de concentração de diversas espécies que ocorrem com a variação do pH do meio. Por exemplo, se considerarmos que C_t seja a concentração molar das espécies contendo o 4-HBA, ao longo de uma titulação, o valor de alfa, para a espécie 4-HBA (Figura 35), é definido de acordo com a Equação 8:

Equação 8:

$$\alpha_{4\text{-HBA}} = \frac{[\text{4-HBA}]}{C_t}$$

onde $C_t = [\text{4-HBA}] + [\text{4-HBA}^-] + [\text{4-HBA}^{2-}]$

Para se obter as expressões, de α , para cada espécie, presentes no equilíbrio do ácido 4-hidroxibenzóico, os valores são expressos em termos da $[\text{H}^+]$, K_{a1} e K_{a2} . Desta forma, os valores de alfa para cada espécie são calculados de forma similar ao descrito anteriormente, tendo-se, portanto as relações apresentadas na Equação 9.

Equação 9:

$$\alpha_{4\text{-HBA}} = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+]^2}{[\text{H}_3\text{O}^+]^2 + K_{a1}[\text{H}_3\text{O}^+] + K_{a1}K_{a2}}$$

$$\alpha_{4\text{-HBA}^-} = \frac{K_{a1}[\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{H}_3\text{O}^+]^2 + K_{a1}[\text{H}_3\text{O}^+] + K_{a1}K_{a2}}$$

$$\alpha_{4\text{-HBA}^{2-}} = \frac{K_{a1}K_{a2}}{[\text{H}_3\text{O}^+]^2 + K_{a1}[\text{H}_3\text{O}^+] + K_{a1}K_{a2}}$$

A Figura 36A mostra o gráfico de distribuição para o monômero, em função do pH, utilizando-se as relações descritas anteriormente, obtidas pelo software CurTiPot^r. As três curvas na Figura 36A apresentam os valores alfa para cada espécie do ácido 4-hidroxibenzóico em função do pH.

Nota-se que no início, até pH 3,00, o valor de alfa está próximo de 1, significando que 97% das espécies que contém o ácido 4-hidroxibenzóico estão presentes na forma 4-HBA e apenas 3,00% encontram-se como 4-HBA⁻. Entre pH 6,00 e 8,00 a espécie 4-HBA⁻ apresenta-se como 97%, tendo-se apenas 3,00% para cada uma das formas 4-HBA e 4-HBA²⁻. Em valores de pH superiores a 11,00 a espécie 4-HBA²⁻ apresenta-se em 98%, tendo-se apenas 2,00% da forma 4-HBA⁻. Em valores de pH iguais a 4,58 e 9,23, tem-se um equilíbrio molar das espécies $\alpha_{4\text{-HBA}}$ e $\alpha_{4\text{-HBA}^-}$ e $\alpha_{4\text{-HBA}^-}$ e $\alpha_{4\text{-HBA}^{2-}}$, respectivamente. Nestes pHs os valores α são iguais a 0,50 e determinam os valores de pK_a do ácido 4-hidroxibenzóico

As curvas sólidas na Figura 36B descrevem o mesmo valor de alfa, mas agora representando por gráfico em função do volume de hidróxido de sódio a medida que se varia o pH da solução contendo o monômero. A curva de titulação também é mostrada, por meio da linha tracejada na Figura 36B. A análise dessas curvas dá uma idéia clara de todas as alterações de concentrações que ocorrem em função da variação do pH.

^r CurTiPot versão 3.4.1, disponível em: <http://www2.iq.usp.br/docente/gutz/Curtipot.html> Acesso em 01/07/2009.

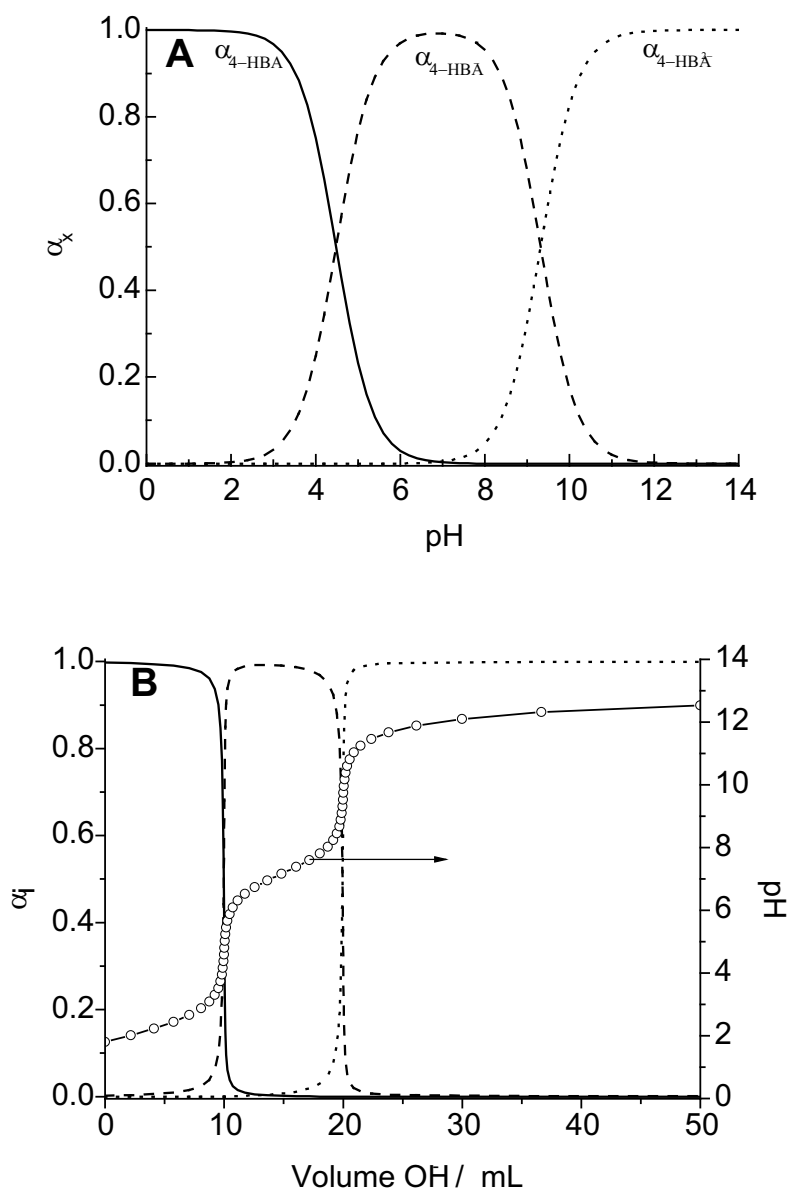


Figura 36: Distribuição das espécies de 4-HBA: em função: (A) pH e (B) e curvas de distribuição de espécies ao longo da titulação em função do pH e do volume de base adicionado^s.

No primeiro ponto de equivalência (pH 4,58), as espécies 4-HBA e 4-HBA⁻ apresentam valores de alfa em 0,43 e 0,57 respectivamente. Isto indica, que ambas as espécies coexistem no meio. Neste valor de pH as curvas se cruzam e o pH = pK_{a1}, o

^s Curvas simuladas e obtidas pelo software CurTiPot versão 3.4.1, disponível em: <http://www2.iq.usp.br/docente/gutz/Curtipot.html> Acesso em 01/07/2009.

que confere a solução o caráter de solução tampão. Após o primeiro ponto de equivalência, 4-HBA^- diminui e 4-HBA^{2-} aumenta. No segundo ponto de equivalência (pH 9,23), as espécies 4-HBA^- e 4-HBA^{2-} apresentam valores de alfa de 0,27 e 0,73. Acima deste valor de pH praticamente todo 4-HBA existe na forma de 4-HBA^{2-} .

4.2.1 – Comportamento eletroquímico do 4-HBA: Efeito do pH

De forma geral podemos resumir, a fins de facilitar a discussão ao longo do trabalho, as estruturas da Figura 35, denominadas 4-HBA, 4-HBA^- e 4-HBA^{2-} pelos seus processos de protonação/desprotonação com os respectivos valores de pK_a nas formas apresentadas pelas estruturas químicas na Figura 37.

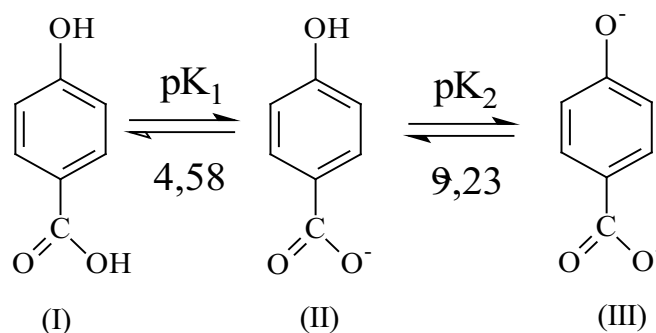


Figura 37: Equilíbrios ácido/base do 4-HBA^{277,278}.

Para investigar a influência do pH na eletropolimerização do 4-HBA, foram selecionado três valores de pH, sendo: 0,50; 7,03 e 12,13. Em cada valor de pH selecionado, segundo a Figura 36A, há uma predominância estimada em cerca de 99% de cada estrutura I, II e III, respectivamente.

Nota-se que em valores de pH 0,50, o monômero se apresenta na forma da estrutura I ($\alpha = 1,00$). Em pH igual a 7,03 ocorre a desprotonação do grupo carboxila para o grupo carboxilato, originando a estrutura II ($\alpha = 0,99$). Em pH mais básico, acima do segundo pK_a (9,23), ambos os grupos $-\text{OH}$ e $-\text{COOH}$ estarão em sua forma desprotonada, gerando então o íon fenóxido representado pela estrutura III ($\alpha = 0,99$). O valor calculado do ponto isoelétrico pode ser obtido pela média aritmética dos valores de pK , sendo esperado em pH de 6,95. Desta forma, pode-se avaliar e investigar a

eletropolimerização referente à cada espécie de interesse variando-se o pH da solução monomérica, na qual foi possível obter diferentes espécies químicas eletroativas que podem sofrer diferentes processos de eletropolimerização. A Figura 38 mostra os VC enquanto a Tabela 4 resume os diferentes potenciais de pico, em função do pH, para as estruturas I, II e III.

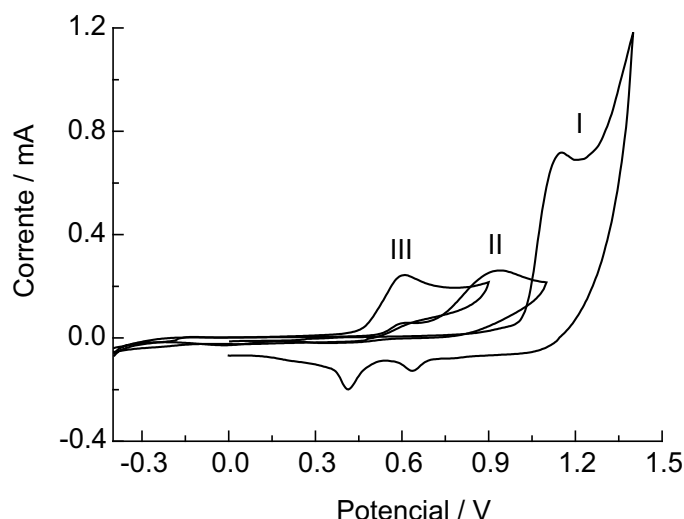


Figura 38: Primeiro VC registrado em EG para o 4-HBA em função do pH: (I) 0,50; (II) 7,03 e (III) 12,13. [4-HBA] = 2,50 mmol dm⁻³; eletrólito suporte: HClO₄ 0,50 mol dm⁻³; ν = 50 mV s⁻¹.

Observa-se que o potencial necessário para a oxidação do monômero em meio básico é menos anódico do que em meio ácido. Isto é devido ao aumento na densidade eletrônica no átomo de oxigênio na forma de fenóxido (estrutura III), aumentando o efeito ressonante no anel aromático facilitando o início da polimerização com a formação do primeiro cátion-radical.

Tabela 4: Potencial de oxidação primeiro ciclo de oxidação do 4-HBA e comprimento de onda de absorção em função do pH.

Estrutura	pH	UV / λ nm monômero	$E_{p,a}$ / (V) monômero
I	0,50	256	1,15
II	7,03	246	0,93
III	12,13	282	0,61

Os diferentes potenciais de oxidação, em função da variação do pH pode ocasionar a deposição de diferentes materiais sobre a superfície do eletrodo de grafite.

Espectros de UV-Vis para o monômero nos valores de pH investigados, foram obtidos e são mostrados na Figura 39.

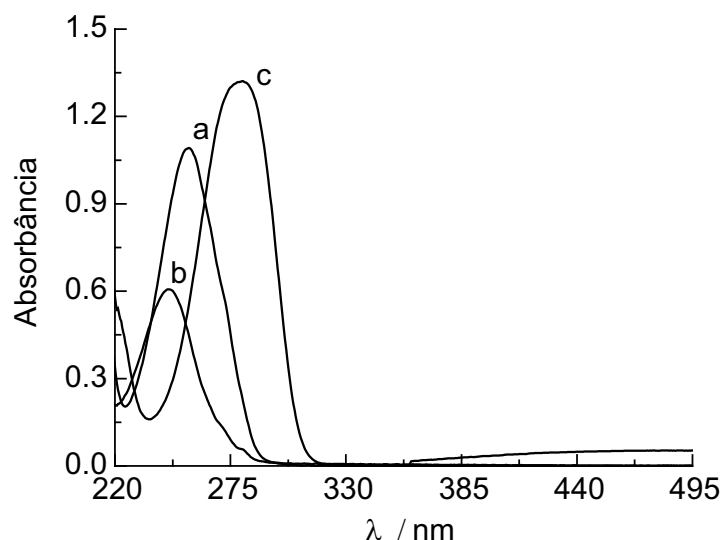


Figura 39: Espectros de UV-Vis obtidos para 4-HBA em meio: (a) ácido pH 0,50; (b) neutro pH 7,03 e (c) básico pH 12,13.

A protonação e/ou desprotonação dos grupos auxocromos $-OH/O^-$ e $-COOH/COO^-$ promove alteração no comprimento de onda bem como na intensidade das bandas no espectro de UV-Vis. Os dados obtidos são apresentados na Tabela 4.

4.1.2 – Polimerização eletroquímica do 4-HBA sobre eletrodos de grafite

A eletropolimerização do 4-HBA em $HClO_4$ foi conduzida por sucessivos ciclos de potencial entre +0,00 a 1,40V (pH 0,50); -0,40 a +1,10V (pH 7,03) e -0,40 a +0,90 (pH 12,13) em velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , com 100 ciclos de potencial, conforme apresentado na Figura 40.

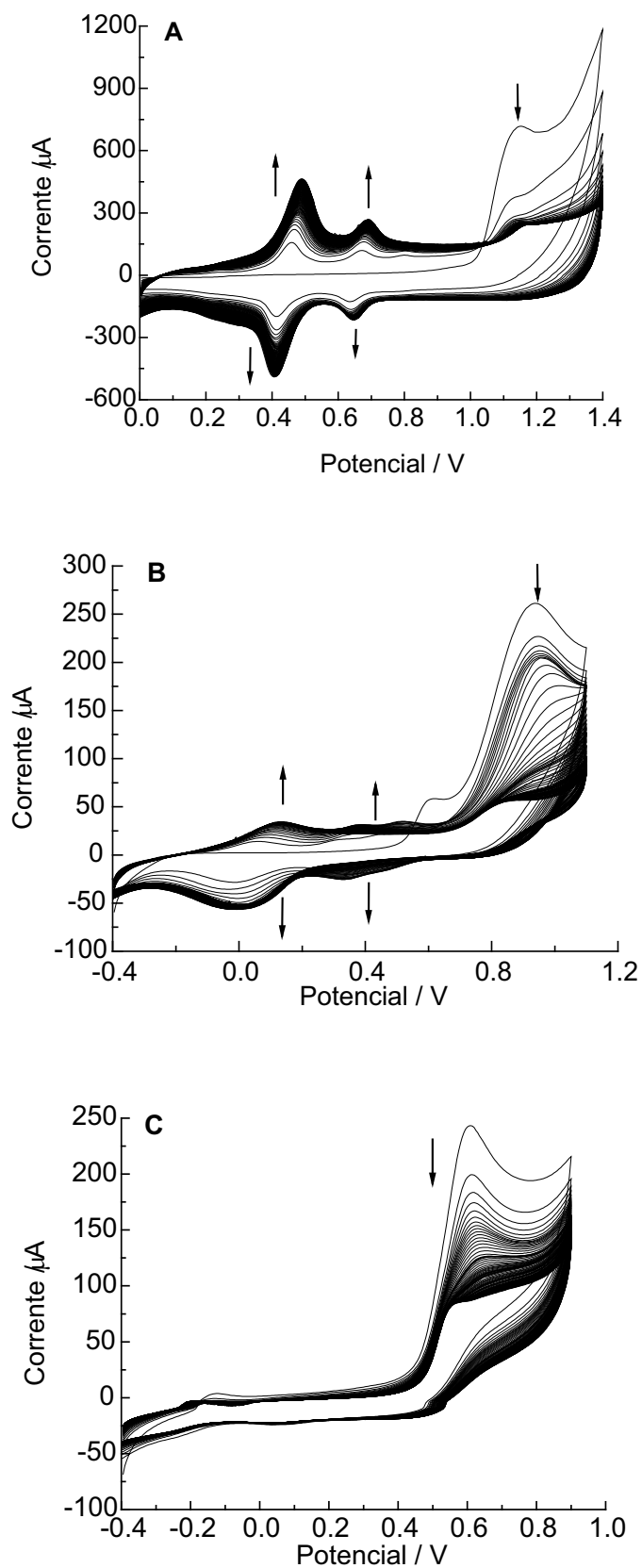


Figura 40: VC consecutivos sobre EG em meio de HClO_4 $0,50 \text{ mol dm}^{-3}$. $[\text{4-HBA}] = 2,50 \text{ mmol dm}^{-3}$; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Eletropolimerização realizada em pH: (A) 0,50; (B) 7,03 e (C) 12,13.

A Figura 40 mostra que o primeiro ciclo de oxidação para os três valores de pH investigados, uma onda de oxidação do monômero, em potenciais mais catódicos, o que representa a formação do cátion-radical. Contudo após inversão da varredura de potencial não é observado nenhum processo de redução do monômero. À medida que são efetuados sucessivos ciclos de potencial, a corrente de pico da oxidação do monômero diminui, o que indica o consumo do monômero próximo a superfície do eletrodo, para formação e deposição do material referente a eletropolimerização do 4-HBA.

A Figura 40A mostra já no primeiro ciclo de potencial, o aparecimento de duas ondas redox de redução localizadas em +0,41 e +0,63V. A partir do segundo ciclo os respectivos processos correspondentes de oxidação aparecem em +0,46 e +0,67 V. Estes dois processos redox reversíveis mostram um aumento nos valores de corrente com os sucessivos ciclos de potencial, indicando a formação de um material eletroativo. A mesma situação é observada na Figura 40B, com dois pares redox em +0,05 e -0,02 para o primeiro par e +0,33 e +0,32 para o segundo par, com o aumento nas correntes de picos indicando de modo análogo, a formação de material eletroativo. A Figura 40C apresenta a eletropolimerização do monômero em valor de pH 12,13. Como pode ser observado, nenhum par redox é observado, ocorrendo somente uma diminuição da corrente de pico de oxidação do cátion-radical.

4.2.3 – Propriedades eletroquímicas dos filmes de poli(4-HBA)

O comportamento eletroquímico dos eletrodos de grafite revestidos por filmes poliméricos formados eletroquimicamente, nos diferentes valores de pH, foi avaliado em solução do eletrólito suporte (HClO_4 0,50 mol dm^{-3}), na ausência do monômero, cujo pH foi ajustado para o mesmo valor da solução de polimerização. Os VC estão apresentados na Figura 41.

A Figura 41 mostra que ocorreu modificação na superfície dos eletrodos de grafite, nas três condições estudadas, exceto em pH 12,13. Os resultados observados após tratamento em pH 0,50 apresentam dois processos redox reversíveis, em solução de HClO_4 (+0,53/+0,42V e +0,74/+0,67 V). Estes dois processos eletroquímicos ocorrem na mesma região dos potenciais de pico para os sucessivos ciclos de potencial mostrados na Figura 40A. Para o pH 7,03, um par redox é observado em +0,08/-0,03 V.

Em pH 12,13 praticamente nenhuma atividade eletroquímica é observada sobre os eletrodos de grafite.

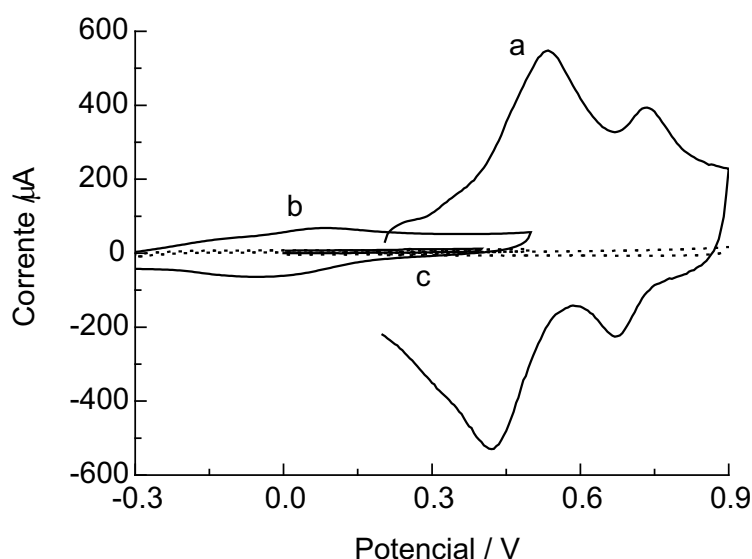


Figura 41: VC do EG/4-HBA obtidos no mesmo eletrólito de polimerização, livre de monômero em pH: (a) 0,50; (b) 7,03 e (c) 12,13. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. As linhas pontilhadas representam os VC dos EG antes da eletropolimerização.

Os diferentes comportamentos eletroquímicos para os pares redox dos filmes eletropolimerizados sugerem que diferentes perfis de materiais depositados são formados nos diferentes meios reacionais, os quais estão relacionados aos diferentes processos de eletropolimerização, conforme apresentado na Figura 40.

Estes resultados mostraram que os filmes de poli(4-HBA), eletrogerados em meio ácido, são mais eletroativos, conforme observado na Figura 41.

Investigações do comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados também foram efetuadas em solução aquosa contendo $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $5,00 \text{ mmol dm}^{-3}$ e KCl $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ como eletrólito suporte.

Alterações nos perfis de oxi-redução do par redox ferro/ferricianeto de potássio podem fornecer importantes informações a respeito do material depositado sobre a superfície do eletrodo. Os VC obtidos após modificação dos eletrodos de grafite são apresentados na Figura 42.

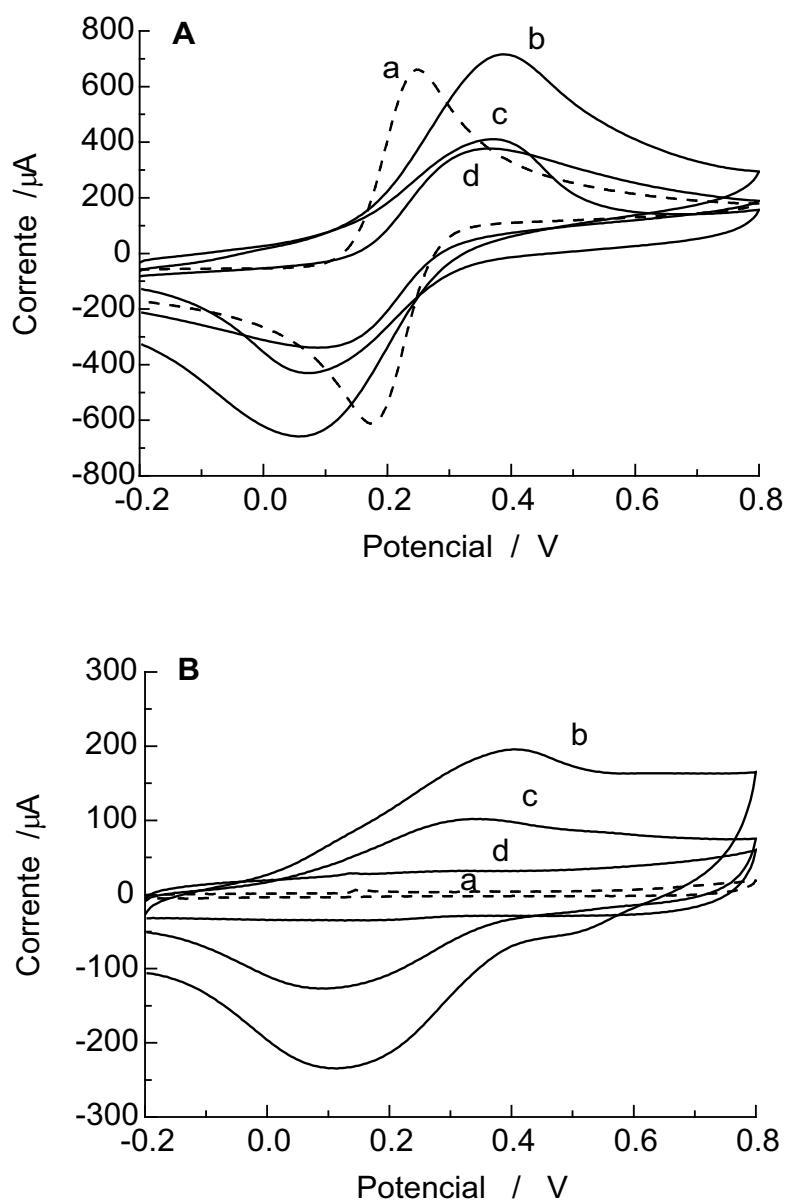


Figura 42: VC para os eletrodos EG e EG/4-HBA registrados em solução aquosa de: (A) $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $5,00 \text{ mmol dm}^{-3}$ contendo KCl $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ e (B) KCl $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$. $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. (a) EG; e EG/4-HBA eletropolimerizado em pH (b) 0,50; (c) 7,03 e (d) 12,13.

Como pode ser observado na Figura 42A, há um decréscimo nos valores da corrente de oxidação/redução para todos os eletrodos modificados, nos diferentes eletrólitos suporte e um deslocamento no potencial de pico de oxidação para potenciais mais positivos, o que indica modificação na superfície dos eletrodos de grafite. O

potencial padrão necessário para oxi-redução do par $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ é de +0,24/+0,17 V vs. Ag/AgCl, KCl (3,00 mol dm^{-3}) para o EG. Na presença de poli(4-HBA), o potencial é maior e dependente das características do filme polimérico formado.

A diminuição na corrente de pico está relacionada com as propriedades eletrônicas do material depositado sobre a superfície dos eletrodos de grafite e diminui com o aumento no valor do pH de eletropolimerização. Estes filmes poliméricos apresentam propriedades que dificultam o processo de transferência eletrônica do par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, quando comparado ao eletrodo não modificado. Além disso, a presença deste material acarreta num deslocamento dos potenciais redox sugerindo a modificação na superfície dos eletrodos de grafite com o poli(4-HBA) formado com diferentes propriedades eletroquímicas nos valores de pH investigados. Contudo, os filmes poliméricos apresentam um comportamento redox, quando imersos somente em solução de KCl 0,10 mol dm^{-3} na mesma região do par $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. Isto mostra que os VC da Figura 42A, mesmo quando preparados em diferentes pHs apresentam não somente o processo de transferência do par redox, mas também uma contribuição do filme, conforme já fora discutido no item 4.1.5. Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), foram realizadas para melhor compreensão das propriedades elétricas dos filmes de poli(4-HBA).

4.2.4 – Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica

A Figura 43 mostra os espectros de impedância eletroquímica, conhecidos como diagramas do plano complexo (Nyquist) e de Bode, dos eletrodos EG e EG/4-HBA, obtidos em potencial de +0,30 V. Nesta região de potencial, a corrente é faradaica com contribuições dos processos redox do filme e do par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, conforme discutido e apresentado na Figura 42A e Figura 42B.

Para os eletrodos EG e EG/4-HBA eletropolimerizado em pH 12,13 pode ser observado um semicírculo na região de alta frequência seguido de um comportamento do tipo Warburg, o que evidencia um sistema cineticamente controlado por difusão. Para os EG/4-HBA eletrogerados em pH 0,50 e 7,03, os sistemas apresentam dois semicírculos bem definidos, um na região de altas frequências e outro na região de baixas frequências, como fica evidente pelas duas constantes de tempo observadas no diagrama de Bode (Figura 43).

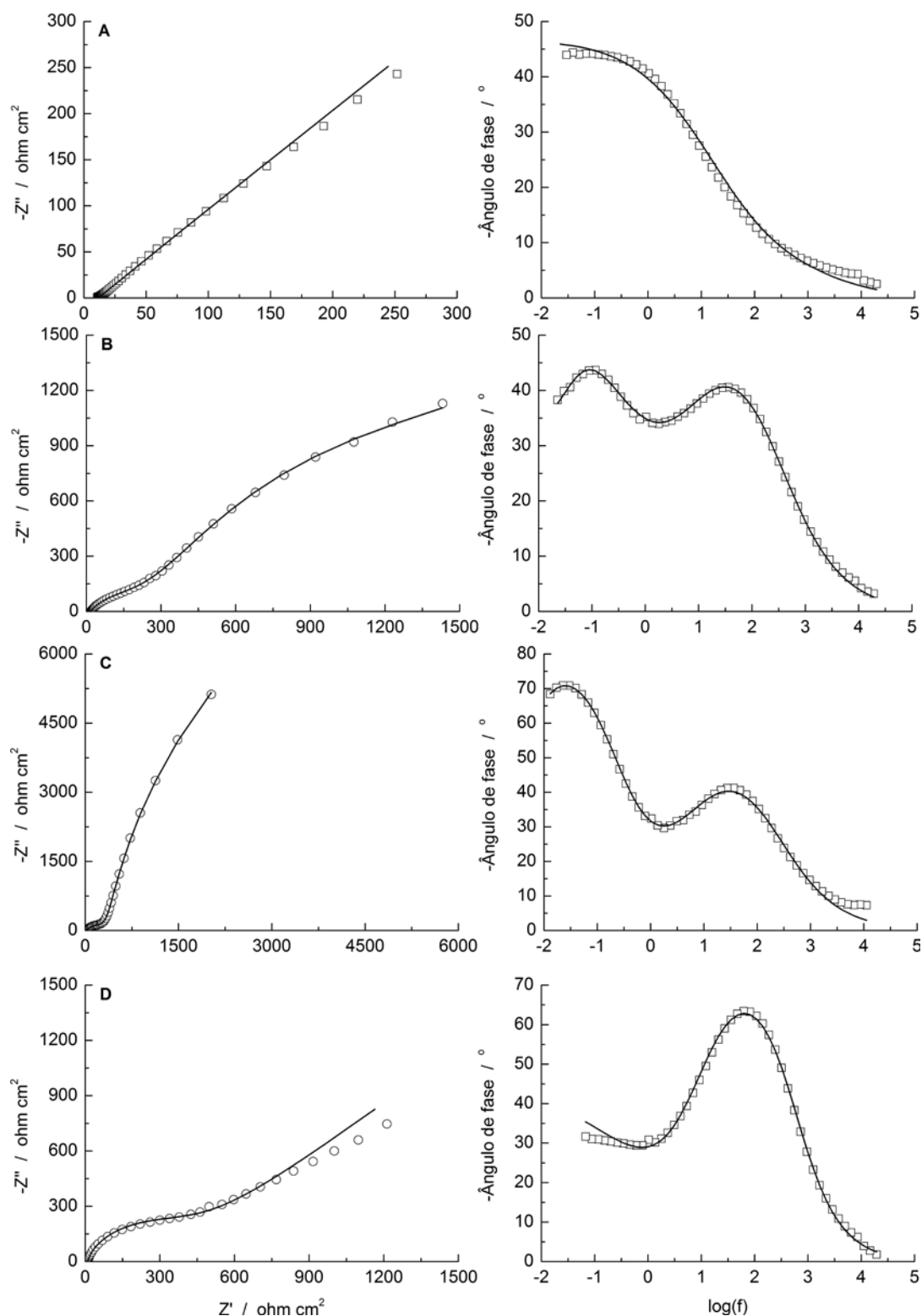


Figura 43: Diagramas de Nyquist (o) e Bode () dos espectros de impedância eletroquímica do EG e EG/4-HBA, obtidos em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ $5,00 \text{ mmol dm}^{-3}$ contendo KCl $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$, sendo (A) EG; e EG/4-HBA eletropolimerizados em pH (B) 0,50; (C) 7,03 e (D) 12,13. $E_{pa} = 0,30 \text{ V}$; Amplitude 10 mV ; Intervalo de Frequência: 10^6 a 10^{-2} Hz . As linhas sólidas representam o ajuste dos dados experimentais a um circuito equivalente.

Um circuito equivalente, para ajuste dos resultados experimentais, constituído de combinações em série e paralelo de resistências e capacitâncias foi proposto para análise dos resultados. O melhor circuito equivalente, utilizado para os eletrodos de grafite e grafite com poli(4-HBA) em pH 12,13 é constituído por um circuito de Randles, $R_S[(R_{ct,1}W)Q_{dl,1}]$. Contudo para os filmes de poli(4-HBA) eletropolimerizados em pH 0,50 e 7,03, o melhor circuito encontrado é o representado por $R_S[(R_{ct,1}W)Q_{dl,1}](R_{ct,2}Q_{dl,2})$, mostrado na Figura 44. Os parâmetros representados entre “*parênteses*” são aplicados aos elementos em paralelo e entre “*colchetes*” aos parâmetros descritos em série.

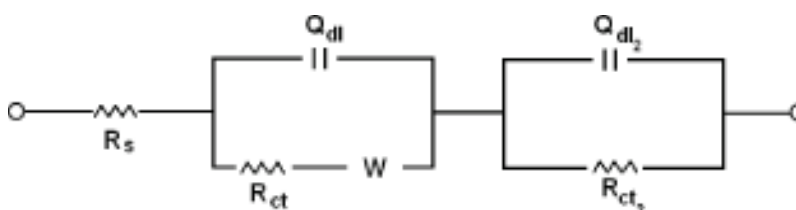


Figura 44: Circuito equivalente proposto para simulação dos dados experimentais.

Os circuitos apresentaram razoáveis valores de chi-quadrado (χ^2), na ordem de 10^{-3} , apoiando um baixo erro estatístico na simulação dos dados experimentais. A necessidade do uso de dois circuitos para os filmes polimerizados em pH 0,50 e 7,03 sugere a formação de um filme polimérico altamente rugoso/poroso fazendo com que o primeiro conjunto $[(R_{ct,1}W)Q_{dl,1}]$ descreva a área superficial externa do filme enquanto que o segundo $(R_{ct,2}Q_{dl,2})$ descreva a resposta da área superficial mais interna. Esta conclusão é apoiada pelos voltamogramas cíclicos dos filmes formados em pH 0,50 e 7,03 os quais mostram intensidades de correntes da resposta eletroquímica do filme bem maiores (ver Figura 40A e Figura 40B).

Os parâmetros, obtidos pela simulação estão reunidos na Tabela 5. Observa-se que as resistências ôhmicas total à solução R_S ($R_{\text{Solução}} + R_{\text{Filme}}$) para as eletropolimerizações conduzidas em pH 0,50 e 7,03 são significativamente maiores quando comparadas aos EG e EG/4-HBA produzido em pH 12,13.

Tabela 5: Parâmetros obtidos, a partir dos resultados de simulação de EIE para os EG e EG/4-HBA eletropolimerizados em função do pH.

	Grafite	pH 0,50	pH 7,13	pH 12,40
$R_S / \Omega \text{ cm}^2$	10,73	17,29	23,42	10,22
$Q_{dl} / \text{mF cm}^{-2}$	1,82	0,35	0,29	0,077
n_1	0,62	0,68	0,69	0,88
$R_{ct} / \Omega \text{ cm}^2$	3,73	240	295	411
$W / \Omega \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1/2}$	0,0053	0,0022	0,0080	0,0013
$Q_{dl2} / \text{mF cm}^{-2}$	----	6,75	2,08	----
n_2	----	0,95	0,96	----
$R_{ct2} / \Omega \text{ cm}^2$	----	719	22970	----
$\chi^2 / (\times 10^{-3})$	29,10	3,76	26,90	23,80

Os maiores valores de R_T indicam a deposição de um material, o qual apresenta um comportamento mais resistivo, principalmente quando polimerizado em meio neutro. Esta conclusão está de acordo com o comportamento no potencial de retorno (ver Figura 42B), a qual mostra uma transição gradual e não abrupto (característico de materiais com baixa resistência). O valor do R_T para o poli(4-HBA) eletrogerado em pH 12,13 é análogo ao do eletrodo de grafite. Possíveis explicações para este resultado podem ser: *i)* formação de um filme muito condutor; *ii)* formação de “cristalitos poliméricos localizados” na superfície; ou *iii)* pouco material polimérico formado. As análises das Figura 42B-d e Figura 40C sugerem que a formação limitada do filme é a explicação mais plausível. O fato de que, na simulação dos resultados experimentais, o eletrodo de grafite puro e o modificado em pH 12,13 requererem circuito equivalentes idênticos também apóia esta conclusão.

O valor da resistência de transferência de carga, $R_{ct,1}$, aumenta com o aumento no valor de pH de eletropolimerização. Este fato é diretamente refletido na diminuição da corrente de oxidação do par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (ver Figura 42A) bem como da baixa atividade eletroquímica em solução de KCl (Figura 42B). O valores de $R_{ct,2}$, quando comparados aos valores de $R_{ct,1}$, são muito mais elevados, sugerindo que a contribuição ao processo eletródico da região interna é muito menor. Também cumpre mencionar

que os valores do $R_{ct,2}$ apresentam na mesma dependência do pH do eletropolimerização.

A capacitância da dupla camada, C_{dl} , fornece informações a respeito da rugosidade/porosidade podendo ser tomada como uma medida da superfície polimérica. O decréscimo nos valores de $C_{dl,1}$ em função do pH de preparação do filme, mostra que ocorrem mudanças significativas na área externa dos eletrodos. Para o eletrodo não-modificado o maior valor de $C_{dl,1}$ pode ser explicado pela alta rugosidade do eletrodo, sendo que à medida que ocorre a polimerização na superfície do eletrodo esta começa a ser recoberta, diminuindo a contribuição da porosidade. É observado que a eletropolimerização conduzida em meio ácido, levam a valores de $C_{dl,1}$ aproximadamente 4x maior quando comparado ao polímero eletrogerado em pH 12,13. Estes altos valores de $C_{dl,1}$ sugerem maior eficiência de eletropolimerização nestes pH de polimerização, ou seja, existe um maior número de grupos superficiais oxidáveis/reduzíveis. Este resultado é consistente com o comportamento dos voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 41. Quando se comparado os valores de $Q_{dl,2}$ com $Q_{dl,1}$ é observado que os primeiros são bem maiores, sugerindo que a área interna eletroquimicamente ativa é muito maior. O comportamento da análise de impedância é consistente com os valores de rugosidade obtidos por MFA e MECQ, discutidos posteriormente nos itens 4.2.5 e 4.2.7. Na análise de MFA maiores valores de rugosidade são observados quando a eletropolimerização é efetuada em meio ácido (548 nm), contudo este valor é bem próximo a eletropolimerização conduzida em pH 12,13 (540 nm), isto sugere que em meio básico pode estar havendo um depósito polimérico, contudo este não é tão eletroquimicamente ativo ao polímero formado em pH ácido. Por outro lado, maiores valores de depósito de massa, observado por MECQ, foram observados em pH ácido ($1,68 \mu\text{g cm}^{-2}$), seguidos por pH básico ($0,66 \mu\text{g cm}^{-2}$) e neutro ($0,49 \mu\text{g cm}^{-2}$), ver discussão no item 4.2.7.

4.2.5 – Estudos em microbalança de cristal de quartzo

Medidas realizadas em microbalança de cristal de quartzo permitem analisar as variações de frequência de um cristal oscilante concomitante a técnicas eletroquímicas convencionais. O sistema é baseado num eletrodo de trabalho de cristal de quartzo, recoberto em ambas as faces com um fino depósito metálico (ouro, platina, etc.). A aplicação de um potencial alternado promove uma oscilação no cristal em um modo

ressonante à medida que o material está sendo adsorvido/dessorvido do depósito metálico em contato com a solução de interesse promove uma alteração desta frequência oscilante. Sauerbrey em 1959²⁶⁰, deduziu a equação que leva o seu nome, na qual relaciona as variações de frequência com as variações de massa do material adsorvido/dessorvido permitindo uma sensibilidade de análise em escalas de nanogramas. Além disso, a técnica é responsável pela análise de fluxo de íons nos sistemas além de outros processos interfaciais, podendo ser utilizada na construção de sensores.

A Figura 45, mostra os perfis de j/E e dm/E para dois ciclos contínuos de um experimento de 10 ciclos em um cristal de quartzo modificado com ouro, em velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} para 4-HBA $2,50 \text{ mmol dm}^{-3}$ em meio aquoso nos diferentes valores de pH (0,50, 7,03 e 12,13) utilizando-se ácido sulfúrico $0,20 \text{ mol dm}^{-3}$ como eletrólito suporte. O ácido sulfúrico foi utilizado ao invés do ácido perclórico para evitar o uso de sal de perclorato para manutenção da força iônica do meio reacional.

Snook e colaboradores²⁷⁹ classificaram as reações interfaciais usando a MECQ em cinco classes e uma delas se refere a processos não faradaicos que são associados às variações de massa com adsorção específica de íons perclorato sobre a superfície de ouro, no nosso trabalho, uma adsorção não desejada. A concentração também é menor ($0,20 \text{ mol dm}^{-3}$ ao invés de $0,50 \text{ mol dm}^{-3}$) para evitar o surgimento de cromo na superfície de ouro. Esta preocupação é devida aos eletrodos serem manufaturados com esse metal para promover a aderência entre o ouro e o cristal²⁸⁰. Shiu e colaboradores²⁸¹ estudaram a eletropolimerização de 2-fenilenodiamina usando diferentes concentrações de ácido sulfúrico. Os melhores resultados utilizando a MECQ foram obtidos com $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ do que com $0,50 \text{ mol dm}^{-3}$ de ácido sulfúrico devido à alta acidez e a presença de excesso de ânions sulfato, mostrando um decréscimo na cobertura de superfície dos sítios eletroativos sobre o eletrodo de ouro.

Como pode ser visto na Figura 38, há um deslocamento no potencial de pico do monômero para potenciais mais catódicos com o aumento do valor de pH. Este fato vem do processo de protonação/desprotonação do monômero, facilitando a eletropolimerização devido ao aumento da nuvem eletrônica. As diferenças nos comportamentos dos voltamogramas são originados da troca dos eletrodos e do eletrólito suporte, eletrodo de ouro (EO) ao invés de grafite, e ácido sulfúrico ao invés de ácido perclórico, respectivamente, e os valores baixos de corrente devido às mudanças na concentração.

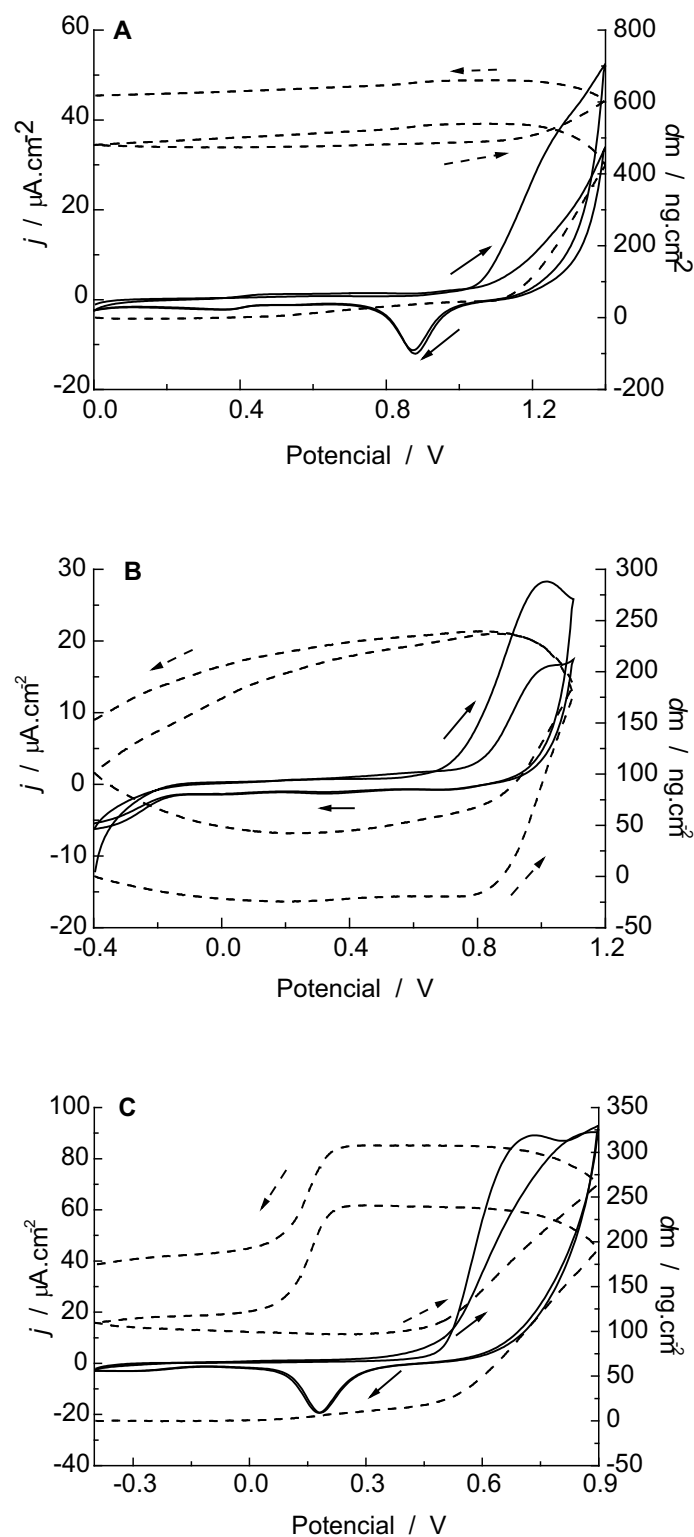


Figura 45: Perfis de j/E e dm/E para dois VC contínuos na eletropolimerização do 4-HBA em pH: (A) pH 0,50, (B) pH 7,03 e (C) pH 12,13. $[4\text{-HBA}] = 2,50 \text{ mmol dm}^{-3}$; Eletrólito: $\text{H}_2\text{SO}_4 = 0,20 \text{ mol dm}^{-3}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. As linhas pontilhadas se referem ao eixo da direita (dm).

Os potenciais de pico do monômero, sobre os eletrodos de grafite e eletrodos de ouro são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6: Valores de E_{pa} obtidos em $2,50 \text{ mmol dm}^{-3}$ de 4-HBA utilizando EG em $0,50 \text{ mol dm}^{-3}$ de ácido perclórico e EO em $0,20 \text{ mol dm}^{-3}$ de ácido sulfúrico. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

pH	Eletrodo de grafite / $E_{p,a} \text{ (V)}$	Eletrodo de ouro / $E_{p,a} \text{ (V)}$
0,50	1,15	1,27
7,03	0,93	1,01
12,13	0,61	0,73

Todos os três gráficos da Figura 45 são similares com exceção do fato de existir uma onda de redução em pH 0,50 e a pH 12,13. Esta onda é similar àquela obtida no processo de limpeza e condicionamento eletroquímico dos eletrodos de ouro em solução de ácido sulfúrico, estando relacionada a redução do óxido de ouro (AuO) para Au metálico, que é formando somente após a varredura do EO a potenciais acima de +1,25 V, respectivamente.

Na Figura 45C a faixa de potencial está entre -0,4 e +0,9 V. Esta diferença de potencial não é suficiente para promover a oxidação do ouro para óxido de ouro e originar, assim, a típica onda de redução. Na Figura 45A, a faixa de potencial usada foi entre 0,0 e +1,4V. Pode-se dizer que a onda de oxidação à +1,27 V é devida à oxidação do ouro gerando a onda de redução subsequente. A tendência esperada seria o aumento dos valores desta onda de oxidação com os ciclos sucessivos, o que não é observado. Ao contrário, há uma grande queda nos valores de corrente a pH 0,50 e um deslocamento para potenciais mais anódicos durante os sucessivos ciclos, sugerindo a formação de um filme com propriedades não condutoras¹¹⁷. Isto está de acordo com os dados obtidos das soluções padrão contendo o par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (Figura 42) e é válido para todos os três valores de pH, os quais apresentam respostas similares, com um decréscimo nos valores de corrente na onda de oxidação do monômero.

Esta informação é importante para eliminar a contribuição de contra íons e a viscoelasticidade do filme devido ao fato de nos estágios iniciais de eletropolimerização, o filme polimérico apresenta-se fino e o efeito de viscoelasticidade

deve ser desprezível. Também o eletrodo, coberto com uma fina camada de filme, evita a adsorção não desejada de íons sulfato. De outra maneira não poderíamos dizer que os valores de massa são devidos preferencialmente à deposição do filme polimérico sobre a superfície do eletrodo.

A Figura 46 mostra o perfil dm/dQ para os primeiros voltamogramas em cada valor de pH investigado. Pode ser visto que, em todos os casos, há uma linearidade sugerindo um comportamento ideal e também se observa perda de massa no fim de cada ciclo. Esta perda de massa é pequena em pH 0,50 e mais evidente no pH 12,13.

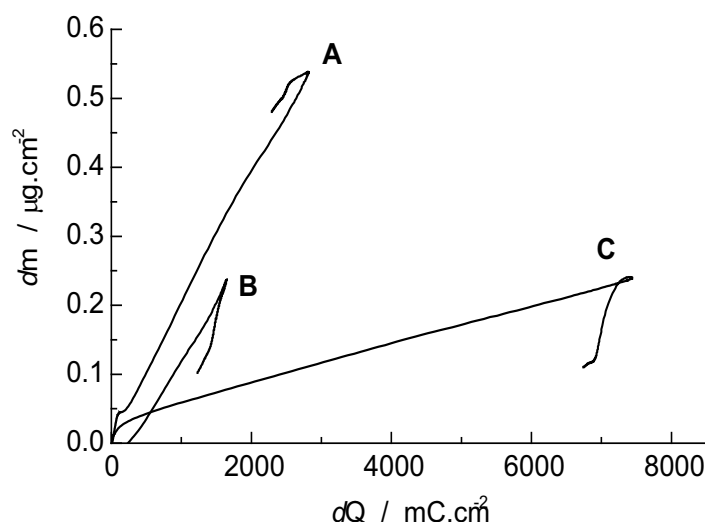


Figura 46: Perfil dm/dQ para o primeiro VC de eletropolimerização do 4-HBA em pH: (A) pH 0,50; (B) pH 7,03 e (C) pH 12,13. $[4\text{-HBA}] = 2,50 \text{ mmol dm}^{-3}$; Eletrólito: $\text{H}_2\text{SO}_4 = 0,20 \text{ mol dm}^{-3}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

O filme formado em pH básico é o único filme que apresenta um decréscimo em massa, no potencial da onda de redução a +0,189V. Note que, para esse experimento a pH 12,13 apresentar a mesma deposição de massa em relação ao pH 7,03, a carga deve ser 4,5 vezes maior. Em um valor intermediário de carga, o meio reacional mais ácido (pH 0,50) apresenta a maior quantidade de material.

Como pode ser observado em todos os perfis dm/E , a deposição do material sobre a superfície do eletrodo começa no potencial relacionado à formação da primeira onda de oxidação (formação dos primeiros cátions-radicaís). Em todos os meios reacionais estudados, o aumento de material adsorvido na superfície do eletrodo é bem

regular do primeiro ao décimo ciclo. Em pH 0,50, apenas após o segundo ciclo é que apresenta tal regularidade, como pode ser visto na Figura 47.

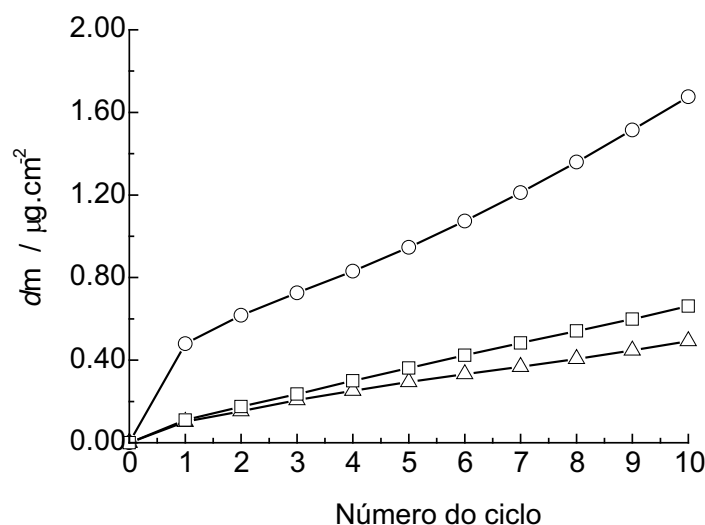


Figura 47: Valores de densidade de massa ao final de cada ciclo em função do número de ciclos em: (o) pH 0,50, (Δ) pH 7,03 e () pH 12,13.

A Figura 47 claramente mostra que maior quantidade de material é depositado na eletropolimerização realizada em pH 0,50 e uma maior homogeneidade de deposição do segundo ao décimo ciclo. Ambos os experimentos a pH 7,03 e pH 12,13 começam bem similares. Com os sucessivos ciclos, a pH 12,13, a deposição começa a se distanciar da obtida a pH 7,03 em pequena extensão. Estes dados estão de acordo com os resultados apresentados pela análise de MFA que sugere uma quantidade de material sobre eletrodos de grafite com maior deposição a pH 0,50 e pouca diferença entre os outros dois polímeros.

4.1.6 – Estudo eletroquímico da estabilidade do filme

A estabilidade eletroquímica dos filmes de poli(4-HBA) é um importante fator para determinar futuras aplicações deste material eletropolimerizado sobre os eletrodos de grafite. Para todos os valores de pH investigados, os melhores filmes poliméricos eletroquimicamente ativos foram os obtidos em pH 0,50 e 7,13. Nestes valores de pH, a atividade eletroquímica do poli(4-HBA) foi verificada por 100 ciclos consecutivos de

varredura de potencial entre +0,20 a +0,90 V para pH 0,50; e -0,40 a +0,50 V para pH 7,03, em velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , com o mesmo eletrólito utilizado na eletropolimerização. Pela integral do pico de oxidação anódica, a carga armazenada no filme foi determinada para cada ciclo.

A Figura 48 mostra o aumento da perda relativa de carga em função do ciclo de potencial realizado. Esta porcentagem de perda ($\% Q_p$) foi determinada a partir da carga obtida pela integração do pico de oxidação, dada pela relação apresentada na Equação 10:

Equação 10:

$$\% Q_p = \frac{Q_1 - Q_n}{Q_1} \times 100 \quad (2)$$

onde: Q_1 é a carga voltamétrica obtida filme eletrogerado e Q_n é a carga obtida após n ciclos de potencial.

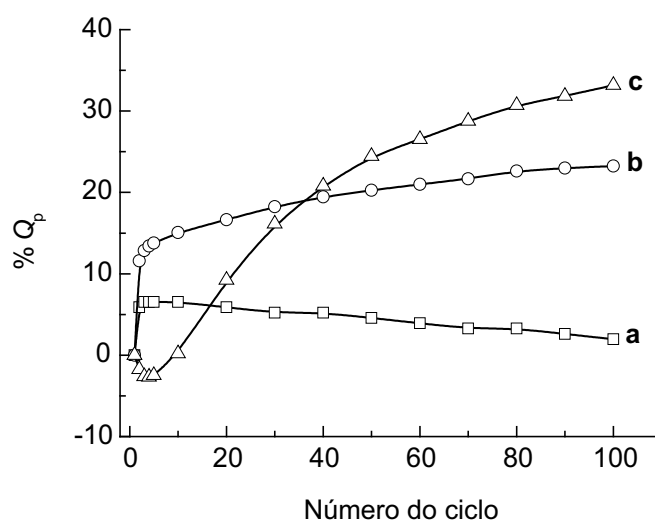


Figura 48: Porcentagem de perda de carga dos filmes de poli(4-HBA) eletropolimerizados em pH: () 0,50 e referente ao primeiro pico de oxidação, (O) 0,50 e referente ao segundo pico de oxidação e (Δ) 7,03. Eletrólito = HClO_4 $0,50 \text{ mol dm}^{-3}$, ajustado ao pH de eletropolimerização; Número ciclos = 100; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

É observado que, em pH 0,50, o decréscimo no valor da corrente de oxidação para o poli(4-HBA) é cerca de 7% para o primeiro ciclo de oxidação e cerca de 23% para o segundo processo redox. Quando material é eletropolimerizado em pH 0,50 (Figura 40A), não se observa variação do potencial de pico, em função do número de ciclos de potencial. Para filmes poliméricos eletrogerados a pH 7,03, a porcentagem de perda é cerca de 33% e o potencial de pico é deslocado para potenciais mais negativos com o aumento no número de ciclos de potencial. Para ambos os valores de pH, a diminuição da eletroatividade (menores valores de corrente) é observada com o aumento no numero de ciclos.

Esta diminuição da resposta eletroquímica está relacionada com a diminuição da extensão de conjugação da nuvem π de elétrons do polímero, bem como com o transporte de íons e solvente no interior da malha polimérica. Assim, foi efetuado o mesmo procedimento descrito anteriormente, contudo utilizou-se velocidades de varredura de 10, 20 e 50 mV s^{-1} . Os resultados são mostrados na Figura 49.

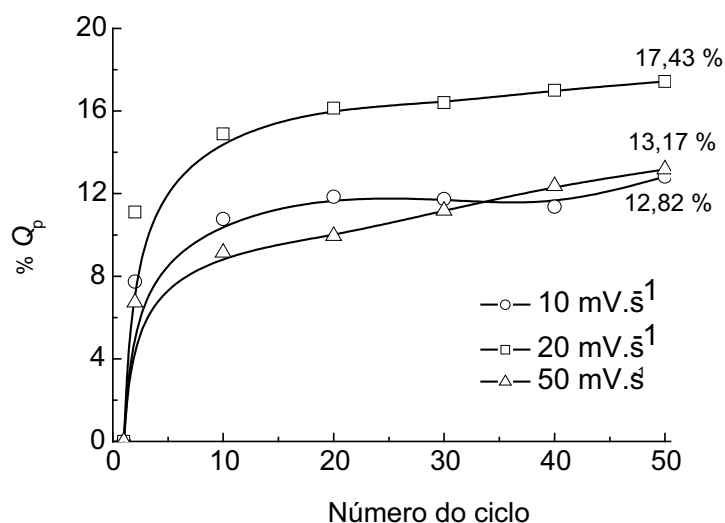


Figura 49: Percentual de perda de carga do eletrodo de grafite modificado com poli(4-HBA) vs. n^o de ciclos, registrados para o primeiro pico de oxidação, na eletropolimerização realizada em pH 0,50.

Para as velocidades de 10 e 20 mV s^{-1} , foi observado aumento nos valores de Q_p de poli(4-HB) até cerca de 10 ciclos. Com o aumento dos ciclos, a perda de carga do poli(4-HB) praticamente mantém-se inalterada. Para a velocidade de 50 mV s^{-1} o valor é

crescente. Observa-se que os valores da % de Q_p são maiores que os observados na Figura 48a, sugerindo que o processo realizado a velocidade de varredura mais baixa contribui para maior transporte iônico ao longo da cadeia polimérica. Por outro lado, observa-se uma menor resposta eletroquímica, ocasionando assim queda nos valores de corrente de oxidação. Para pH 7,03 resultados semelhantes foram observados.

4.2.7 – Estudos morfológicos e de superfície

A morfologia do EG e EG/4-HBA produzidos em diferentes valores de pH foram analisadas através de MFA, e são mostradas na Figura 50.

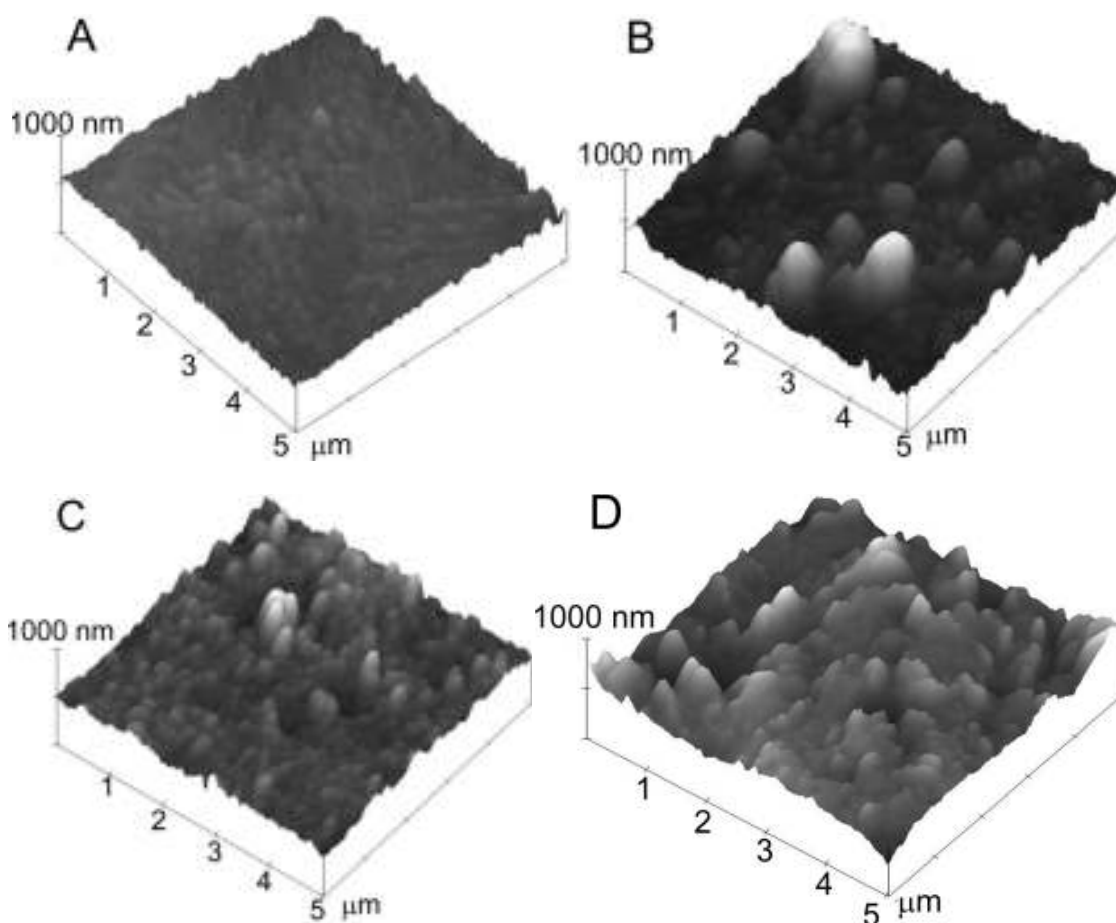


Figura 50: Imagens de MFA para: (A) EG e EG/4-HBA eletropolimerizado em (B) pH 0,50; (C) pH 7,03 e (D) pH 12,13.

Como pode ser observado na Figura 50, a morfologia dos eletrodos modificados com poli(4-HBA) mostraram diferentes topografias em função do pH. Os filmes preparados em pH 0,50 e pH 7,03 (Figura 50B e Figura 50C) apresentaram estruturas globulares distribuídas aleatoriamente na superfície do eletrodo. Filmes preparados em pH 0,50 (Figura 50B), mostraram menor número de glóbulos, mas com maior diâmetro. A superfície dos filmes preparados em pH 7,03 (Figura 50C) são mais homogêneas, de acordo com valores de rugosidade. Os filmes preparados em pH 12,13 (Figura D) mostraram uma morfologia irregular. Os valores de rugosidade determinados por MFA foram: eletrodo de barra de grafite (370 nm) e modificados com filmes de poli(4-HBA) preparados em: pH 0,50 (548 nm), pH 7,03 (411 nm) e pH 12,13 (540 nm).

4.3 – Caracterizações estruturais, fotoquímicas, térmicas e ópticas

Para caracterização das propriedades químicas e físicas do poli(4-HBA), produzido em pH ácido (melhor material eletroativo formado), o monômero foi eletropolimerizado sobre eletrodo cilíndrico de grafite, com área superficial maior, facilitando a produção e extração de maior quantidade de material, necessária para as caracterizações.

Para garantir que uma maior quantidade de material fosse depositada, a área superficial do eletrodo de trabalho bem como a concentração inicial da solução monomérica (cerca de 10x) foi aumentada. Após a realização do procedimento de extração do poli(4-HBA) com acetonitrila, foram obtidas cerca de 70 mg de poli(4-HBA). Assim, medidas de FTIR, DSC, TG e EF puderam ser realizadas com o polímero extraído, uma vez que tais medidas não poderiam ser realizadas sobre a superfície dos EG.

Pode ser observado pela Figura 51 que o comportamento eletroquímico de eletropolimerização é idêntico ao obtido sobre os eletrodos de grafite convencionais, (ver Figura 40A), utilizados nas demais análises utilizadas para investigar o comportamento eletroquímico dos filmes de poli(4-HBA).

Como observado na Figura 40A, há o aparecimento de dois processos redox na região entre +0,30 e +0,80 os quais aumentam sua atividade eletroquímica à medida que se aumenta o número de ciclos de potencial. O pico característico de oxidação do monômero também é preservado em cerca de +1,30 V. Isto permite dizer que o mesmo material está sendo eletrogerado sobre eletrodos cilíndricos de grafite, mesmo havendo

mudanças na concentração do monômero, eletrólito suporte e tamanho do eletrodo de trabalho.

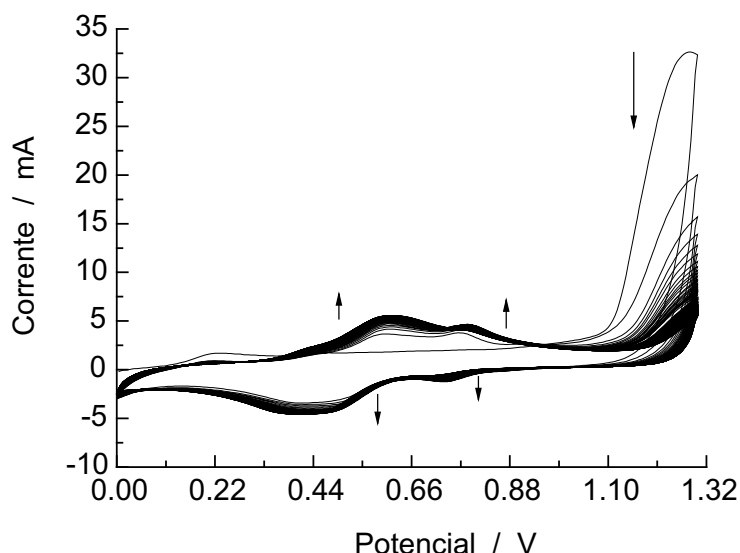


Figura 51: VC obtido pela eletropolimerização do 4-HBA sobre eletrodos de cilindro de grafite. $[4\text{-HBA}] = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$; Eletrólito = HClO_4 $2,50 \text{ mol dm}^{-3}$; Número ciclos = 100; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

A Figura 52 apresenta algumas imagens obtidas para o material produzido. Na Figura 52A pode ser observado, pela microscopia óptica, a superfície do eletrodo de grafite pelo qual o poli(4-HBA) foi gerado. A face branca indica região onde não houve polimerização, região esta delimitada quando o eletrodo foi imerso para procedimento de eletropolimerização. Informações sobre a aparência óptica do material pode ser observada, neste caso é nítida a existência de regiões “avermelhadas” sobre o grafite, o qual pode se dizer como sendo o poli(4-HBA). A Figura 52B, representa uma lâmina, onde foi adicionado uma pequena gota da solução de extração pela qual o poli(4-HBA) foi extraído, é possível observar que após a evaporação do solvente há a precipitação do poli(4-HBA) sobre a lamina de vidro, isto mostra claramente a eficiência do solvente na extração do polímero do eletrodo de grafite com acetonitrila. A Figura 52C, mostra o material após os procedimentos de extração e evaporação do solvente, sendo este o material que foi utilizado para as demais medidas de caracterização do poli(4-HBA).

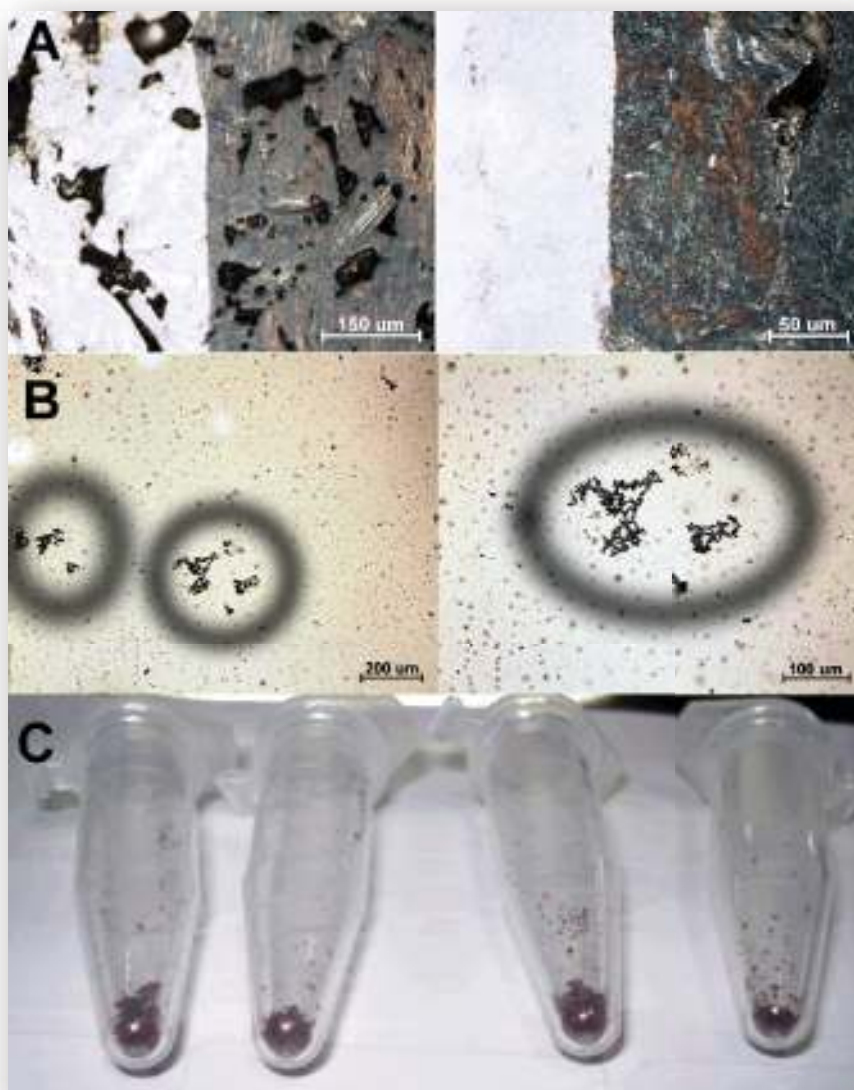


Figura 52: Imagens obtidas para poli(4-HBA): (A) adsorvido sobre a superfície dos eletrodos de grafite, (B) cristalizado em lâmina de vidro, após evaporação de acetonitrila e (C) extraído e seco e. Ampliações de 200x (esquerda) e 500x (direita).

4.3.1 – Comportamento fluorescente do 4-HBA e poli(4-HBA) em solução

A espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda, tem-se: $A = \log(I_0/I) = \epsilon bc$, onde A é a absorbância, I_0 é a intensidade da

radiação monocromática que incide na amostra e I é a intensidade da radiação que emerge da amostra. A absorvidade molar (ϵ) é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente. O termo c é a concentração da espécie absorvente e b , a distância percorrida pelo feixe através da amostra²⁸².

A espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis) envolve a espectroscopia de fótons (espectrofotometria). Ela utiliza luz na faixa do visível, do ultravioleta (UV) próximo e do infravermelho próximo. Nessas faixas de energia, as moléculas sofrem transições eletrônicas moleculares. Espectrofotometria na região UV-Vis do espectro eletromagnético é uma das técnicas analíticas mais empregadas, em função de robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas. Os procedimentos envolvem medidas diretas de espécies que absorvem radiação, medidas após derivação química e acoplamento a diversas técnicas ou processos, como cromatografia, eletroforese e análises em fluxo²⁸².

A Fluorescência é a capacidade de uma substância de emitir luz quando exposta a radiações do tipo raios ultravioleta (UV), raios catódicos ou raios X. As radiações absorvidas (invisíveis a olho humano) se transformam em luz visível, ou seja, de um comprimento de onda maior que a incidente. O fenômeno da fluorescência consiste na absorção de energia por um elétron, passando do estado fundamental (S_0) para o estado excitado (S_1). Este elétron, ao retornar ao estado fundamental, é acompanhado pela liberação de energia em excesso por meio da emissão de radiação. Na Fluorescência, todo o processo ocorre em tempo inferior a 0,00001 segundos.

Quando uma molécula absorve radiação eletromagnética, a maneira como ela retorna ao seu estado fundamental é regida por sua estrutura e pelas propriedades físico-químicas do seu ambiente local. Em algumas situações, o caminho de volta ao estado fundamental envolve a emissão de radiação. Se esta emissão é de um estado singlete o processo é chamado fluorescência, e o grupo molecular que emite a radiação é chamado fluoróforo. A fluorescência tem sido usada para estudar vários sistemas químicos, físicos e biológicos²⁸³.

O espectro de absorção UV-Vis para o 4-HBA obtido em acetonitrila ($\sim 10^{-5}$ mol dm^{-3}), é mostrado na Figura 53. É observada uma banda fina em 250 nm, sendo característica de transições π, π^* proveniente de anel aromático.

Para o poli(4-HBA) foram observadas mudanças significativas com relação às bandas de absorção, em comparação ao monômero. A banda fina em torno de 250 nm

referente às transições aromáticas π , π^* para o monômero passa a ser um ombro no polímero, indicando sobreposição devida possivelmente à maior conjugação no polímero. Há ainda uma maior absorção do polímero na região do visível (acima de 300 nm), com o aparecimento de um segundo ombro em torno de 330 nm característico de transição n , π^* que é parcialmente sobreposta por bandas π , π^* (Figura 53).

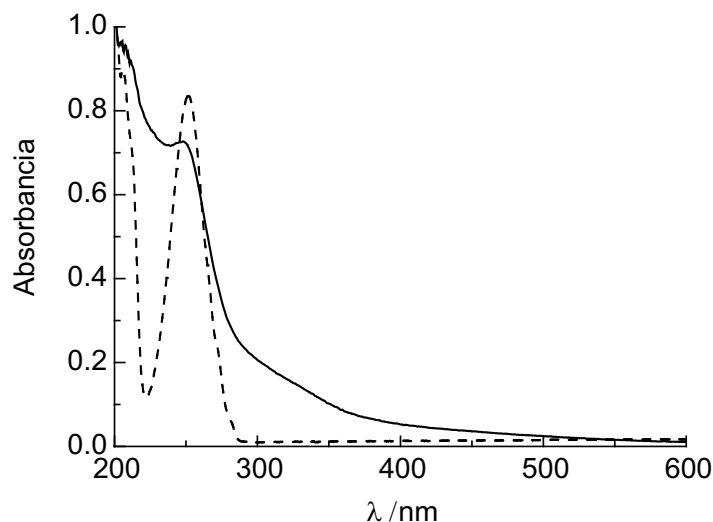


Figura 53: Espectro de absorção UV-Vis obtidos em acetonitrila para: (---) 4-HBA e (—) poli(4-HBA).

Os espectros de excitação e emissão de fluorescência do monômero 4-HBA foram registrados em acetonitrila ($\sim 10^{-5}$ M) em temperatura ambiente (25°C) e são mostrados na Figura 54. O espectro de excitação do monômero foi praticamente homotético ao correspondente espectro de absorção, o que confirma que as espécies fluorescentes são idênticas as que absorvem (ver Figura 54). O espectro de excitação do monômero 4-HBA é caracterizado por um pico intenso em 265 nm com uma ondulação em torno de 250 nm. Em contraste, seu espectro de emissão de fluorescência exibe apenas um pico máximo localizado em 300 nm.

Já o espectro de excitação do polímero mostra um pico intenso menos resolvido em 270 nm, com outras manifestações em 290 nm e 340 nm possivelmente resultado do aumento de cromóforos formados na polimerização. O espectro de emissão é caracterizado por um pico centrado em 365 nm. Similarmente, no caso do monômero, o espectro de emissão do poli (4-HBA) não altera com a mudança do valor do comprimento de onda, isto sugere que há somente uma espécie fluorescente.

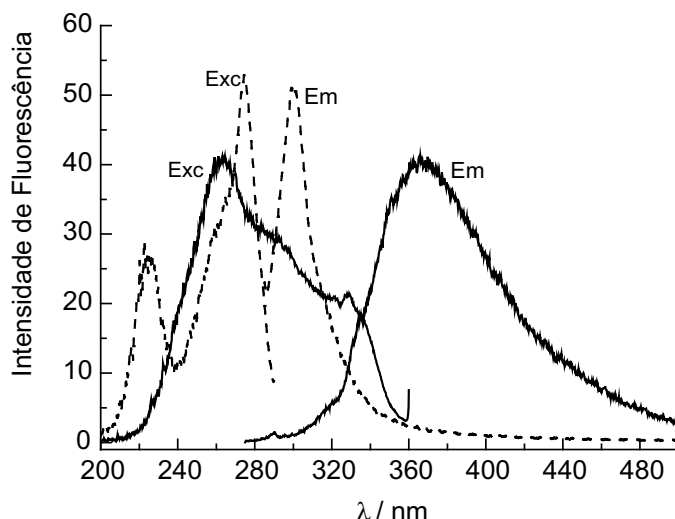


Figura 54: Espectro de excitação (ex) e emissão (em) de fluorescência obtidos em acetonitrila para: (---) 4-HBA e (—) poli(4-HBA). Temperatura ambiente (25°C).

Há um significativo deslocamento batocrômico no máximo de emissão de fluorescência ($\Delta\lambda_{em} = 65$ nm) do polímero com relação ao monômero. Este efeito implica em uma importante deslocalização eletrônica π nos estados singlete excitado do polímero, resultado da presença de importantes segmentos conjugados nas cadeias dos oligômeros do poli (4-HBA), e uma diminuição significativa dos níveis de energia do estado singlete excitado com relação ao monômero (Figura 54).

4.3.1.1 – Dependência do pH na intensidade de fluorescência

Foram realizadas medidas de UV-Vis de 4-HBA e poli(4-HBA) em meio ácido e básico, com o objetivo de se verificar as propriedades ópticas do material polimérico, quando submetido a meios extremos de valores de pH. Os grupos $-OH/O^-$ e $-COOH/COO^-$ são grupamentos auxocromos, os quais promovem uma alteração no comprimento de onda e intensidade de absorção de luz no espectro de UV-Vis do monômero, em diferentes valores de pH, conforme observado na Figura 55.

O espectro de absorção do monômero apresenta uma fina banda em 255 nm em meio ácido, o qual pode ser atribuído a transição π, π^* , característica de absorção de anel aromático que sofre uma importante influência do grupamento $-COOH/COO^-$ que está ligado diretamente no anel. Em meio básico, a presença do grupo $-OH/O^-$ contribui

mais para a absorção do monômero em um comprimento de onda maior do que em meio ácido, em cerca de 281 nm, o que pode ser definido como um deslocamento batocrômico, indicando que mais de uma espécie/grupo está absorvendo.

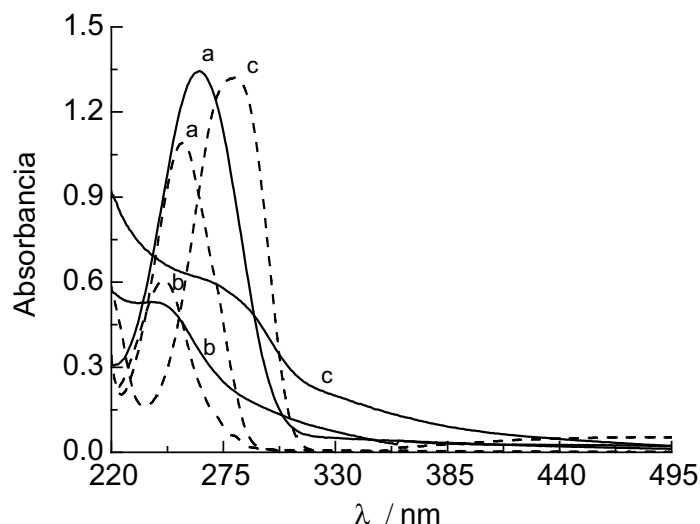


Figura 55: Espectros de absorção do UV-Vis obtidos para: (----) 4-HBA e (—) poli(4-HBA) em: (a) HClO_4 0,50 mol dm^{-3} (pH 0,40); (b) tampão fosfato 0,10 mol dm^{-3} (pH 7,40) e (c) NaOH 0,50 mol dm^{-3} (pH 13,6).

Para o polímero, em meio ácido ocorre também um deslocamento da banda de absorção para comprimentos de onda maiores, em aproximadamente 264 nm. Este deslocamento está na ordem de 10 nm, e pode ser justificado pelo aumento na extensão de conjugação, para o poli(4-HBA). Em meio básico, o espectro de absorção do polímero, é menos resolvido, ocorrendo também um “alargamento” da banda.

Uma absorção máxima pode ser observada em aproximadamente 279 nm. Praticamente o λ_{max} de absorção não é alterado quando comparado ao monômero. Este efeito pode ser explicado por possíveis interações de hidrogênio intermolecular, entre o grupamento fenóxido com o grupamento carboxilato, o que pode promover a formação de uma estrutura molecular mais rígida, exigindo portanto uma maior quantidade de energia para excitação.

Observa-se, pela Figura 56, os espectros de emissão de fluorescência do 4-HBA e poli(4-HBA) em meio ácido e básico. Em meio ácido, Figura 56A, o espectro de excitação do 4-HBA é caracterizado por um pico em 265 nm e o espectro de emissão de fluorescência exibe um pico máximo localizado em 321 nm. O espectro de excitação do

poli(4-HBA) mostra uma banda com máximo em 282 nm e o espectro de emissão é caracterizado por duas bandas de emissão: uma de menor intensidade, com pico máximo em 310 nm e outra, de maior intensidade em 405 nm.

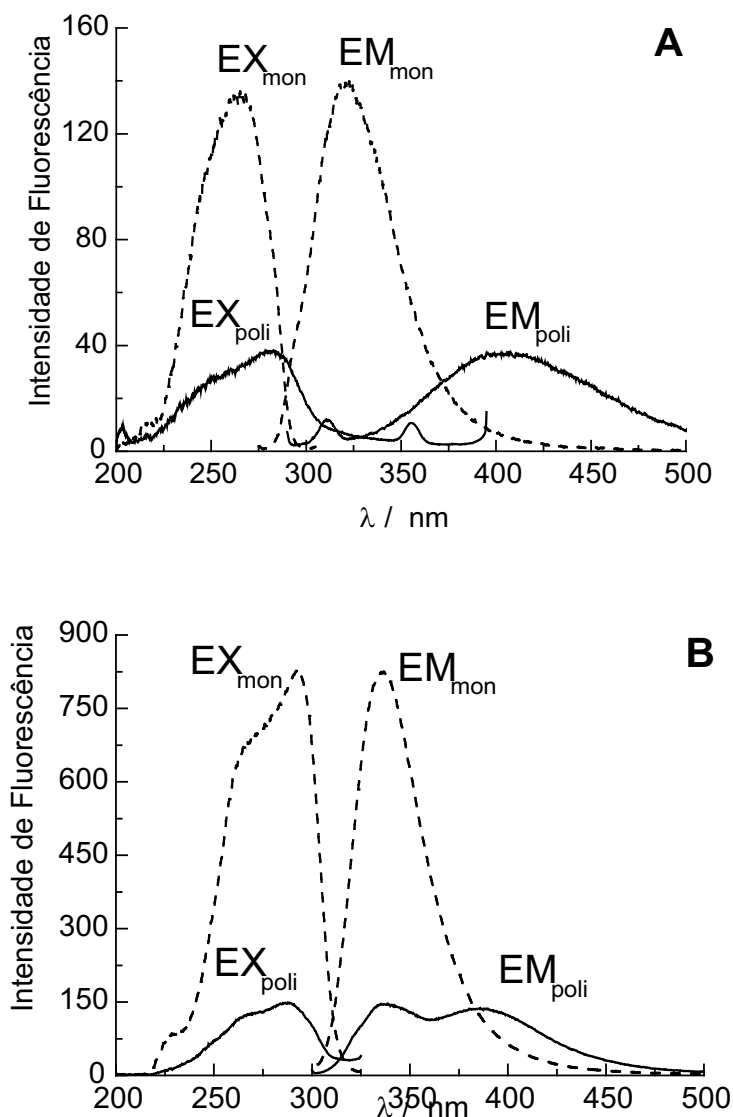


Figura 56: Espectros de fluorescência de excitação (EX) e emissão (EM) obtidos para: (---) 4-HBA e (—) poli(4-HBA) em: (A) HClO_4 0,50 mol dm^{-3} (pH 0,40) e (B) NaOH 0,50 mol dm^{-3} (pH 13,6).

Em meio básico, Figura 56B, o espectro de excitação do 4-HBA é caracterizado por um pico em 293 nm e um ombro em 266 nm. Já o espectro de emissão de fluorescência exibe um pico máximo localizado em 336 nm. O espectro de excitação do poli(4-HBA) mostra uma banda com máximo em 288 nm e um ombro em 266 nm e o

espectro de emissão é caracterizado por duas bandas de emissão: uma de maior intensidade, com pico máximo em 336 nm e outra, de menor intensidade, em 388 nm.

Para o poli(4-HBA), a inversão das intensidades das bandas de emissão de fluorescência, em meio básico em relação ao meio ácido, ocorre principalmente por causa da influência da protonação/desprotonação dos grupos ligados ao anel aromático. Em meio ácido, o grupamento -COOH/COO^- tem uma influência maior sobre o espectro de emissão de fluorescência do polímero e, possivelmente, o pico máximo em 405 nm está relacionado com a influência do mesmo sobre o anel aromático, sendo o pico de menor intensidade (310 nm) relacionado ao grupo -OH na sua forma protonada. Em meio básico, a influência do íon fenóxido se torna mais evidente, e isto pode ser mais uma vez confirmado pela inversão das intensidades dos picos máximos das bandas de emissão para o poli(4-HBA), em comparação com os valores observados em meio ácido. A banda em 310 nm sofre um aumento de intensidade, bem como um deslocamento batocrômico de 16 nm em relação à mesma banda em meio ácido, o que indica a forte influência do íon fenóxido sobre o processo de emissão, já para a banda em 388nm, observa-se um deslocamento hipsocrômico (17nm) em relação à mesma banda em meio ácido e sua intensidade diminui significativamente.

Tanto em meio básico quanto em meio ácido ocorre um deslocamento batocrômico no máximo de emissão de fluorescência ($\Delta\lambda_{\text{em}}=84$ nm em meio ácido e $\Delta\lambda_{\text{em}}=52$ nm em meio básico) do monômero em relação ao polímero. Este forte efeito implica em uma importante deslocalização eletrônica π no estado singlete excitado do polímero, resultando na presença de importantes segmentos conjugados nas cadeias dos oligômeros do poli(4-HBA), e uma significativa diminuição dos níveis de energia do estado singlete excitado em relação ao 4-HBA.

4.3.1.2 – Dependência do solvente na intensidade de fluorescência

Quando se obtém espectros de absorção e de emissão de um cromóforo em solventes de diferentes polaridades, mudanças na posição, intensidade e forma das bandas de absorção podem ser encontradas. Essas mudanças são resultantes de interações físicas intermoleculares soluto-solvente (tais como íon-dipolo, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, ligação de hidrogênio, dentre outras), que tendem a alterar a diferença de energia entre o estado fundamental e o excitado²⁸⁴⁻²⁸⁶. Com relação aos

espectros eletrônicos de absorção molecular, para o monômero e o polímero não houve mudanças significativas na forma e intensidade das bandas de absorção, ou seja, a mudança de polaridade do solvente não alterou os estados eletrônicos fundamentais e excitados, tanto do polímero quanto do monômero, conforme observado na Tabela 7.

Tabela 7: Valores dos picos de absorção e emissão para 4-HBA e poli(4-HBA) em diferentes solventes.

	<i>Absorção ($\lambda_{máx}$)</i>		<i>Emissão ($\lambda_{máx}$)</i>			
	Monômero	Polímero	Monômero		Polímero	
Solvente			excitação	emissão	excitação	emissão
Água	250	216	262	320	260, 302	401
Etanol	251	250	260	306	265, 295	375
Acetonitrila	253	250	263	320	262, 329	365
DMSO	---	---	277	303	277, 302	347, 387
DMF	---	---	279	327	279, 337	383

Em relação aos espectros de excitação, nota-se que não ocorreram mudanças significativas na forma e intensidade das bandas do monômero e do polímero, mas observa-se um deslocamento batocrômico nos espectros de emissão com o aumento da polaridade do solvente. Utilizando-se a água como solvente, o deslocamento foi maior, comparando-se com o etanol e a acetonitrila que são solventes menos polares que a água. Com as interações polares entre o soluto e o solvente, espera-se a ocorrência de deslocamento batocrômico da banda de emissão com o aumento da polaridade do solvente. Se o estado excitado é π , π^* (bandas características de transição eletrônicas tanto do monômero quanto do polímero), este, por possuir momento de dipolo superior ao do estado fundamental, sofrerá influência positiva de interações com solventes polares, acarretando em um deslocamento batofluosolvatocrômico da banda de emissão maior.

As bandas de absorção em DMSO e DMF, não puderam ser obtidas devido a sobreposição dos sinais de absorção do solvente e material investigado na região de comprimento de onda abaixo de 300 nm.

4.3.2 – Análises de DSC e TG

A análise térmica foi definida por Mackenzie²⁸⁷ como sendo “*um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação é medida, enquanto a amostra é submetida a uma programação de temperatura*”.

Dentre as técnicas termoanalíticas mais utilizadas encontram-se a *Análise Térmica Diferencial*, na qual se acompanha a variação de temperatura da amostra em relação a um material inerte de referência, e a Calorimetria Exploratória Diferencial, na qual se acompanha a variação da energia entre a amostra e a referência. Em um experimento de Calorimetria Exploratória Diferencial, mede-se a variação de entalpia que ocorre entre a amostra e a referência durante o processo de aquecimento/resfriamento. Diferentes arranjos de construção utilizam o mesmo nome para o equipamento, o arranjo mais simples é aquele no qual a amostra e a referência, contidas em seus respectivos suportes de amostra, são colocadas sobre um disco de metal. A troca de calor entre o forno e a amostra ocorre preferencialmente pelo disco. Para uma condição de fluxo de calor de estado estacionário, o sinal medido T (diferença de temperatura entre a amostra e a referência), é proporcional à diferença nos fluxos de calor, $\Delta\phi$. Um processo endotérmico na amostra, cria um $T < 0$ e $\Delta\phi > 0$, ou seja flui calor do disco para a amostra. O recíproco ocorre para um processo exotérmico²⁸⁸.

Como um caso particular das técnicas termoanalíticas, a Termogravimetria (TG), é a que acompanha a variação da propriedade física massa, da amostra em função do tempo (com a temperatura constante), ou em função da temperatura. O tipo mais comum de experimentos empregando esta técnica é a “Termogravimetria Dinâmica”, em que se submete a amostra a uma variação constante de temperatura (controlada por um programador), em um forno, enquanto uma balança monitora sua massa. O aparelho utilizado para a técnica é chamado “Termobalança” e para que se tenha resultados, é preciso que se originem produtos de decomposição térmica voláteis, ou que ocorra incorporação de átomos ou moléculas, provenientes dos gases da atmosfera do forno, respectivamente aumentado ou diminuindo a massa original da amostra²⁸⁹.

A Figura 57, mostra os termogramas obtidos para o ácido 4-hidroxibenzóico. A estabilidade térmica foi observada entre 25 a 176 °C Esta temperatura é o início do processo de decomposição observado na curva de perda de massa. A perda de massa do monômero se torna pronunciada com o aumento da temperatura em até 90% de perda de

massa, o que evidencia a decomposição térmica do monômero. É importante ressaltar que o processo de decomposição é acompanhado pela fusão do monômero, o qual se inicia a 214 °C como pode ser observado nos termogramas de TGA e DSC (Figura 57). O resultado é consistente com o valor da temperatura de fusão reportado na literatura para o monômero, bem como o conhecimento do processo de degradação que o mesmo sofre ao se fundir.

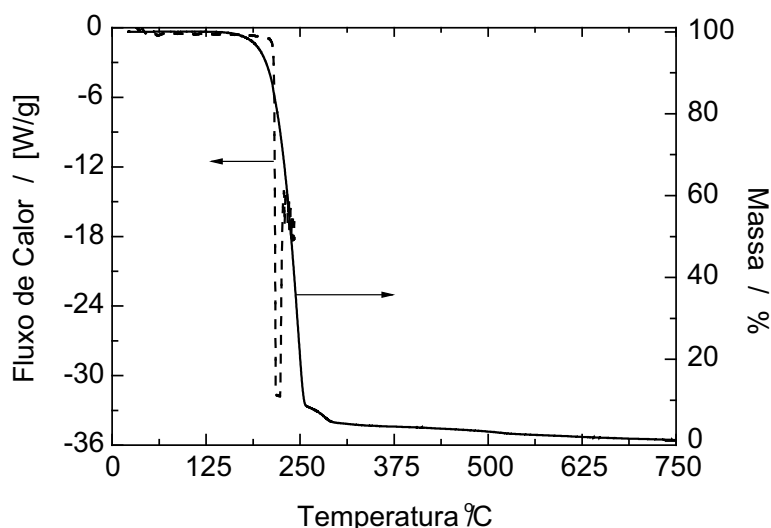


Figura 57: Termogramas de TGA (—) e DSC (---) obtidos para o 4-HBA.

O processo de fusão é acompanhado por 10% de perda de massa devido à competição entre fusão e decomposição. A finalização da fusão acelera o processo de decomposição e, no termograma de TGA, é observado um novo pico (ombro) a 250 °C provavelmente relacionado ao processo de decomposição.

O polímero mostrou uma curva térmica mais complexa, com quatro estágios de perda de massa, conforme mostra a Figura 58. No primeiro estágio, foi observada uma perda de massa de aproximadamente 20% a 100 °C. Devido à alta absorção de água pelo polímero, este processo é atribuído a dessorção de água. O segundo e terceiro estágios podem ser considerados juntos. Existe um declínio gradual da massa numa faixa de temperatura entre 100 e 520 °C, com uma perda de massa de aproximadamente 18%. É importante notar a presença de três picos endotérmicos na curva de DSC em 165, 318 e 432 °C (Figura 58). Estes picos estão relacionados a eventos térmicos que provavelmente podem ser atribuídos a processos de modificação e decomposição de fração de oligômeros.

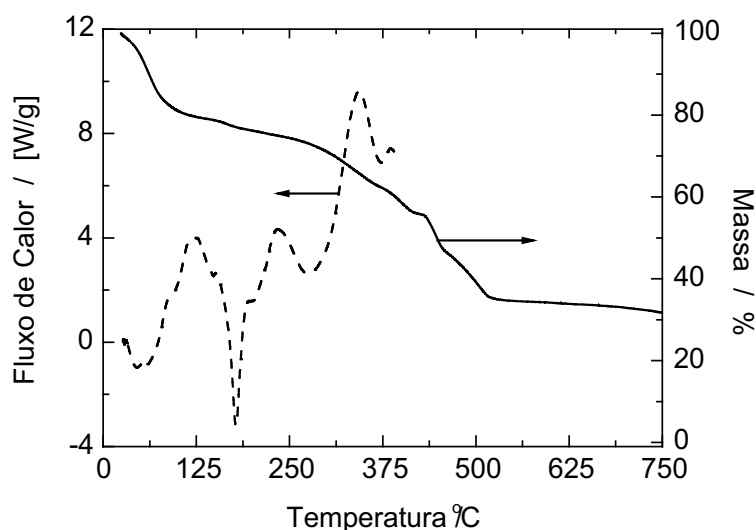


Figura 58: Termogramas de TGA (—) e DSC (---) obtidos para o poli(4-HBA).

Outro aspecto importante é que a perda de massa, na faixa avaliada, ocorre lentamente, isto acontece pelo fato de que o aquecimento pode estar acarretando um processo de polimerização adicional. Evidência favorável a esta hipótese é a melhora da estabilidade térmica do sistema no quarto estágio onde a perda de massa observada entre 520 a 800 °C é menos pronunciada que a observada no estágio anterior. Uma massa residual em cerca de 30% é mantida a cerca de 800 °C, isto mostra que o poli(4-HBA) apresenta boa estabilidade térmica em altas temperaturas que pode estar associada a extensão da cadeia polimérica formada no processo de eletropolimerização.

4.3.3 – Espectros de FTIR

Espectroscopia de absorção de Infra-Vermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica analítica baseada na frequência com que ligações químicas vibram quando submetidas à passagem de radiação eletromagnética (modo de transmissão).

Grupos funcionais e ligações polares dos elementos (por exemplo, Si, O, C, C e N) absorvem em comprimentos de onda específicos, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados nesse caso de níveis vibracionais). Tais frequências dependem da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do

acoplamento vibracional. Deste modo, a espectroscopia FTIR pode ser usada para medir tanto qualitativamente como quantitativamente esses elementos numa amostra²⁹⁰.

Devido à presença de vários grupos funcionais na molécula do monômero, é possível identificar um espectro de estrutura complexa, conforme pode ser observado na Figura 59. Na região entre 3500 a 2500 cm^{-1} , observa-se a deformação da ligação O-H devido à presença de OH fenólico (banda pouco ampla e intensa em 3400 cm^{-1}) e em seguida um conjunto complexo e mais amplo devido à presença de grupo OH de ácido carboxílico que normalmente se encontra entre 3300 a 2500 cm^{-1} . Devido à natureza aromática do ácido *p*-hidroxibenzoico, nesta região também (particularmente entre 3100 a 3000 cm^{-1}) existe a contribuição de bandas de absorção referentes ao estiramento da ligação C-H de compostos aromáticos.

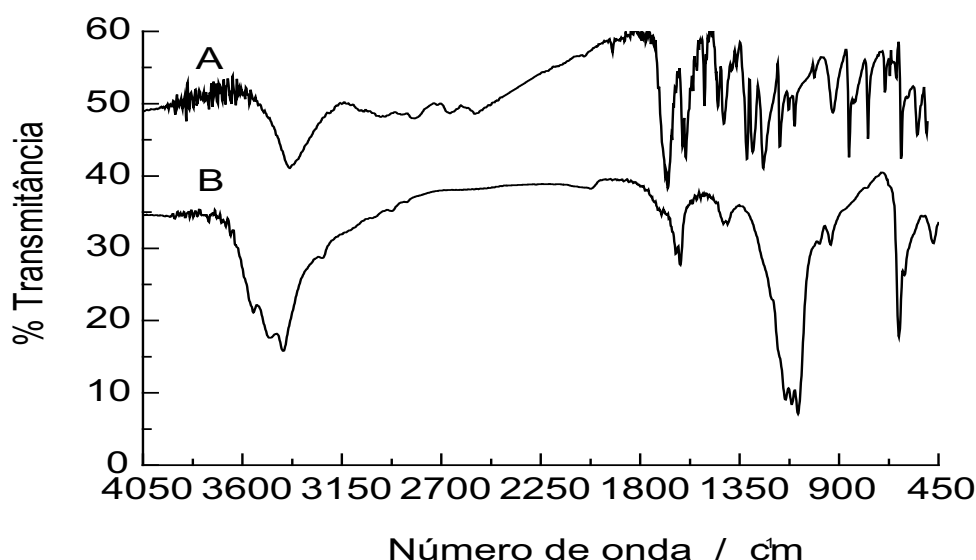


Figura 59: Espectros de FTIR obtidos em pastilhas de KBr para: (A) 4-HBA e (B) poli(4-HBA), com 20 ciclos consecutivos, em resolução de 4 cm^{-1} .

De forma geral, entre 2000 a 450 cm^{-1} , pode ser observado um conjunto complexo de absorções relativas aos grupos principais grupos funcionais existentes na molécula do monômero com destaque para: estiramento da ligação C=O, banda intensa centrada em 1678 cm^{-1} , as bandas em 1610 e 1594 cm^{-1} são associadas ao estiramento das ligações C=C do esqueleto aromático, a banda intensa centrada em 1243 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação C–O do ácido carboxílico. Cabe ressaltar que esta região entre 1300 a 1000 cm^{-1} apresenta uma série de bandas associadas ao estiramento

da ligação C–O e, neste caso, tanto ligada a estrutura do ácido carboxílico como ao OH fenólico do composto. A banda de média intensidade em 927 cm^{-1} pode ser atribuída principalmente a deformação fora do plano da ligação O–H do grupo ácido carboxílico. A região entre 900 a 695 cm^{-1} apresenta uma série de bandas de media intensidade, atribuídas principalmente ao caráter aromático do ácido 4-hidroxibenzóico (devido a deformações fora do plano das ligações C–H do anel aromático).

O polímero formado a partir da eletropolimerização do ácido 4-hidroxibenzóico apresenta um espectro modificado considerando o espectro do monômero de partida (ver Figura 59). Com destaque para algumas observações.

A região entre 4000 a 2000 cm^{-1} apresenta um conjunto de bandas intensas na região de estiramento da ligação O–H. Neste conjunto é possível distinguir pelo menos três bandas em 3558 , 3482 e 3415 cm^{-1} . O aparecimento destas 3 bandas pode estar associado a diferentes vizinhanças quanto a ligação O–H de fenol e de ácido carboxílico, presentes na estrutura, e possibilidade de envolvimento em ligações de hidrogênio. A presença destas bandas associadas ao aparecimento de bandas intensas entre 1200 a 1000 cm^{-1} , particularmente as bandas em 1143 e 1083 cm^{-1} sugere que o polímero produzido possui múltiplas ligações O–H e C–O respectivamente. Isto pode sugerir duas possíveis rotas para formação do polímero: *i*) a formação do polímero não envolve os grupos hidroxila na formação das ligações²⁹¹ ou *ii*) o polímero é formado predominantemente por ligações R–O–R como o poli(1,4-oxifenileno), fato suportado pela presença das bandas observadas na região de 900 a 1150 cm^{-1} ^{292,293}. Neste caso a elevada intensidade da banda de OH ainda observada poderia estar relacionada possivelmente a presença de várias frações de oligômeros produzidas durante a polimerização, ou ainda a formação de uma estrutura heterogênea, um copolímero contendo unidades fenólicas ligadas ao poli(oxifenileno). A presença de ligações R–O–R confirmaria a formação de uma estrutura semelhante ao polioxifenileno, entretanto não se observam bandas entre 1220 e 1250 cm^{-1} atribuídas ao estiramento da ligação C–O–C. Um indício da formação destas ligações, no entanto, pode ser sugerido devido à presença do ombro em 1203 cm^{-1} associado ao estiramento da ligação =C–O–C=.

A manutenção da estrutura do anel aromático pode ser considerada através da presença das bandas em 1642 , 1600 cm^{-1} atribuídas ao estiramento das ligações C=C do sistema aromático. Outro aspecto que deve ser ressaltado é a existência de uma banda na região de 1700 a 1650 cm^{-1} associada ao estiramento da ligação C=O. A baixa

intensidade desta banda, comparativa ao observado no monômero, sugere que, durante a polimerização, ocorrem reações que modificam de forma significativa a estrutura formada, com possível descarboxilação ou comprometimento da carbonila em ligações intermoleculares. A descarboxilação de derivados do ácido 4-hidroxibenzóico já foi observada na literatura em processos de polimerização enzimática que leva a formação do poli(1,4 oxifenileno)^{292,293}.

4.3.3.1 – Espectros de FTIR em função da temperatura

O poli(4-HBA) sofre processos de transições térmicas conforme já observado nos resultados de DSC e TG apresentados na Figura 58. Para avaliar se estes processos podem interferir em modificações estruturais do polímero, avaliou-se a preservação dos principais grupos funcionais do polímero pelos espectros de FTIR em função da temperatura de aquecimento. A Figura 60 mostra os espectros de FTIR para as amostras de poli(4-HBA) quando submetidas ao aquecimento em mufla por 15 minutos sob atmosfera inerte (N₂).

Os espectros foram obtidos em temperaturas de 150, 300, 450 e 600 °C. Como pode ser visto na Figura 60, as principais bandas observadas para o polímero sem tratamento térmico são mantidas, entretanto, é possível observar alterações na região 3600 a 3000 cm⁻¹, estiramento O–H, onde os três picos observados claramente são substituídos por uma banda larga centrada em 3453 cm⁻¹.

Em comparação ao espectro do polímero original, outra região alterada é a região entre 1200 a 1000 cm⁻¹, onde se observa perda da definição dos outros picos com o aparecimento de um ombro em 1192 cm⁻¹ e uma banda centrada em 1113 cm⁻¹. Quanto aos principais grupos funcionais, é possível sugerir que a estrutura do polímero não é fortemente alterada pelo tratamento térmico, entretanto a modificação destas bandas pode estar relacionada a processos de formação de novas ligações no polímero como o possível intercruzamento com o aumento da temperatura.

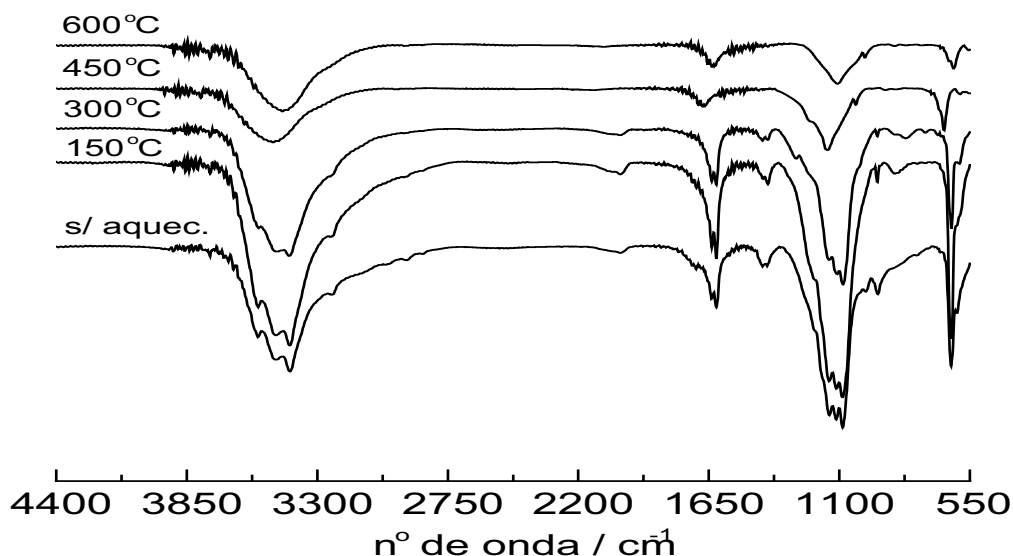


Figura 60: Espectros de FTIR do poli(4-HBA) em pastilhas de KBr, após tratamento térmico em mufla por 15 minutos em atmosfera inerte, obtidos com 20 ciclos consecutivos, em resolução de 4 cm^{-1} .

Na curva de TG (Figura 58), observa-se perda de massa durante os processos, no entanto, esta é gradativa em uma faixa ampla de temperatura o que indica razoável estabilidade térmica do polímero. Neste caso, arranjos estruturais podem estar ocorrendo, devido à incorporação de oligômeros e processos de intercruzamento da estrutura. Este fato é observado na polimerização do polietilfenol²⁹¹.

4.4 – Mecanismo proposto para eletropolimerização do 4-HBA

Conforme já mencionado, não há dados na literatura reportando a eletropolimerização do 4-HBA. Benyoucef e colaboradores²⁶³, investigaram recentemente a eletropolimerização por VC, do ácido 2-aminobenzóico (2-AAB), monômero similar ao 4-HBA, sobre eletrodos de ouro e grafite em meio aquoso utilizando-se ácido perclórico como eletrólito suporte.

O material eletroativo depositado foi investigado por medidas de FTIR in situ. Os autores propuseram o mecanismo de eletropolimerização do 2-AAB, via radical levando a formação da amina secundária, na qual são preservados os grupos carboxila

do monômero. O mecanismo proposto por Benyoucef e a estrutura do poli(2-AAB) é mostrada na Figura 61.

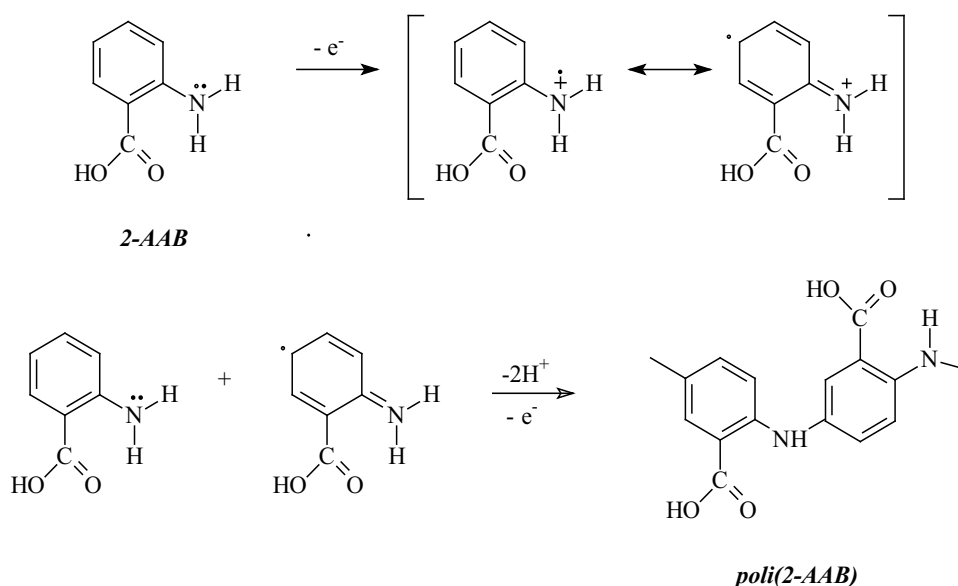


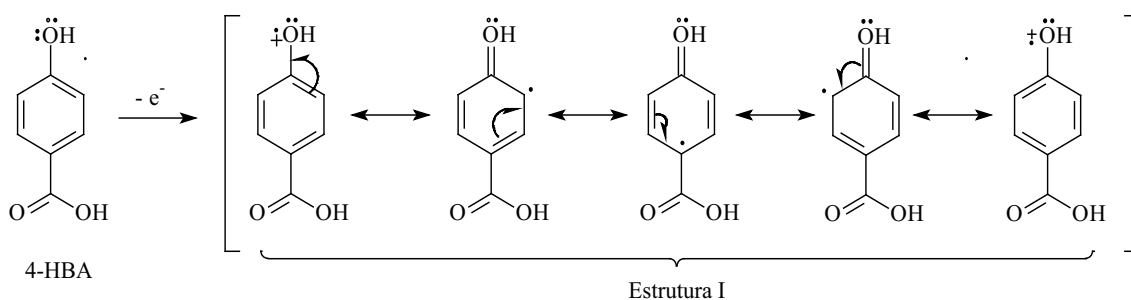
Figura 61: Mecanismo proposto na eletropolimerização do 2-AAB²⁶³.

A proposta mecanística de eletropolimerização do 4-HBA é baseada na mesma apresentada na Figura 61, contudo algumas considerações foram abordadas. Dentre elas podemos citar:

- Existência de reações EEC (Eletroquímica/Eletroquímica/Química) ou ECE (Eletroquímica/Química/Eletroquímica);
- O produto é formado preferencialmente por ataque nucleofílico e não radicalar conforme descrito por Benyoucef.

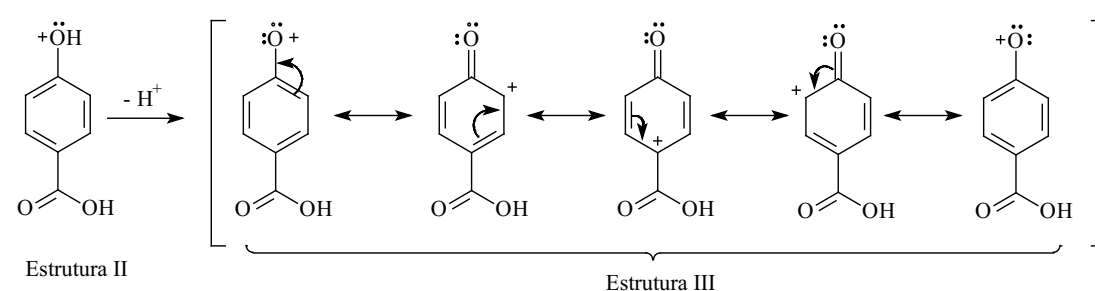
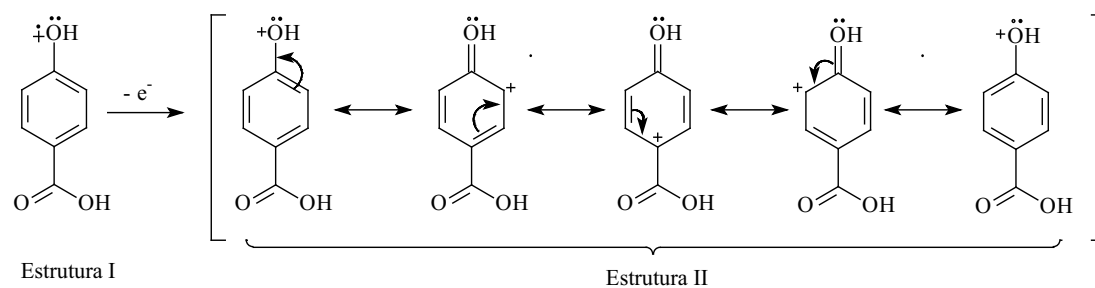
O mecanismo proposto para eletropolimerização do ácido 4-hidroxibenzóico segue as etapas mostradas na Figura 62.

Etapas 1: Oxidação eletroquímica do 4-HBA

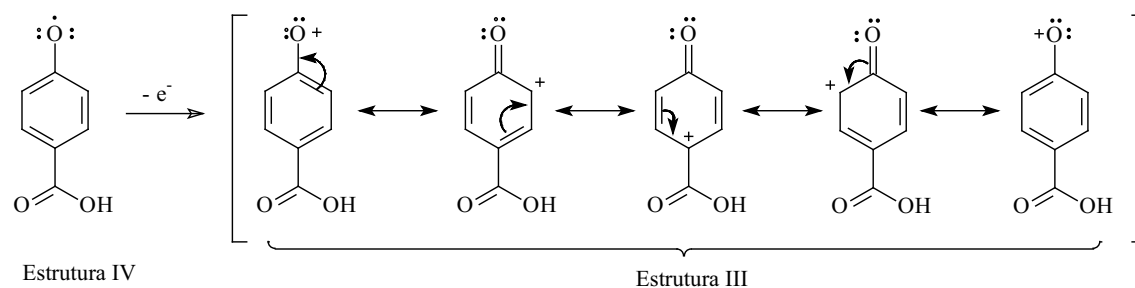
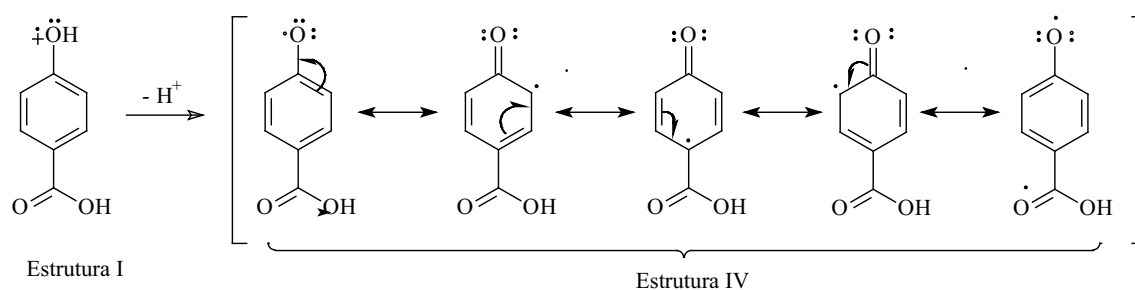


Etapa 2: Caminhos de reação EEC e ECE

Etapa 2.1 – Mecanismo EEC

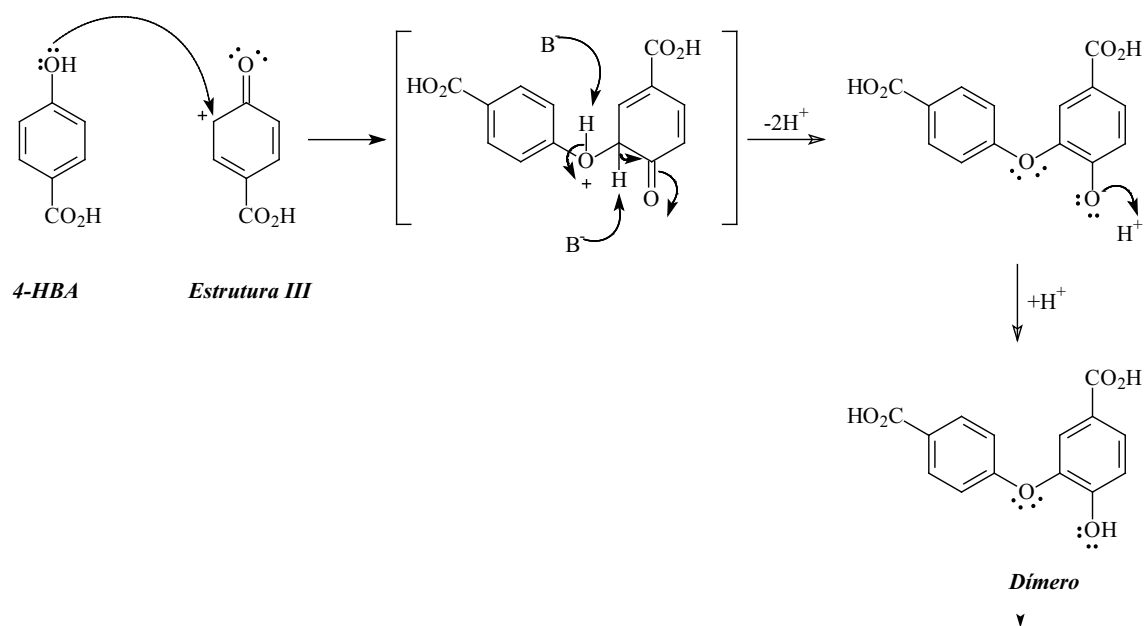


Etapa 2.2: Reação ECE

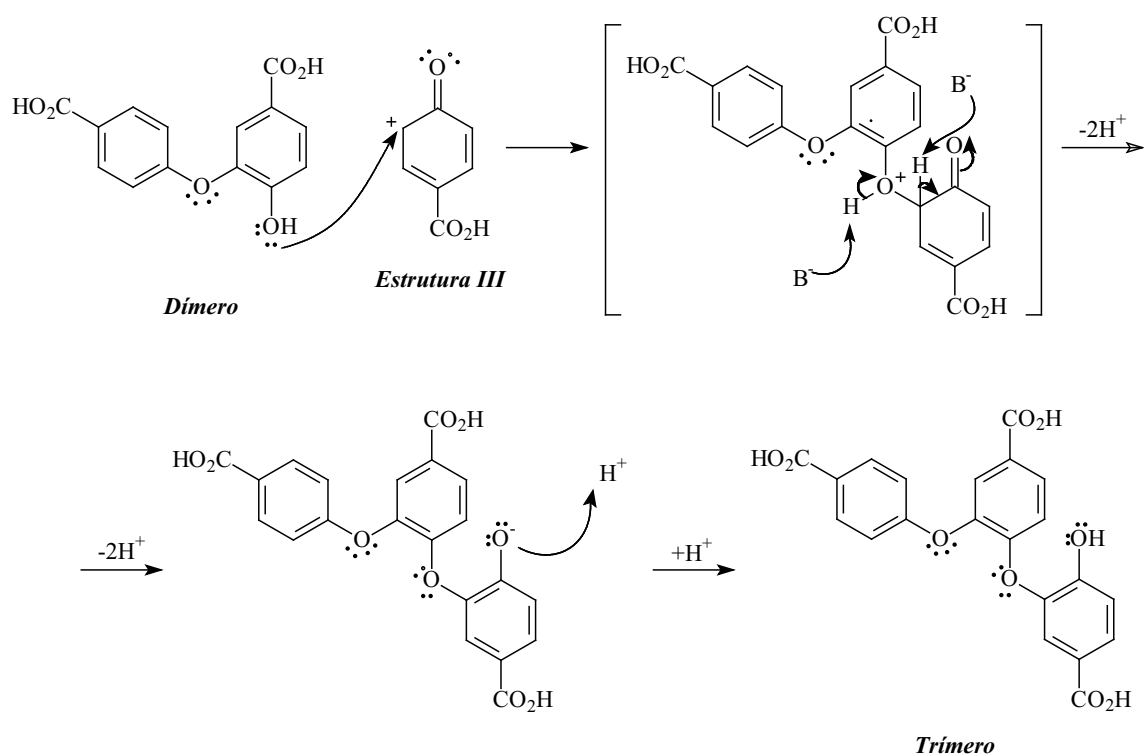


Etapa 3: Acoplamentos

Etapa 3.1: Formação Dímero.



Etapa 3.2: Formação de trímero.



Etapa 3.3: Formação Tetrâmero.

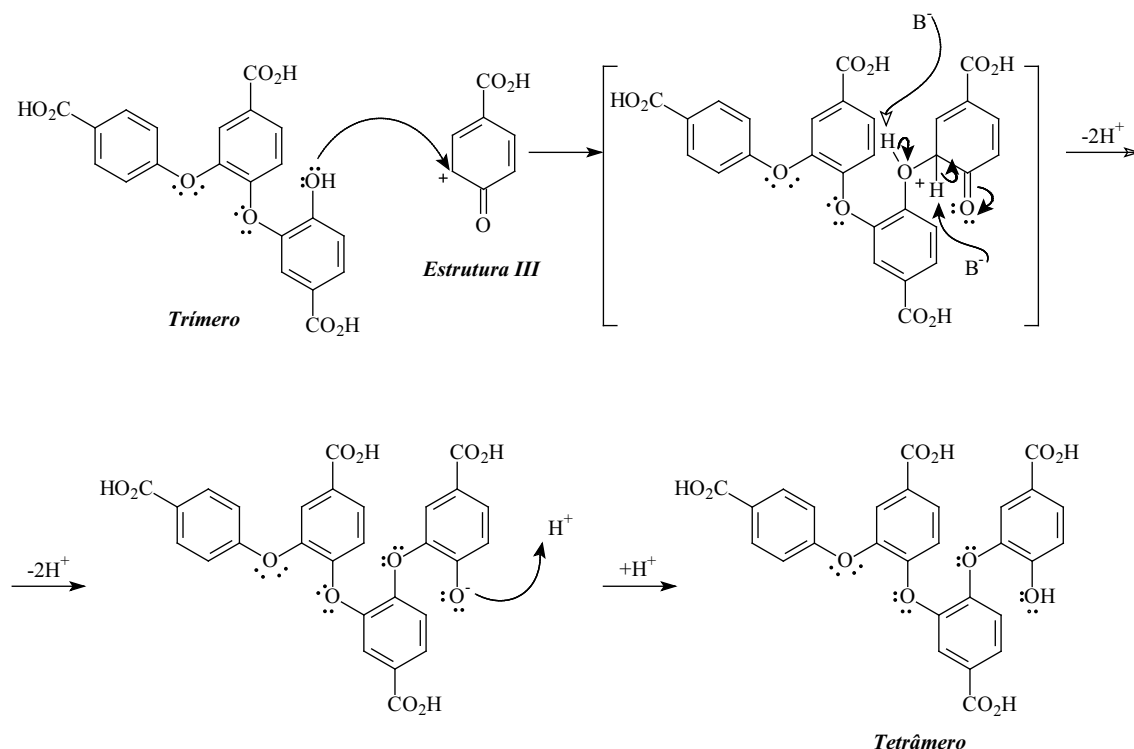


Figura 62: Mecanismo proposto na eletropolimerização do 4-HBA.

Na etapa I, ocorre a oxidação eletroquímica do monômero, com a perda de um elétron. Após esta oxidação é formado o cátion-radical que é estabilizado por suas respectivas estruturas de ressonância. Esta estrutura é o precursor do processo de eletropolimerização do 4-HBA.

Na etapa 2, a partir da formação do cátion-radical, o mecanismo pode seguir dois caminhos, EEC (Eletroquímico/Eletroquímico/Químico – Etapa 2.1) ou ECE (Eletroquímico/Químico/Eletroquímico – Etapa 2.2). Para o EEC, ocorrem duas oxidações sucessivas, com perda de um elétron em cada etapa, e posterior retirada de um próton na etapa química, contundo na etapa ECE há uma oxidação, perda de um próton e conseqüente oxidação. É importante ressaltar que ambos os mecanismos levam a mesma estrutura. A estrutura III, portanto, produto mais estável da reação EEC ou ECE deve participar no processo de eletropolimerização do 4-HBA. Este intermediário, sendo um cátion, é mais susceptível ao ataque eletrofílico do 4-HBA do que o cátion

radical, conforme proposto por Benyoucef. Desta forma, a proposta mecanística mais provável se dá pela interação do cátion/monômero e não cátion-radical/monômero.

Na etapa III, o par de elétrons do oxigênio da hidroxila do 4-HBA, ataca o carbocátion, via ataque nucleofílico, formando a ligação C-O-C e produzindo um novo carbocátion intermediário. A perda de dois prótons deste carbocátion, origina o produto de substituição (éter aromático). Devido ao meio fortemente ácido (HClO_4 0,50 mol dm^{-3}) é pouco provável a existência deste ânion no meio reacional. Deste modo, o ataque a um próton é extremamente favorável formando um dímero com carga neutra (Etapa 3.1). De maneira análoga, a hidroxila do dímero ataca outro carbocátion, seguindo o mesmo mecanismo, levando a formação do trímero (Etapa 3.2), e consecutivamente a reação se propaga na formação do tetrâmero (Etapa 3.3) até a formação das cadeias maiores do poli(4-HBA).

Para melhor compreender a conformação espacial do polímero formado, realizou-se uma simples otimização molecular utilizando-se o software ACD/Chem Sketch (Freeware) versão 12.01^t, contendo apenas 15 unidades do 4-HBA. A visualização em 2 ângulos diferentes da estrutura otimizada, proposta pelo software é mostrada na Figura 63. Observa-se que há distorção e rearranjo dos anéis aromáticos para fora do plano, para melhor estabilização da estrutura. Os grupos carboxílicos estão dispostos e susceptíveis a realizarem as ligações de hidrogênio intermoleculares.

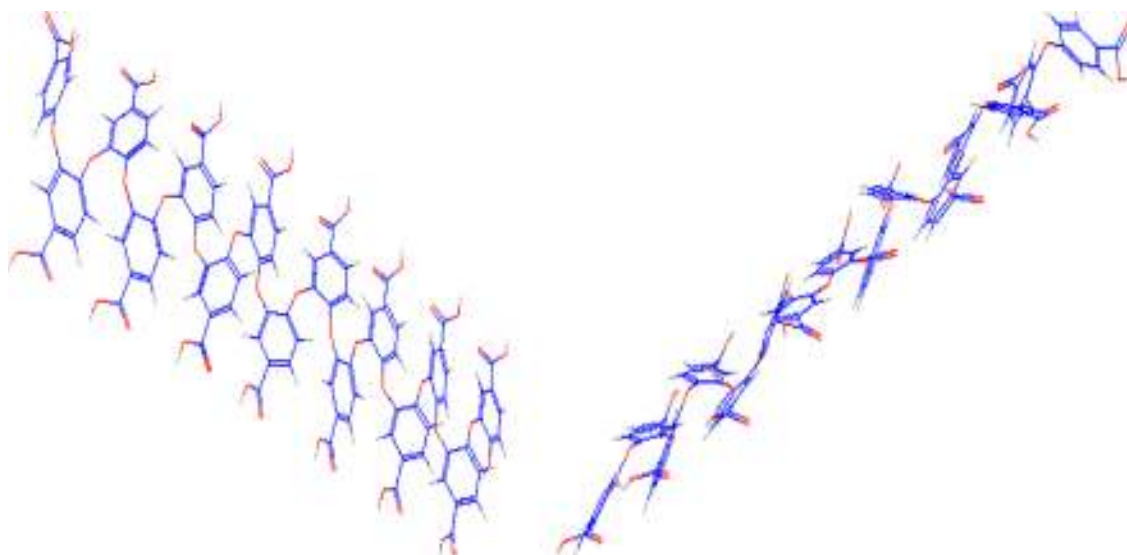


Figura 63: Estrutura espacial otimizada para o poli(4-HBA), contendo 15 unidades monoméricas.

^t Disponível em: <http://www.acdlabs.com/download/chemsketch>; Acesso em: 05/08/2009.

Outra rota de polimerização do 4-HBA, que deve ser avaliada é a eletropolimerização radicalar, envolvendo a estrutura IV. No caso deste mecanismo, para melhor entender os acoplamentos, o radical é apresentada na Figura 64.

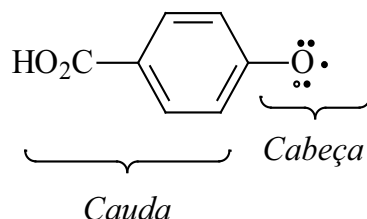


Figura 64: Estrutura radicalar envolvida no processo de eletropolimerização do 4-HBA.

Os encadeamentos possíveis podem ser expressos como: cabeça-cauda; cabeça-cabeça e cauda-cauda. As estruturas resultantes são apresentadas na Figura 65. Observa-se que para o acoplamento cabeça-cauda, o produto gerado é o mesmo da substituição nucleofílica, podendo ainda ser formados o peróxido (cabeça-cabeça) e a ligação anel-anel (cauda-cauda).

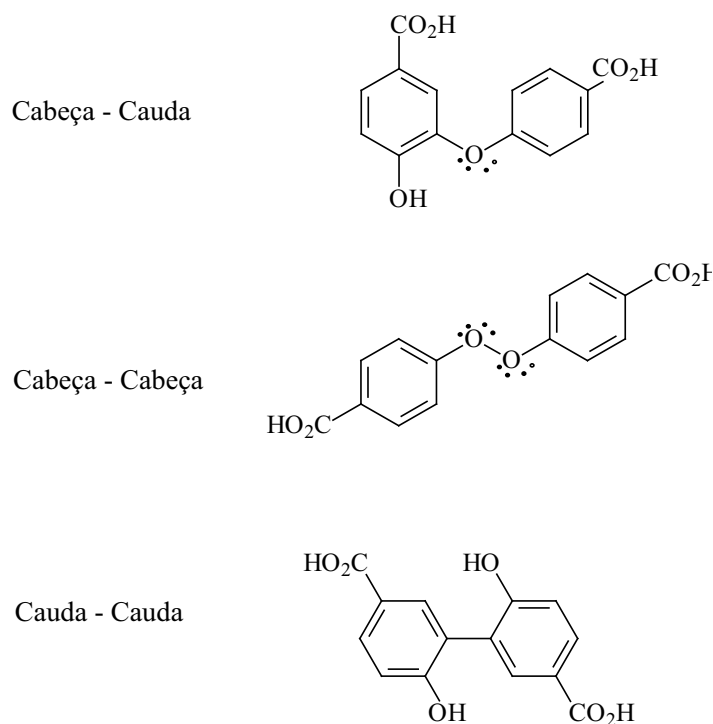


Figura 65: Prováveis acoplamentos na eletropolimerização do 4-HBA via mecanismo radicalar.

A formação do produto principal como sendo o éter aromático, proposta para o poli(4-HBA) pode ser suportada pelo espectro de FTIR. Para verificar esta afirmação, o mesmo procedimento de extração utilizado no item 4.3 foi realizado, contudo a concentração da solução de eletropolimerização foi mantida em $2,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ e não 25 mmol dm^{-3} a fim de se garantir um processo de eletropolimerização mais próximo ao utilizado sobre os EG. O espectro de FTIR para o poli(4-HBA) eletropolimerizado em concentração de $2,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ e extraído com acetonitrila é mostrado na Figura 66.

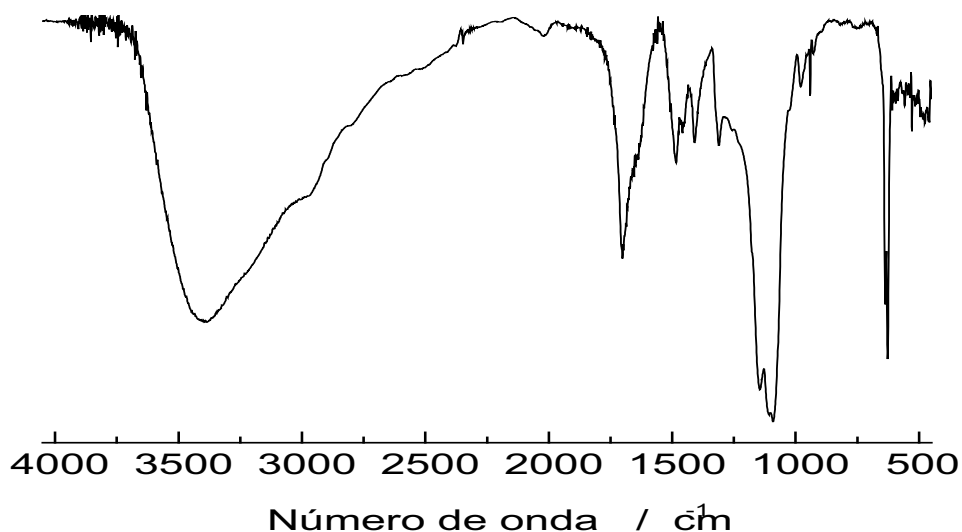


Figura 66: Espectro de FTIR obtido em pastilhas de KBr para o poli(4-HBA), eletropolimerizado em $2,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ do monômero e extraído em acetonitrila, com 20 ciclos consecutivos, em resolução de 2 cm^{-1} .

O espectro de FTIR apresentado na Figura 66 é bastante semelhante ao obtido na Figura 59, contudo é observado um deslocamento na banda de absorção de carbonila, de 1701 cm^{-1} (Figura 59) para 1618 cm^{-1} (Figura 66). As três bandas na Figura 59, referentes ao estiramento -C-O-C- em 1085 , 1112 e 1142 cm^{-1} praticamente se mantêm sendo observadas na Figura 66 em 1088 , 1112 e 1145 cm^{-1} . Isto permite dizer que a estrutura do polímero é preservada mesmo quando a eletropolimerização foi conduzida em concentração 10x maior que a utilizada nos EG (Figura 59). O deslocamento da banda do estiramento das ligações C=O está associado a possíveis interações de hidrogênio na estrutura do polímero, sendo mais permitidas em baixas concentrações do monômero. As bandas em 1637 , 1484 cm^{-1} atribuídas ao estiramento das ligações C=C do sistema

aromático, que confirmam a manutenção da estrutura do anel aromático. Contudo, investigações com ressonância magnética nuclear (RMN); cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS) devem ser avaliadas para confirmar a estrutura proposta.

A partir desta estrutura do poli(4-HBA) é possível prever suas formas oxidadas e reduzidas, as quais são mostradas na Figura 67.

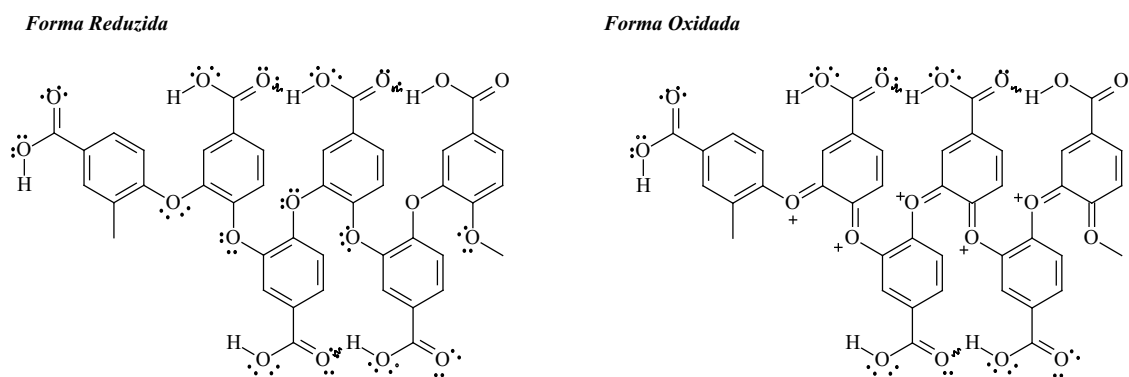


Figura 67: Estruturas propostas para as formas oxidada e reduzida do poli(4-HBA).

Observa-se, pelas estruturas propostas, que no poli(4-HBA) as interações de hidrogênio entre os dímeros de ácidos carboxílicos não são mais permitidas, o que resulta no aumento do comprimento de onda para a vibração do estiramento C=O.

Observa-se que tanto na forma reduzida como a oxidada podem ocorrer poucas interações dos grupos hidroxila e carboxila entre as moléculas no esqueleto polimérico. Isto poderia fazer com que a frequência do estiramento C=O diminuísse para menores comprimentos de onda.

Contudo para o poli(4-HBA), é observado um aumento na frequência do estiramento C=O, o qual pode ser justificado por dois fatores: i) aumento de conjugação na estrutura do poli(4-HBA); ii) na forma oxidada, o oxigênio está protonado, e as interações dos grupos carboxila e hidroxila não são permitidas. Deste modo, os grupos carboxílicos retornam aos seus valores característicos, os quais são próximos a 1700 cm^{-1} .

4.5 – Investigações para imobilização de biomoléculas

A etapa da imobilização de biomoléculas sobre a superfície do eletrodo desempenha um papel importante na obtenção da sensibilidade, seletividade e estabilidade do biossensor.

Estas características são avaliadas por meio de controle químico e cobertura de superfície, garantindo assim a capacidade de reação, afinidade e estabilidade para a biomolécula imobilizada²⁹⁴. Biossensores baseados na hibridação com DNA, comumente chamados de genossensores, apresentam potencial para aplicações na indústria farmacêutica, análises forenses, diagnóstico de doenças e outras²⁹⁵. Outro potencial de aplicação está na imobilização de antígenos e sua reação para formação de complexos estáveis com o respectivo anticorpo específico, denominando os chamados imunossensores.

Após análise dos resultados obtidos para a eletropolimerização dos filmes poliméricos de poli(4-HBA), foi utilizado com base nos dados e discussões realizadas neste trabalho, a utilização de filmes de poli(4-HBA) eletropolimerizado em meio ácido utilizando a detecção amperométrica para avaliação da superfície funcionalizada. Assim, a aplicação destas plataformas na imobilização de oligonucleotídeos, visando a detecção do evento de hibridização, como também a imobilização de um antígeno da leishmaniose visceral (rK39), para detecção do anticorpo IgG específico da doença, foi investigada.

4.5.1 – Aplicação das plataformas de poli(4-HBA) em genossensores

Os genossensores podem utilizar de interações covalentes de oligonucleotídeos com as cadeias poliméricas, minimizando efeitos de lixiviação das sondas, sendo que as mudanças decorrentes da hibridação podem ser detectadas, utilizando-se métodos eletroquímicos de detecção direta das bases nitrogenadas componentes do DNA ou via indireta, utilizando-se mediadores ou intercaladores de duplas fitas do DNA. Este sistema é atrativo, visto que simplifica a construção do sensor e não requer elaboradas sínteses para funcionalização de PC²⁹⁶.

Investigações foram conduzidas, utilizando-se os filmes poliméricos derivados do ácido 4-hidroxibenzóico (4-HBA) como plataforma para imobilização de oligonucleotídeo (poliGA), bem como a detecção da hibridação com o alvo

complementar (poliGA:poliCT). Os resultados experimentais, para verificação da viabilidade do processo de imobilização e hibridização foram obtidos por meio de voltametria de pulso diferencial, na detecção direta como também a utilização de Am e BE como agentes intercaladores.

4.5.1.1 – Detecção direta de oligonucleotídeos

A detecção direta dos processos de hibridização, para a imobilização de oligonucleotídeos é baseada nos sítios de oxidação das bases presentes ao longo do oligonucleotídeo utilizado. É bem conhecido que dentre as bases do DNA, a guanina é utilizada como marcador por apresentar o menor potencial de oxidação, entre as demais bases. Os sítios de oxidação para as bases nitrogenadas são mostrados na Figura 68.

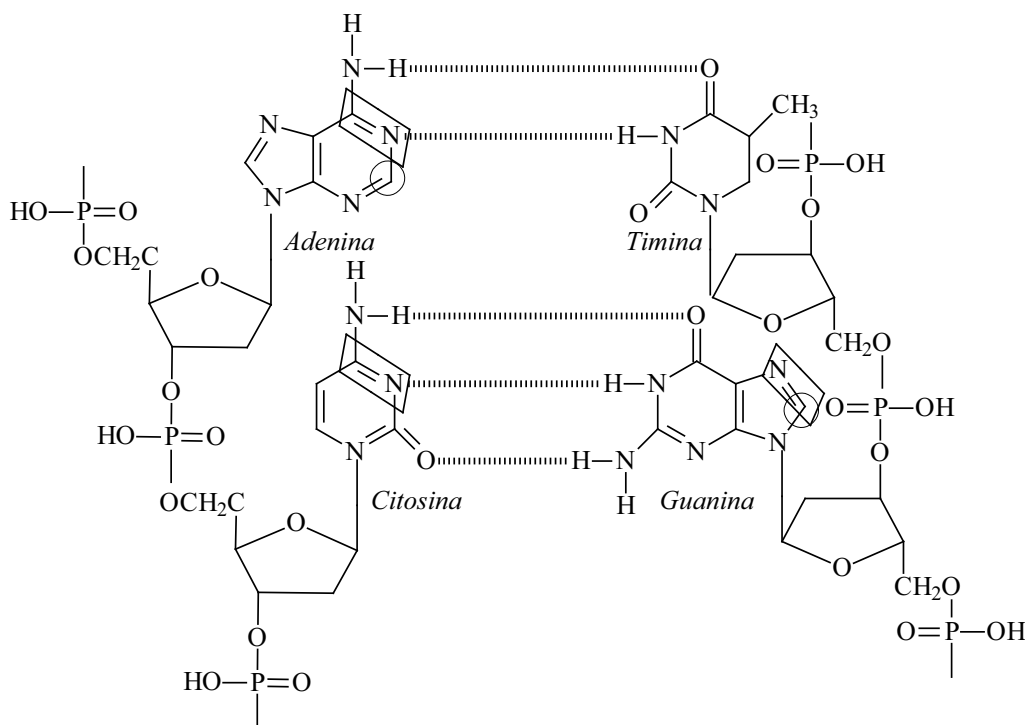


Figura 68: Pareamento Watson-Crick de bases e os respectivos sítios de oxidação e redução do DNA^{297,298}. (O) sítios de oxidação para A e G e (X) sítios de redução para A, C e G.

La-Scalea e colaboradores²⁹⁵ apresentaram uma visão geral da evolução do estudo e determinação eletroquímica de ácidos nucleicos, utilizando-se eletrodos de

mercúrio, além dos recentes avanços no desenvolvimento de eletrodos modificados com DNA. Além disso, o mecanismo de oxidação para cada base nitrogenada é descrita na literatura²⁹⁶.

O oligonucleotídeo (poliGA) imobilizado na superfície dos eletrodos modificados com o polímero foram analisados de acordo com a resposta eletroquímica das bases guanina e adenina.

A Figura 69 mostra que as bases purínicas são oxidadas na superfície do eletrodo modificado, apresentando atividade eletroquímica quando presentes na superfície do eletrodo modificado.

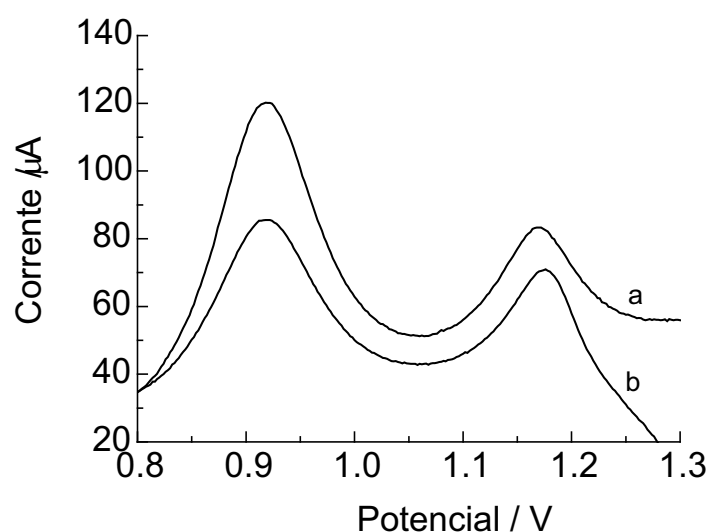


Figura 69: VPD obtidos em solução de tampão fosfato $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$ para o EG/4-HBA contendo: (a) poli GA e o híbrido (b) poliGA:CT;

Após a interação com alvo complementar poliCT, não foi observado deslocamento relevante dos potenciais de oxidação das bases purínicas analisadas, mas ocorreu uma diminuição nos valores de corrente de oxidação destas bases, sendo esta variação mais significativa para a oxidação da guanosina monofosfato. A guanina, conforme já mencionado é um biomarcador usual para biossensores. Esta diminuição de corrente de oxidação sugere que os sítios ativos destas bases estão mais impedidos devido à interações específicas com as bases pirimidínicas complementares, indicando a hibridação entre a sonda e o alvo complementar, além disso a dsDNA apresenta maior rigidiz estrutural o que dificulta a oxidação das bases purinas.

4.5.1.1.1 - Efeito do tempo de hibridização

A eficiência na hibridização da sonda dos oligonucleotídeos com o alvo complementar é dependente do tempo de hibridização. A Figura 70 mostra os valores da corrente de pico anódica monitorados para a guanina em função do tempo de incubação com o alvo complementar.

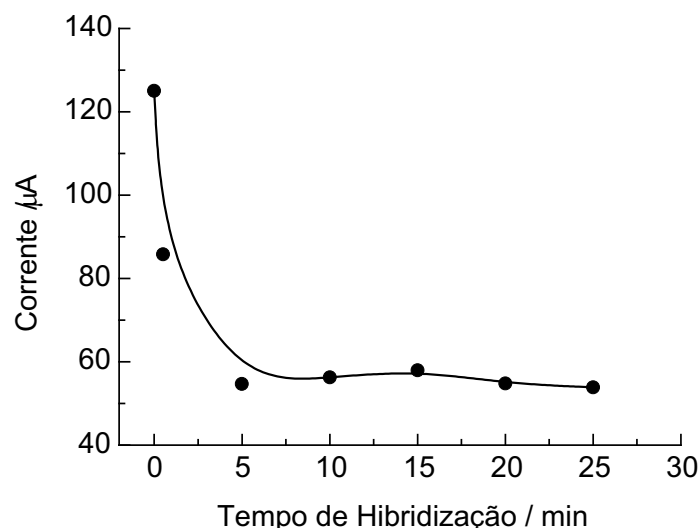


Figura 70: Corrente de pico anódica de oxidação da guanosina monofosfato em função do tempo de hibridização no EG/4-HBA contendo poliGA. $T_{\text{Incubação}} = 42\text{ }^{\circ}\text{C}$, $v = 10\text{ mV s}^{-1}$; Amplitude: 50 mV; Pulso: 50 ms.

Com o aumento no tempo de incubação, os valores de $I_{p,a}$ diminuem devido a interação das bases contidas na sonda com o alvo complementar na superfície do eletrodo, o que faz com que os sítios de oxidação das bases estejam protegidos pelas interações de hidrogênio, conforme já discutido no item 4.5.1.1. Contudo, a diferença de correntes de oxidação entre ssDNA e dsDNA não decorre apenas do fato dos sítios de oxidação do dsDNA estarem protegidos por participarem das ligações de hidrogênio da dupla hélice, mas também por sua menor flexibilidade e maior dificuldade de adsorção na superfície de eletrodos²⁹⁷.

A reação de hibridização aparentemente se completa após 5 minutos, quando não é observado mais variação nos valores de $I_{p,a}$. Foi determinado, desta forma um tempo em cerca de 3 vezes mais que este, sendo desta forma estipulado 15 minutos

como tempo suficiente para a interação da sonda com o alvo complementar sobre os eletrodos modificados de grafite modificados com filmes poliméricos de poli(4-HBA).

4.5.1.2 – Detecção de oligonucleotídeos utilizando-se o Azul de Metileno

A fabricação de superfícies de DNA as quais sejam reprodutíveis, estáveis e seletivas a seqüências complementares do DNA é um ponto crucial no desenvolvimento da biotecnologia emergente dos chamados chips de DNA bem como os dispositivos simples para detecção de alvos complementares¹⁹⁷.

Para essas aplicações, transdução eletroquímica da superfície de hibridização apresenta uma perspectiva atrativa em termos de rapidez na análise, instrumentação simples, custo e possibilidade de miniaturização²⁹⁹. Vários indicadores têm sido envolvidos nos biossensores de hibridização de DNA, dentre eles podemos destacar o azul de metileno.

O comportamento eletroquímico do azul de metileno foi previamente investigado sobre EG. Os VC são mostrados na Figura 71.

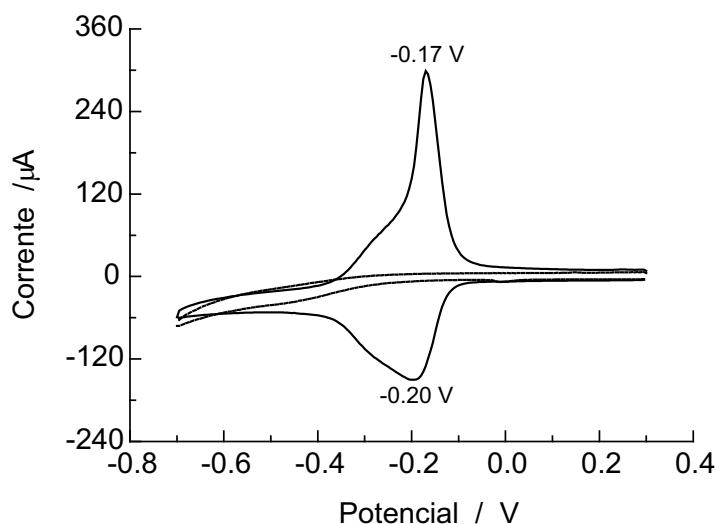


Figura 71: VC de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ de AM obtido com EG. Eletrólito: Tampão fosfato $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,40; $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. Onde: (---) VC do eletrólito suporte.

Os picos observados em -0,17 e -0,20 V são atribuídos ao par redox do azul de metileno/azul de leucometileno^u em um processo de transferência eletrônica que envolve dois elétrons, conforme já descrito por Tani e colaboradores^{127,208,300,301}. As estruturas envolvidas na redução do azul de metileno são mostradas na Figura 72.

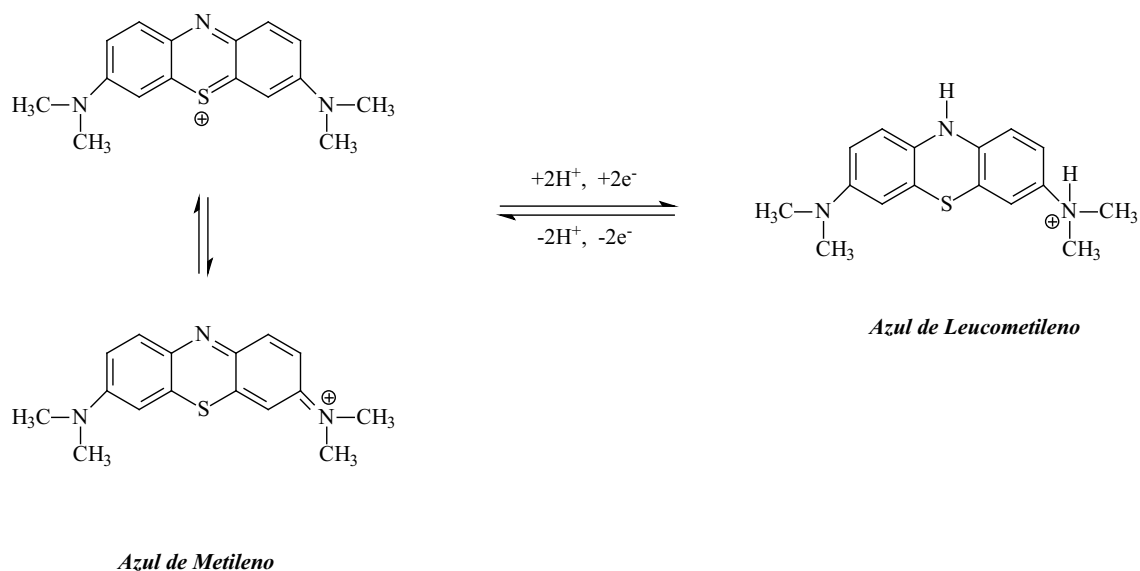


Figura 72: Estruturas químicas envolvidas na redução do azul de metileno^{127,208}.

No procedimento de utilização de intercaladores para detecção e discriminação nos eventos de hibridização, o eletrodo contendo a sonda e o híbrido é geralmente colocado em contato com o intercalador, promovendo a adsorção do mesmo, conforme ilustrado na Figura 13.

As mudanças nas correntes de pico para o AM foram obtidas para cada etapa de preparação do sensor. Deste modo, a superfície do sensor foi colocada em contato com solução do AM por 5 minutos, no qual ocorre interação do AM com as bases de guanina na sonda ou intercala entre pares de guanina-citosina na dupla fita, após hibridização. O tempo de 5 minutos foi baseado em estudos reportados por Meric e Henry^{193,196}. A superfície após adsorção é lavada rapidamente, por cerca de 6 segundos, para eliminar qualquer excesso de AM. As medidas de VPD foram realizadas em vez de VC para melhorar a sensibilidade do processo de detecção. Assim os VPD foram obtidos em

^u O termo leuco, significa “branco”, pois quando o azul de metileno se reduz a leucometileno, tornando-se incolor.

solução de tampão fosfato livre de AM, a fim de garantir que o sinal medido representa apenas a superfície do complexo DNA-AM.

Contudo antes disso, a adsorção do AM sobre os EG e EG/4-HBA foi investigada. Os VPD mostrados na Figura 73 foram obtidos para os eletrodos EG e EG/4-HBA após 5 minutos em contato com 18 μL de AM $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

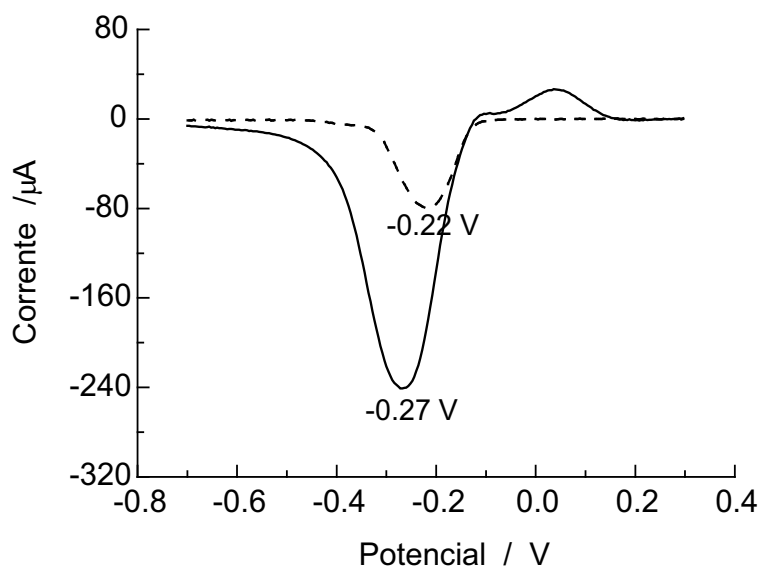


Figura 73: VPD obtidos para: (---) EG e (—) EG/4-HBA contendo 18 μL de AM $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Eletrólito: Tampão fosfato 0,10 mol dm^{-3} , pH 7,40. Amplitude: 25 mV; Período Pulso: 0,20 s; Altura Pulso: 0,06 s; $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Tempo de adsorção_{AM} = 5 minutos.

Observa-se que nas mesmas condições de imobilização o AM apresenta uma grande afinidade pela superfície do EG/4-HBA. O aumento de 300% no valor de corrente observado pode estar relacionado a característica aniônica do filme de poli(4-HBA), conforme discutido no item 4.1.5. Isso levaria a atração eletrostática entre o polímero e o AM, ficando este adsorvido na superfície do EG/4-HBA e resultando no aumento nos valores de I_{pa} . Para o eletrodo de grafite não-modificado Wang e colaboradores³⁰², já demonstraram que o aumento no sinal do AM, quando realizado ciclos sucessivos é atribuído a adsorção dos compostos fenotiazínicos sobre a superfície dos eletrodos de grafite, deste modo, trabalhou-se sempre com o primeiro VPD. Outro fator é o deslocamento em cerca de 50 mV, para potenciais mais anódicos, o que corrobora com a atuação do poli(4-HBA) no processo de transferência eletrônica.

Deste modo, a detecção de hibridização foi acompanhada pela redução do AM, onde a eletroatividade desse composto levou a discriminação da forma híbrida da sonda. A diminuição no acesso às bases guanina, para interação com AM, após a hibridização da sonda de poliGA com o alvo complementar (poliCT) promove um decréscimo nos sinais voltamétricos de redução do AM. Este decréscimo na corrente do AM após hibridização é mostrado claramente pelo VPD da Figura 74.

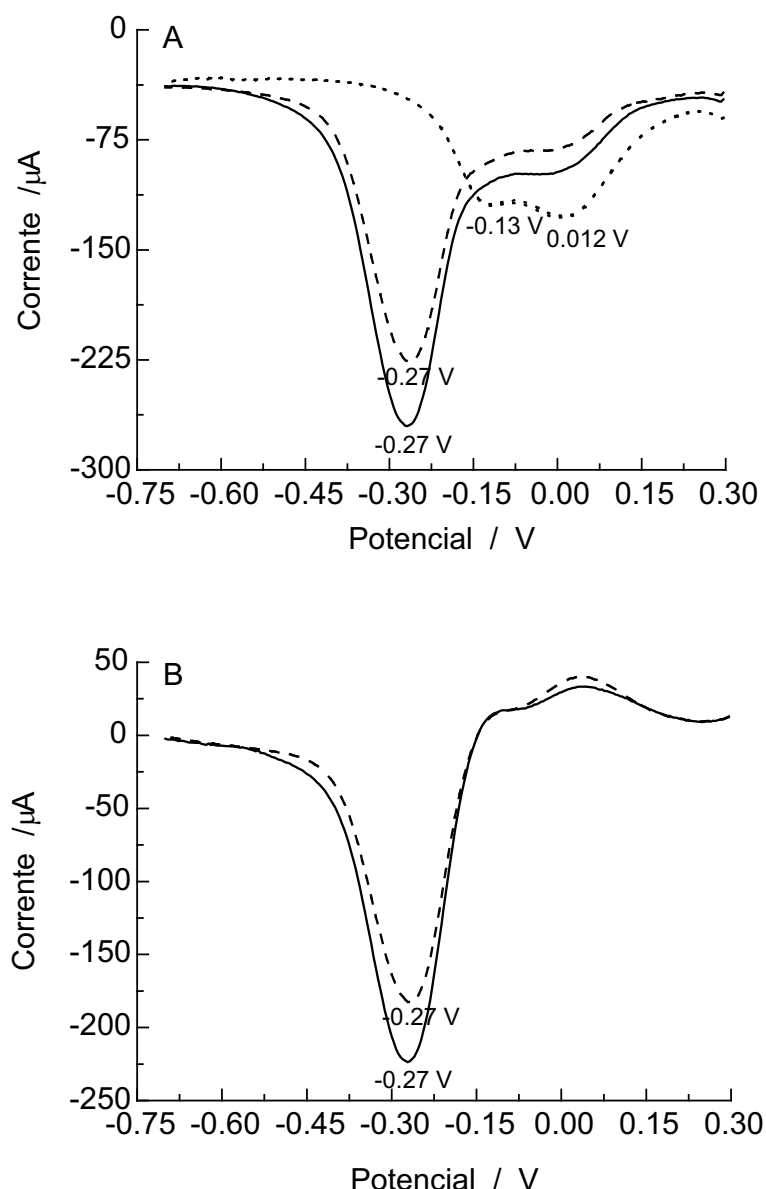


Figura 74: VPD obtidos para: (—) ssDNA e (---) dsDNA contendo 18 μL de AM $5,0 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} . Eletrólito: Tampão fosfato 0,10 mol dm^{-3} , pH 7,40. Amplitude: 25 mV; Período Pulso: 0,20 s; Altura Pulso: 0,06 s; $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Tempo de adsorção_{AM} = 5 minutos. (····) VPD do EG/4-HBA no eletrólito suporte.

Na Figura 74A, é mostrado que o EG/4-HBA apresenta atividade eletroquímica no eletrólito suporte livre de AM, isto estando relacionado à eletroquímica do material adsorvido. Esta atividade é observada nos potenciais de -0,13 e +0,012 V. Porém um pico voltamétrico bem definido é observado para a redução do AM adsorvido sobre os eletrodos de grafite modificado com poli(4-HBA), contendo a sonda e o híbrido em aproximadamente -0,26 V. Assim, apesar do processo eletroquímico observado para o poli(4-HBA), este não interfere na redução do AM. A Figura 74B, mostra a subtração da linha base para os VPD dos eletrodos ssDNA e dsDNA contendo o AM.

A intensidade de I_{pc} é atribuída à interação do AM com os resíduos de guanina do ssDNA. A magnitude do pico desta forma reflete na extensão da interação do AM com o ssDNA e dsDNA. Após exposição da interface com o alvo, o qual contém a complementação da sonda, uma diminuição na corrente em cerca de 20% é obtida. Esta diminuição na corrente reflete em grande diferença na afinidade do AM aos pares de bases da guanina presentes na sonda, causada pela formação do híbrido que diminui o acesso de intercalação as bases guanina. Segundo Meric¹⁹⁶, esta diminuição é atribuída a inibição pelo efeito estérico dos grupos redutíveis do AM intercalados entre a dupla hélice do DNA.

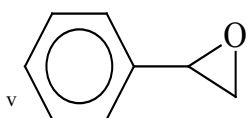
Kara e colaboradores¹⁹⁴, estudaram a influencia da força iônica nos efeitos de intercalação e atração eletrostática do AM a ssDNA e dsDNA. Eles demonstraram que em baixa força iônica, a interação entre dsDNA e AM é eletrostática, de modo que a natureza da intercalação é mudada, devido ao AM ser conhecido como intercalador. A justificativa se refere a assumir que as cargas positivas do AM são eletrostaticamente atraídas pelas cargas negativas dos grupos fosfato no esqueleto do DNA. Sobre condições de baixa força iônica, este efeito eletrostático sobrepõe o efeito de intercalação. Os autores demonstraram que em 20 mmol dm⁻³ de NaCl, tem-se a força iônica ideal para somente observar efeitos de intercalação sobre dsDNA. Enquanto que para ssDNA nesta força iônica, é observado somente a interação do AM com as bases guanina.

O BSA é uma proteína inerte que pode ser utilizada durante o procedimento de imobilização, que previne adsorções não específicas sobre a superfície do sensor. Apesar deste procedimento não ter sido utilizado, o sensor mostrou-se eficiente para detecção do evento de hibridização e mostra-se promissor para incorporação de fragmentos de DNA que sejam específicos.

Vários artigos descritos na literatura corroboram com o resultado obtido, e dentre estes podemos destacar os recentes avanços na utilização do azul de metileno por Zhang e Hu¹⁹⁹, que demonstraram o efeito de intercalação do AM à dupla fita do DNA (dsDNA). Neste trabalho, os autores estudaram a construção e utilização de um sensor para detecção de danos naturais à dsDNA sobre filmes de PPS/(PDDA/dsDNA), onde PPS é o poliestireno sulfonado e PDDA corresponde ao polidialildimetilamônio. O AM foi intercalado sobre estes filmes como sonda eletroativa. A principal interação do AM com a dsDNA é a intercalação aos pares de base do DNA. A indução dos danos, foi promovida pelo agente genotóxico, oxido de estireno (SO)^v, com utilização da VC para detecção do AM. A formação dos adutos de SO com guaninas e adeninas não influenciam substancialmente na conformação do dsDNA, contudo irão dificultar e/ou bloquear a intercalação do AM, resultando na menor quantidade de carga de MB nos filmes. O resultado é a diminuição dos picos redox do AM adsorvidos para o dsDNA é danificado. O sensor, desta forma, promove uma abordagem sensível para detectar uma lesão química ao DNA, o qual combina uma sonda eletroativa que interage especificamente com dsDNA.

Ozkan e colaboradores¹⁹⁷, mostraram os fortes efeitos de interação do AM com as bases guanina para sondas não hibridizadas. Neste trabalho, os autores investigaram um biossensor para hibridização de sondas de ácidos nucléicos (AN). Monocamadas automontadas de enxofre foram depositadas sobre eletrodos de ouro, formando um filme ativo com AN. As mudanças nas correntes de pico do AM, utilizado como indicador eletroativo foi monitorado após a hibridização da sonda com o alvo complementar. Discriminações efetivas em pontos de mutação da seqüência de DNA puderam ser avaliadas, o que garante um alto desempenho do sensor utilizado.

Henry e colaboradores¹⁹³, exploraram a utilização do AM como indicador eletroquímico de hibridização de produtos de PCR, para genes sintéticos do câncer de mama. Os autores avaliaram a interação do indicador com as bases guanina livres com conseqüente redução do AM. As medidas foram otimizadas em função da concentração do AM, tempo de hibridização e regeneração. Foi obtido uma faixa de trabalho de 6-50 nmol dm⁻³ com o alvo complementar tendo um LD de 17 mol dm⁻³. As medidas foram rápidas, necessitando de um pequeno tempo de incubação com o azul de metileno.



Meric e colaboradores¹⁹⁶, desenvolveram um biossensor eletroquímico de DNA, baseado pela imobilização de oligonucleotídeos, sobre eletrodos de pasta de carbono utilizando AM como indicador, para detecção de hibridização de produtos de PCR amplificados de DNA extraídos de sangue humano para detecção de seqüências de DNA para os vírus da hepatite B e TTV^w. Como resultados, foi observado queda no sinal do AM, comparando a sua interação com dsDNA e ssDNA. Desta forma, esta diferença no sinal foi utilizada para detecção de seqüência de DNA de doenças infecciosas de amostras reais. Os autores avaliaram o biossensor em comparação a técnica de eletroforese, obtendo-se 90% de confiabilidade.

Erdem e colaboradores¹⁸⁸, utilizaram o AM para detecção de pequenos segmentos de DNA para o vírus da Hepatite B, mostrando um método simples, baixo custo e com rápida resposta de detecção. Foi possível a discriminação dos eventos de hibridização pela interação do AM com as bases guanina. Os autores utilizaram 21 pares de base e demonstraram que as bases guanina não hibridizadas aumenta o sinal voltamétrico de redução do AM pelas interações. Segundo os mesmos autores foi o primeiro trabalho descrito na literatura utilizando o AM para esta finalidade.

4.5.1.3 – Detecção de oligonucleotídeos utilizando-se o brometo de etídio

Neste trabalho também foi investigada a detecção voltametria de oligonucleotídeos, utilizando EB como intercalador eletroativo. O voltamograma cíclico do EB (Figura 75), obtido para o EG, em tampão fosfato, mostra uma onda anódica irreversível em +0,62 V.

Pode-se observar pela Figura 76, que o mesmo processo eletroquímico é observado, por VPD para os EG e EG/4-HBA quando em contato por 5 minutos com 18 µL de BE $5,0 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³. É observado um aumento nos valores de I_{pa} para o EG/4-HBA, isto sugere que há interação entre o brometo de etídio e o poli(4-HBA). Esta interação é principalmente eletrostática, devido ao aumento observado nos valores de corrente. Um deslocamento 28 mV também pode ser observado, resultando no deslocamento para potenciais menos catódicos.

^w TTV é um vírus descoberto em 1997 no Japão a partir de um paciente portador de hepatite pós-transfusional de origem desconhecida.

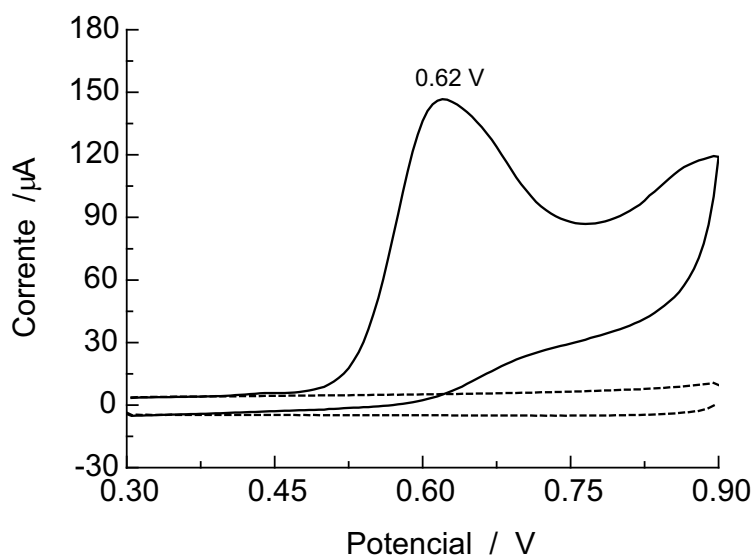


Figura 75: VC de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ de BE sobre eletrodo de grafite. Eletrólito: Tampão fosfato $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,40; $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$. Linha pontilhada representa VC do eletrólito suporte.

Um pico de oxidação irreversível em +0,62 V no voltamograma ciclo do BE foi observado sobre o eletrodo de grafite (Figura 75). Contudo foi encontrado um aumento na sensibilidade das respostas de corrente utilizando-se voltametria de pulso diferencial nas mesmas condições utilizando-se o BE adsorvido sobre o eletrodo durante 5 minutos.

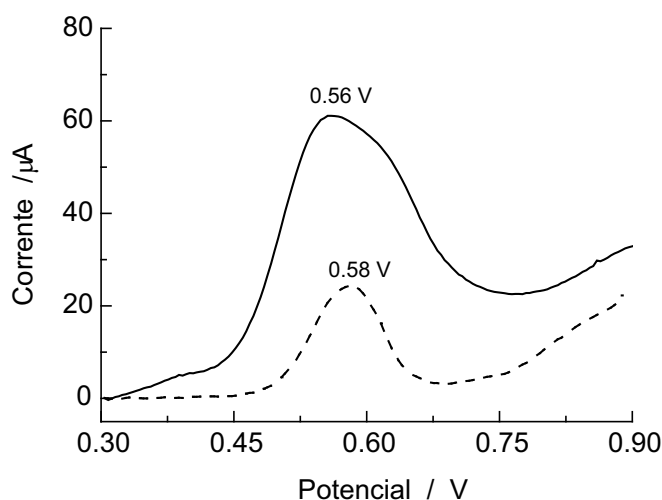


Figura 76: VPD obtidos para: (---) EG e (—) EG/4-HBA; contendo BE adsorvido $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Eletrólito: Tampão fosfato $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,40. Amplitude: 25 mV; Período Pulso: 0,20 s; Altura Pulso: 0,06 s; $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Tempo de adsorção_{BE} = 5 minutos.

A VPD foi utilizada neste trabalho devido a sua excelente sensibilidade. Os parâmetros eletroquímicos da VPD para a detecção do BE sobre os eletrodos de grafite foram otimizados sendo então aplicados ao eletrodo modificado. Considerando-se a seletividade e sensibilidade, a varredura foi realizada de +0,30 a +0,90 V, 20 mV s⁻¹, 25 mV de amplitude de pulso e 60 ms de altura do pulso, sendo utilizados para detecção do BE quando em contato com ssDNA e dsDNA, sobre eletrodos de grafite modificados com poli(4-HBA). Estes parâmetros são idênticos aos utilizados nos trabalhos de Qi e colaboradores²¹⁸, objetivando a mesma detecção.

O BE foi intercalado sobre ssDNA e dsDNA para se observar a intercalação do BE ao sistema dsDNA/BE no EG/4-HBA. A detecção do alvo complementar foi realizada pela medida da corrente de pico anódica do BE. Nenhum processo eletroquímico foi observado para o EG/4-HBA na faixa de potencial de +0,30 a +0,90 V. Os VPD para o ssDNA e dsDNA após contato com o intercalador é mostrado na Figura 77.

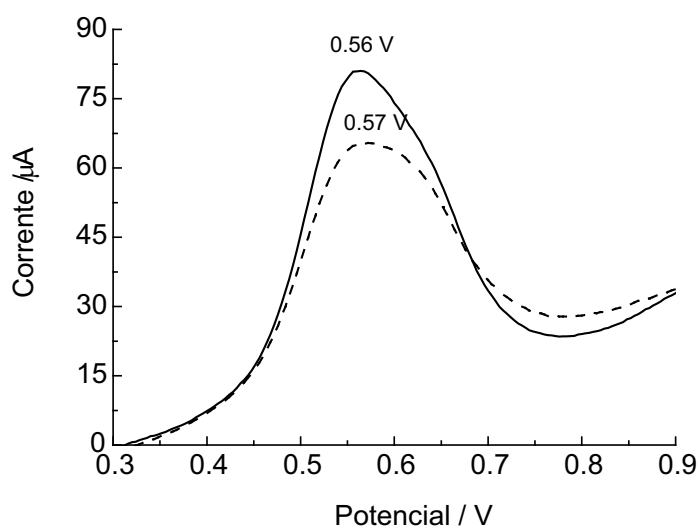


Figura 77: VPD para o BE adsorvido sobre os EG/4-HBA contendo (---) ssDNA e (—) dsDNA. Eletrólito: tampão fosfato 0,10 mol dm⁻³, pH 7,40; amplitude: 25 mV; período do pulso: 0,2 s, pulso: 0,06 s.

Quando o experimento de controle, ssDNA/EG/4-HBA foi colocado em contato com o BE e após 5 minutos, lavado em tampão fosfato o valor da $I_{p,a}$ foi encontrado em 60 µA, o qual é bastante similar ao encontrado para a adsorção do BE somente sobre o EG/4-HBA(ver Figura76).

Por outro lado, quando o poliGA (ssDNA) foi colocado em contato com $0,183 \text{ mol dm}^{-3}$ do alvo complementar (poliCT), e o sistema foi incubado por 15 min a 42°C , ocorre a formação do híbrido. Após este período o eletrodo foi lavado e depois $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ de BE foi colocado sobre o eletrodo por 5 min e também lavado. A corrente resultante da adsorção do BE foi de 80 μA , cerca de 133% maior que a do ssDNA/EG/4-HBA. Isto é considerável porque o valor da $I_{p,a}$ é derivada das ligações do EB ao dsDNA na superfície do eletrodo. Visando garantir a intercalação do cátion etídio à dsDNA, o eletrodo foi lavado com um volume adicional de 15 mL da solução tampão. Depois da lavagem, nenhuma diminuição considerável foi observada no valor de $I_{p,a}$ para os VPD contendo o dsDNA/EG/4-HBA.

4.5.2 – Aplicação das plataformas de poli(4-HBA) em imunossensores impedimétricos

Um segundo mecanismo de aplicação das plataformas de poli(4-HBA), foi a utilização das mesmas na construção de um imunossensor para detecção de leishmaniose visceral.

Neste trabalho, o antígeno rK39, foi imobilizado sobre a superfície dos eletrodos modificados com poli(4-HBA) e realizada a detecção com o anticorpo IgG. Foram feitos testes com os anticorpos denominados IgG+ (positivo para leishmaniose) e IgG- (negativo para leishmaniose) sendo a detecção realizada por EIE.

Através das medidas de resistência a transferência de carga (R_{tc}) utilizando-se o par redox ferro/ferricianeto de potássio como sonda de detecção, demonstrou-se que o sensor apresenta boa sensibilidade na detecção da interação do anticorpo com o antígeno da LV.

A Figura 78, mostra os espectros de impedância eletroquímica, denominados Nyquist e Bode, dos imunossensores, contendo o antígeno rK39 e sua interação com anticorpos positivos e negativos para LV, imobilizados sobre os eletrodos contendo poli(4-HBA). Os espectros foram obtidos em potencial de + 0,25 V, sendo a região faradaica do par redox, conforme já apresentado no item 4.1.5.

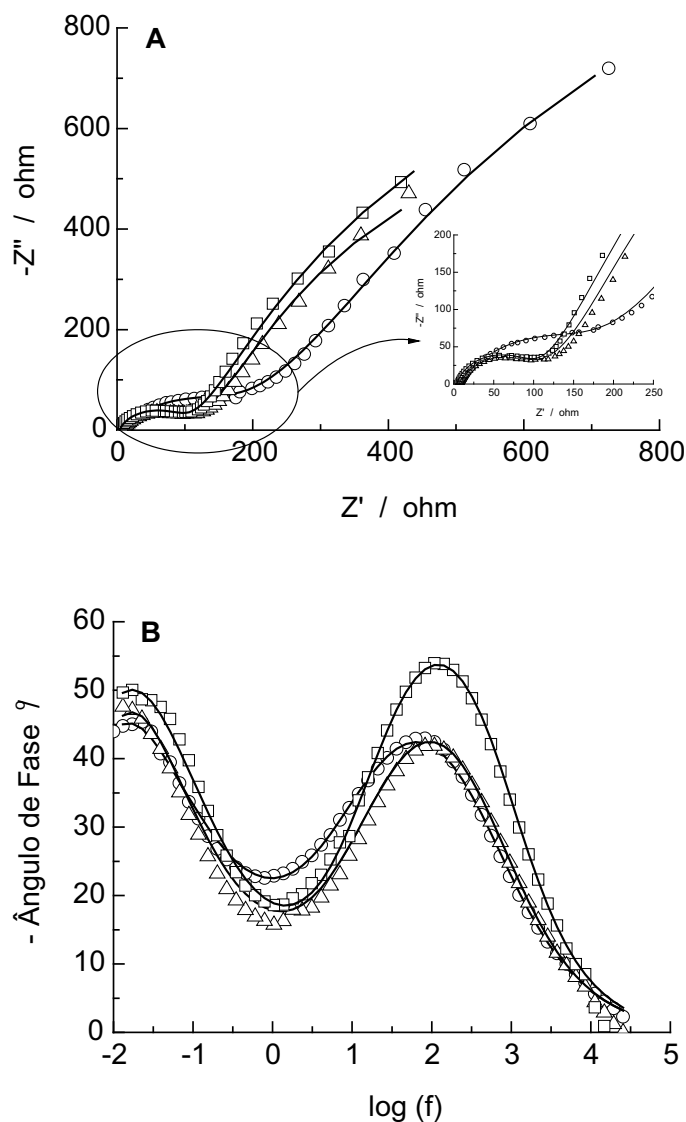


Figura 78: Espectros de impedância eletroquímica, apresentados como diagramas de Nyquist (A) e Bode (B), obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio $5,00 \text{ mmol dm}^{-3}$ contendo KCl $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$, para o EG/4-HBA contendo: () rk39; e na presença dos anticorpos (O) IgG+ e (Δ) IgG-. E_{pa} : $+0,25 \text{ V}$; Amplitude: 5 mV ; Faixa de frequência: 10^6 a 10^{-2} Hz . As linhas sólidas representam o ajuste dos dados experimentais a um circuito equivalente.

Conforme observado, para os três sistemas investigados é evidente o aparecimento de dois semicírculos bem definidos, um em regiões de altas frequências relacionado ao transporte cinético do par redox e outro em regiões de baixa frequência, relacionado ao processo resistivo do poli(4-HBA), conforme discutido no item 4.2.4. Os dados foram simulados utilizando-se o mesmo circuito apresentado na Figura 44,

representado por $R_S[(R_{tc,1}W)Q_{dc,1}](R_{tc,2}Q_{dc,2})$. Contudo, o circuito deveria apresentar uma constante de tempo adicional devido a mudança superficial pela imobilização do material biológico, por tal suposição tem-se a necessidade de utilização de um circuito mais complexo. Dentre os parâmetros associados ao circuito, a consideração de efeitos de difusão finita (reflexiva ou transmissiva) pelo transporte de massa no interior do filme polimérico, deve ser levada em consideração. Desde modo, optamos pelo mesmo circuito da Figura 44, por apresentar maior simplicidade e adequação aos dados experimentais, o qual não descarta em trabalhos futuros a utilização e investigação de outros circuitos que se adaptam melhor ao sistema analisado.

O circuito utilizado apresentou valor de χ^2 , na ordem de 10^{-2} , mostrando-se adequado para apoiar e caracterizar os resultados experimentais. Os parâmetros obtidos com o circuito proposto estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Parâmetros obtidos, a partir dos resultados de simulação por EIE para o imunossensor na presença do alvo positivo e negativo para LV, utilizando KCl $0,10 \text{ mol dm}^{-3}$.

	rK39	IgG+	IgG-
$R_s / \Omega \text{ cm}^2$	3,64	9,93	7,25
$Q_{dc} / \text{mF cm}^{-2}$	0,24	0,35	0,33
n_1	0,81	0,70	0,73
$R_{tc} / \Omega \text{ cm}^2$	95,80	175,40	103,90
$W_1 / \Omega \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1/2}$	0,014	0,0062	0,013
$Q_{dc2} / \text{mF cm}^{-2}$	25,43	31,47	39,56
n_2	0,94	1,00	1,00
$R_{tc2} / \Omega \text{ cm}^2$	1070	798	616
$\chi^2 / (x 10^{-2})$	7,10	1,84	4,64

Pelos dados da Tabela 8, observa-se que as resistências ôhmicas total a solução R_s , é cerca de 3x superior na presença do anticorpo positivo e 2x maior do anticorpo negativo, quando comparado ao antígeno rK39. Isto indica que há aumento na resistência do sistema devido a interação antígeno-anticorpo, sobre a superfície do eletrodo. O aumento na resistência para o IgG- pode ser explicado por interações não específicas com a superfície funcionalizada.

O valor de $R_{tc,1}$ para o eletrodo contendo apenas o antígeno é de 95,80 Ω . Contudo observa-se um aumento significativo na presença no IgG+ para 175,40 Ω (cerca de 185%). Na presença do anticorpo negativo é observado um ligeiro aumento para 103,90 Ω (+108,5 %). Este aumento de 185% no valor de resistência a transferência de carga, para o IgG+ está relacionado a interação antígeno-anticorpo, que bloqueia a superfície do eletrodo com conseqüente repulsão do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$. O valor de $R_{tc,1}$ para o IgG- é muito próximo ao do rK39, isto indica que não há interação pelo sistema. Praticamente em toda a literatura encontrada para os imunossensores impedimétricos a media é realiza em função deste parâmetro R_{tc} . Devido a isto que os valores de $R_{tc,1}$ representam o principal parâmetro para avaliar a seletividade do imunossensor.

A capacitância da dupla camada praticamente equivalente na presença dos anticorpos IgG+ e IgG-. Quando os valores de $Q_{dc,1}$ são comparados ao eletrodo contendo somente o antígeno é observado um aumento, o que indica a presença de maior grupos redox sobre a superfície do eletrodo.

Um fato interessante utilizado para avaliar a especificidade do imunossensor, foi a variação da força iônica do meio. Assim, o aumento na concentração do eletrólito suporte em cerca de 10x mostrou resultados completamente antagônicos aos discutidos anteriormente. Os espectros de impedância eletroquímica, obtidos nas mesmas condições que o da Figura 78, alterando somente a concentração do eletrólito suporte, KCl para 1,00 mol dm⁻³ é lustrado na Figura 79.

O mesmo perfil para os diagramas de Nyquist e Bode apresentados na Figura 78 é mostrado na Figura 79, os quais se caracterizam por dois semicírculos, já discutidos. O circuito equivalente utilizado foi o mesmo da Figura 44, ou seja não se alterou o circuito equivalente. Valores de χ^2 na ordem de 10⁻² demonstram a boa correlação dos dados experimentais com o circuito proposto. Os resultados obtidos com o circuito equivalente, nesta força iônica, estão distribuídos na Tabela 9.

Quando se aumenta a força iônica do meio, o efeito eletrostático do sistema é suprimido, podendo-se avaliar, entretanto os verdadeiros efeitos de “acesso à superfície” do eletrodo pelo par redox.

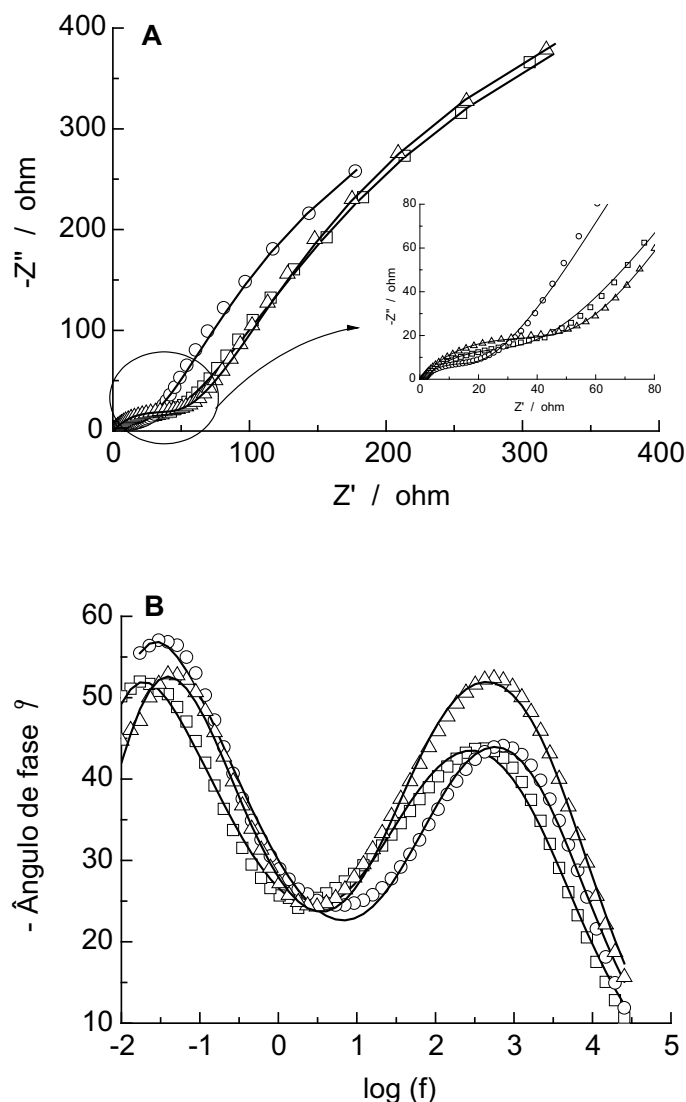


Figura 79: Espectros de impedância eletroquímica, apresentados como diagramas de Nyquist (A) e Bode (B), obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio $5,00 \text{ mmol dm}^{-3}$ contendo KCl $1,00 \text{ mol dm}^{-3}$, para os eletrodos de poli(4-HBA) contendo: () rk39; e na presença dos anticorpos: (O) IgG+ e (Δ) IgG-. E_{pa} : $+0,25 \text{ V}$; Amplitude: 5 mV ; Faixa de frequência: 10^6 a 10^{-2} Hz . As linhas sólidas representam os resultados de simulação.

Os valores de R_s se mostram muito menores quando comparados aos apresentados na Tabela 8. Isto pode ser notado pelo aumento da força iônica do meio, o que faz com que a resistência do sistema diminua. Contudo, quando se compara os três sistemas mostrados na Tabela 9, na presença do IgG+ há uma diminuição na resistência total do sistema, o que indica a formação de um sistema menos resistivo, quando comparado aos sistemas rk39 e rk39/IgG-.

Tabela 9: Parâmetros obtidos, a partir dos resultados de simulação por EIE para o imunossensor na presença do alvo positivo e negativo, para LV, utilizando KCl 1,00 mol dm⁻³.

	rK39	IgG+	IgG-
R_S / Ω cm²	1,26	0,82	0,90
Q_{dl} / mF cm⁻²	1,00	0,86	0,48
n₁	0,66	0,69	0,72
R_{ct} / Ω cm²	37,70	19,11	47,80
W₁ / Ω cm² s^{-1/2}	0,015	0,021	0,012
Q_{dl2} / mF cm⁻²	61,70	50,21	22,88
n₂	1,00	1,00	1,00
R_{ct2} / Ω cm²	450	475	549
χ^2 / (x 10⁻²)	2,95	3,61	1,45

Os valores de $R_{ct,1}$ para o sistema contendo apenas o antígeno é estimado em 37,70 Ω , próximo ao encontrado para o sistema na presença do IgG-, que é de 47,8 Ω (+125%). O valor da resistência à transferência de carga na presença do IgG+ é de 19,11 Ω (-50%). Isto indica que uma maior velocidade de transferência eletrônica do par redox é observada para o sistema contendo a interação antígeno-anticorpo. Neste caso, o acesso a superfície é favorecido pelo sistema. Não há relatos na literatura sobre este tipo de investigação, nem explicações que sejam plausíveis. O que é viável ser sugerido é a diminuição dos efeitos da corrente de migração (eletrostática) e a verdadeira interação do par redox com as biomoléculas imobilizadas.

Goulart e colaboradores¹⁵⁸, apresentaram uma revisão recente sobre a utilização de bio-marcadores para diagnóstico de doenças infectocontagiosas e seu potencial de aplicação em sensores. Dentre as doenças apresentadas, os autores mostraram para a LV a imobilização da rK39 sobre plataformas funcionalizadas com filmes poliméricos derivados do ácido 4-hidroxifenilacético tendo-se obtido resultados semelhantes aos encontrados com os filmes derivados de ácido 4-hidroxibenzóico. Isto demonstra que estas superfícies funcionalizadas apresentam grande aplicabilidade na imobilização das biomoléculas.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

4 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Foi possível realizar a eletropolimerização do ácido 4-hidroxibenzóico sobre eletrodos de grafite. O material adsorvido apresenta atividade eletroquímica reversível e controlada por difusão. Interessantes propriedades de troca catiônica e aniônica foram demonstradas com os pares redox $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2$ e $\text{K}_4(\text{FeCN})_6/\text{K}_3(\text{FeCN})_6$ para o polímero formado.

A eletropolimerização conduzida em diferentes valores de pH mostrou a formação de filmes com comportamentos eletroquímicos distintos. A eletropolimerização foi realizada em meio ácido, neutro e básico. É possível observar que, quando eletropolimerizado em meio ácido e neutro, o poli(4-HBA) apresenta atividade eletroquímica com dois pares redox eletroativos, não sendo observado nenhuma atividade eletroquímica quando o filme foi obtido em meio básico.

Medidas de microbalança eletroquímica de cristal de quartzo corroboram com este resultado, apresentando maiores valores de deposição de massa em meio ácido. As medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica mostraram que, a medida que se aumenta o valor de pH, o valor da resistência a transferência de carga é aumentado, o que gera filmes com maiores resistências ôhmicas a processos de transferência eletrônica.

A medida de estabilidade eletroquímica do poli(4-HBA), quando submetido a ciclos consecutivos de potencial, mostrou taxas de degradação até cerca de 18 %, o que indica boa estabilidade deste material sobre os eletrodos de grafite.

Procedimentos de caracterização do polímero puderam ser conduzidos, quando este foi eletropolimerizado sobre eletrodos de cilindro de grafite, o que garantiu a extração em acetonitrila e obtenção do polímero em seu estado sólido, para as análises químicas. Os espectros de FTIR do poli(4-HBA) quando comparado ao monômero, apresentou comportamento completamente distinto, sugerindo a modificação na estrutura química do monômero. A região entre 4000 a 2000 cm^{-1} apresenta um conjunto de bandas intensas na região de estiramento da ligação O–H. A presença destas bandas associadas ao aparecimento de bandas intensas entre 1200 a 1000 cm^{-1} , particularmente as bandas em 1143 e 1083 cm^{-1} sugere que o polímero produzido possui múltiplas ligações O–H e C–O respectivamente.

Medidas de fluorescência mostraram que o poli(4-HBA) apresenta atividade fotoquímica, sendo observado deslocamento nas bandas de absorção e emissão do polímero quando comparado ao monômero, devido ao aumento na extensão de conjugação da cadeia polimérica. Resultados das análises térmicas mostraram que a estrutura do poli(4-HBA) é heterogênea e complexa. A perda de massa é gradual, ao longo de uma larga faixa de temperatura, sendo a estabilização obtida com 30% do resíduo a 500 °C, ao contrário do monômero que sofre processo de decomposição com total perda de massa a aproximadamente 200 °C. Além disso, esta perda de massa gradual para o polímero sugere que rearranjos na estrutura dos oligômeros podem estar ocorrendo, levando a processos de polimerização adicional quando submetidos a altas temperaturas.

O mecanismo de eletropolimerização foi proposto via ataque nucleofílico, tendo-se a conjugação do monômero entre as posições orto da molécula.

O eletrodo de grafite modificado com poli(4-HBA) foi eficiente para a imobilização de oligonucleotídeo (poliGA), bem como a detecção de hibridação com o oligonucleotídeo complementar (poliCT). Por meio de medidas diretas da oxidação das bases guanosina monofosfato e adenosina monofosfato, componentes do poliGA, foi possível observar um decréscimo nas correntes de pico devido as ligações de hidrogênio, promovidas pelo evento de hibridação com poliCT.

Quando os intercaladores brometo de etídio ou azul de metileno foram utilizados, mostraram-se eficientes no reconhecimento dos processos de hibridização. A ssDNA apresentou melhor afinidade pelo AM enquanto que a resposta eletroquímica do BE é melhor observada na dsDNA.

A imobilização do antígeno rK39, específico da leishmaniose, foi reconhecido pelo anticorpo específico IgG, sendo este reconhecimento monitorado por EIE. Quando formado o complexo Ac-Ag, os valores de R_{tc} aumentam devido ao bloqueio da superfície ao par redox ferro/ferricianeto de potássio.

Como propostas futuras, tem-se a utilização de análises de RMN e CG-MS para confirmação da estrutura proposta para o poli(4HBA); determinação de massa molar; estudos teóricos de otimização; estudos fotoquímicos dentre outros. Além disso, a otimização dos parâmetros dos genossensor e imunossensor proposto podem ser otimizados para garantir melhor performance do mesmo nas medidas de reconhecimento biológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kanatzidis, M.G.; "Polymeric Electrical Conductors". *Chemical and Engineering News*, 3:(1), **1990**, 36-54.
2. Maia, D.J., De Paoli, M.-A., Alves, O.L., Zarbin, A.J.G. and Neves, S.d.; "Síntese de polímeros condutores em matrizes sólidas hospedeiras". *Química Nova*, 23:(2), **2000**, 204-215.
3. MacDiarmid, A.G.; "'Synthetic metals': a novel role for organic polymers". *Current Applied Physics*, 1:(4-5), **2001**, 269-279.
4. Faez, R., Rezende, M.C., Martin, I.M. and De Paoli, M.-A.; "Polímeros condutores intrínsecos e seu potencial em blindagem de radiações eletromagnéticas". *Polímeros*, 10:(3), **2000**, 130-137.
5. Matveeva, E.S.; "Residual water as a factor influencing the electrical properties of polyaniline. The role of hydrogen bonding of the polymer with solvent molecules in the formation of a conductive polymeric network". *Synthetic Metals*, 79:(2), **1996**, 127-139.
6. Shirakawa, H. and Ikeda, S.; "Infrared Spectra of Poly(acetylene)". *Polymer Journal*, 2:(2), **1970**, 231-244.
7. Shirakawa, H. and Ikeda, S.; "Cyclotrimerization of acetylene by the tris(acetylacetonato)titanium(III)-diethylaluminum chloride system". *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*, 12:(5), **1974**, 929-937.
8. Shirakawa, H., Louis, E.J., MacDiarmid, A.G., Chiang, C.K. and Heeger, A.J.; "Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH)_x". *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1:(16), **1977**, 578 - 580.
9. Genies, E.M. and Lapkowski, M.; "Spectroelectrochemical study of polyaniline versus potential in the equilibrium state". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 220:(1), **1987**, 67-82.
10. Lange, U., Roznyatovskaya, N.V. and Mirsky, V.M.; "Conducting polymers in chemical sensors and arrays". *Analytica Chimica Acta*, 614:(1), **2008**, 1-26.
11. Bredas, J.L. and Street, G.B.; "Polarons, bipolarons, and solitons in conducting polymers". *Accounts of Chemical Research*, 18:(10), **1985**, 309-315.
12. Chandrasekhar, P. *Conducting Polymers, Fundamentals and Applications: A Practical Approach*, (Springer, 1999).

13. Wallace, G.G., Spinks, G.M., Kane-Maguire, L.A.P. and Teasdale, P.R. *Conductive Electroactive Polymers: Intelligent Materials Systems*, (CRC Press, 2003).
14. Chiang, C.K., Druy, M.A., Gau, S.C., Heeger, A.J., Louis, E.J., MacDiarmid, A.G., Park, Y.W. and Shirakawa, H.; "Synthesis of highly conducting films of derivatives of polyacetylene, $(CH)_x$ ". *Journal of the American Chemical Society*, 100:(3), **1978**, 1013-1015.
15. MacInnes Jr., D., Druy, M.A., Nigrey, P.J., Nairns, D.P., MacDiarmid, A.G. and Heeger, A.J.; "Organic batteries: reversible n- and p- type electrochemical doping of polyacetylene, $(CH)_x$ ". *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 1:(7), **1981**, 317 - 319.
16. Nigrey, P.J., MacDiarmid, A.G. and Heeger, A.J.; "Electrochemistry of polyacetylene, $(CH)_x$: electrochemical doping of $(CH)_x$ films to the metallic state". *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 1:(14), **1979**, 594 - 595.
17. Skotheim, T.A. *Handbook of Conducting Polymers*, (CRC, 1997).
18. Adhikari, B. and Majumdar, S.; "Polymers in sensor applications". *Progress in Polymer Science*, 29:(7), **2004**, 699-766.
19. Fungaro, D.A. and Brett, C.M.A.; "Eletrodos modificados com polímeros perfluorados e sulfonados: aplicações em análises ambientais". *Química Nova*, 23:(6), **2000**, 805-811.
20. Schultze, J.W. and Karabulut, H.; "Application potential of conducting polymers". *Electrochimica Acta*, 50:(7-8), **2005**, 1739-1745.
21. Zoppi, R.A. and De Paoli, M.A.; "Aplicações Tecnológicas de Polímeros Intrinsecamente Condutores: Perspectivas Atuais ". *Química Nova* 16:(6), **1993**, 560-569.
22. Tan, K.L., Tan, B.T.G., Khor, S.H., Neoh, K.G. and Kang, E.T.; "The effects of synthesis conditions on the characteristics and chemical structures of polyaniline: A comparative study". *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 52:(5), **1991**, 673-680.
23. Wan, M.; "The influence of polymerization method and temperature on the absorption spectra and morphology of polyaniline". *Synthetic Metals*, 31:(1), **1989**, 51-59.

24. Nalwa, H.S. *Handbook of Organic Conductive Molecules and Polymers*, (John Wiley & Sons, 1996).
25. Malinauskas, A.; "Chemical deposition of conducting polymers". *Polymer*, 42:(9), **2001**, 3957-3972.
26. Gurunathan, K., Murugan, A.V., Marimuthu, R., Mulik, U.P. and Amalnerkar, D.P.; "Electrochemically synthesised conducting polymeric materials for applications towards technology in electronics, optoelectronics and energy storage devices". *Materials Chemistry and Physics*, 61:(3), **1999**, 173-191.
27. Krompiec, M., Krompiec, S., Ignasiak, H., Lapkowski, M., Kus, P., Stanek, L., Penczek, R., Lis, S., Staninski, K., Sajewicz, M. and Gebarowska, K.; "Synthesis and electropolymerization of 3,5-dithienylpyridines, their complexes and N-methylpyridinium cations". *Synthetic Metals*, 158:(21-24), **2008**, 831-838.
28. Chiericato Júnior, G. and Silva, A.P.S.; "Spectroelectrochemistry and investigation of charge transport mechanisms of iron poly(pyridyl) redox polymers". *Polyhedron*, 27:(7), **2008**, 1860-1866.
29. Ismail, K.M., Khalifa, Z.M., Azzem, M.A. and Badawy, W.A.; "Electrochemical preparation and characterization of poly(1-amino-9,10-anthraquinone) films". *Electrochimica Acta*, 47:(12), **2002**, 1867-1873.
30. Chen, S.-M. and Fa, Y.-H.; "The electropolymerization and electrocatalytic properties of polymerized new fuchsin film modified electrodes". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 553:(1), **2003**, 63-75.
31. Blanco-López, M.C., Lobo-Castañón, M.J., Miranda-Ordieres, A.J. and Tuñón-Blanco, P.; "Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23:(1), **2004**, 36-48.
32. D'Eramo, F., Zón, M.A., Fernández, H., Sereno, L. and Arévalo, A.H.; "Studies of a novel conducting polymer by cyclic and square wave voltammetries: Its synthesis and characterization". *Electrochimica Acta*, 53:(24), **2008**, 7182-7190.
33. Berggren, M., Inganäs, O., Gustafsson, G., Rasmussen, J., Andersson, M.R., Hjertberg, T. and Wennerström, O.; "Light-emitting diodes with variable colours from polymer blends". *Nature*, 372:(6505), **1994**, 444-446.
34. Colvin, V.L., Schlamp, M.C. and Alivisatos, A.P.; "Light-emitting diodes made from cadmium selenide nanocrystals and a semiconducting polymer". *Nature*, 370:(6488), **1994**, 354-357.

35. Greenham, N.C., Moratti, S.C., Bradley, D.D.C., Friend, R.H. and Holmes, A.B.; "Efficient light-emitting diodes based on polymers with high electron affinities". *Nature*, 365:(6447), **1993**, 628-630.
36. Grem, G., Leditzky, G., Ullrich, B. and Leising, G.; "Realization of a blue-light-emitting device using poly(p-phenylene)". *Advanced Materials*, 4:(1), **1992**, 36-37.
37. Strukelj, M., Papadimitrakopoulos, F., Miller, T.M. and Rothberg, L.J.; "Design and Application of Electron-Transporting Organic Materials". *Science*, 267:(5206), **1995**, 1969-1972.
38. Yu, G., Cao, Y., Andersson, M., Gao, J. and Heeger, A.J.; "Polymer Light-Emitting Electrochemical Cells with Frozen p-i-n Junction at Room Temperature". *Advanced Materials*, 10:(5), **1998**, 385-388.
39. Bigg, D.M.; "The effect of compounding on the conductive properties of EMI shielding compounds". *Advances in Polymer Technology*, 4:(3-4), **1984**, 255-266.
40. Heywang, G. and Jonas, F.; "Poly(alkylenedioxythiophene)s - new, very stable conducting polymers". *Advanced Materials*, 4:(2), **1992**, 116-118.
41. Gazotti Jr, W.A., Casalbore-Miceli, G., Geri, A. and de Paoli, M.A.; "A Solid-State Electrochromic Device Based on Two Optically Complementary Conducting Polymers". *Advanced Materials*, 10:(1), **1998**, 60-64.
42. Sapp, S.A., Sotzing, G.A., Reddinger, J.L. and Reynolds, J.R.; "Rapid switching solid state electrochromic devices based on complementary conducting polymer films". *Advanced Materials*, 8:(10), **1996**, 808-811.
43. Raistrick, I.D. *Electrochemistry of Semiconductors and Electronics: Processes and Devices*, (William Andrew Inc, 1992).
44. Li, F. and Alberly, W.J.; "Electrochemical polymerization of poly(thiophene-3-ethyl acetate) -- a new candidate for a rechargeable battery cathode". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 302:(1-2), **1991**, 279-284.
45. Roman, L.S., Andersson, M.R., Yohannes, T. and Inganás, O.; "Photodiode performance and nanostructure of polythiophene/C60 blends". *Advanced Materials*, 9:(15), **1997**, 1164-1168.
46. Sansiñena, J.M., Olazábal, V., Otero, T.F., Polo da Fonseca, C.N. and De Paoli, M.-A.; "A solid state artificial muscle based on polypyrrole and a solid

- polymeric electrolyte working in air". *Chemical Communications*, 1:(22), **1997**, 2217 - 2218.
47. He, G.S., Wung, C.J., Xu, G.C. and Prasad, P.N.; "Two-dimensional optical grating produced on a poly-p-phenylene vinylene/V₂O₅-gel film by ultrashort pulsed laser radiation". *Appl. Opt.*, 30:(27), **1991**, 3810-3817.
 48. Wung, C.J., Pang, Y., Prasad, P.N. and Karasz, F.E.; "Poly(p-phenylene vinylene)-silica composite: a novel sol-gel processed non-linear optical material for optical waveguides". *Polymer*, 32:(4), **1991**, 605-608.
 49. Wung, C.J., Wijekoon, W.M.K.P. and Prasad, P.N.; "Characterization of sol-gel processed poly(p-phenylenevinylene) silica and V₂O₅ composites using waveguide Raman, Raman and FTi.r. spectroscopy". *Polymer*, 34:(6), **1993**, 1174-1178.
 50. Gardner, J.W. and Bartlett, P.N.; "Design of conducting polymer gas sensors: Modelling and experiment". *Synthetic Metals*, 57:(1), **1993**, 3665-3670.
 51. Hsueh, C.C. and Brajter-Toth, A.; "A simple current transducer for ultramicroelectrode measurements at a wide range of time scales". *Analytica Chimica Acta*, 321:(2-3), **1996**, 209-214.
 52. Kuwabata, S. and Martin, C.R.; "Mechanism of the Amperometric Response of a Proposed Glucose Sensor Based on a Polypyrrole-Tubule-Impregnated Membrane". *Analytical Chemistry*, 66:(17), **1994**, 2757-2762.
 53. Castro, C.M., Vieira, S.N., Gonçalves, R.A., Brito-Madurro, A.G. and Madurro, J.M.; "Electrochemical and morphologic studies of nickel incorporation on graphite electrodes modified with polytyramine". *Journal of Materials Science*, 43:(2), **2008**, 475-482.
 54. Hable, C.T. and Wrighton, M.S.; "Electrocatalytic oxidation of methanol and ethanol: a comparison of platinum-tin and platinum-ruthenium catalyst particles in a conducting polyaniline matrix". *Langmuir*, 9:(11), **1993**, 3284-3290.
 55. Lofrano, R.C.Z., Madurro, J.M., Abrantes, L.M. and Romero, J.R.; "Electrocatalytic hydrogenation of carbonylic compounds using an electrode with platinum particles dispersed in films of poly-[allyl ether p-(2-aminoethyl) phenol] co-polymerized with allyl phenyl ether". *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 218:(1), **2004**, 73-79.

56. Radi, P.A., Brito-Madurro, A.G., Madurro, J.M. and Dantas, N.O.; "Characterization and properties of CdO nanocrystals incorporated in polyacrylamide". *Brazilian Journal of Physics*, 36:(1), **2006**, 412-414.
57. Kivelson, S. and Heeger, A.J.; "Intrinsic conductivity of conducting polymers". *Synthetic Metals*, 22:(4), **1988**, 371-384.
58. Fosong, W., Jinsong, T., Lixiang, W., Hongfang, Z. and Zhishen, M.; "Study on the Crystallinity of Polyaniline". *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 160:(1), **1988**, 175 - 184.
59. Lei, J., Cai, Z. and Martin, C.R.; "Effect of reagent concentrations used to synthesize polypyrrole on the chemical characteristics and optical and electronic properties of the resulting polymer". *Synthetic Metals*, 46:(1), **1992**, 53-69.
60. Naarmann, H. and Theophilou, N.; "New process for the production of metal-like, stable polyacetylene". *Synthetic Metals*, 22:(1), **1987**, 1-8.
61. Joel, S.M.; "Conducting polymers - materials of commerce". *Advanced Materials*, 5:(7-8), **1993**, 587-589.
62. Breime, F., Buttstaedt, J. and Emig, G.; "Coating of polymers with titanium-based layers by a novel plasma-assisted chemical vapor deposition process". *Thin Solid Films*, 377-378:(1), **2000**, 755-759.
63. Plueddemann, E.P. *Silane Coupling Agents*, (Plenum Press, New York, 1991).
64. Luzinov, I., Julthongpipit, D., Liebmann-Vinson, A., Cregger, T., Foster, M.D. and Tsukruk, V.V.; "Epoxy-Terminated Self-Assembled Monolayers: Molecular Glues for Polymer Layers". *Langmuir*, 16:(2), **2000**, 504-516.
65. Abruna, H.D. *Electroresponsive Molecular and Polymeric Systems*, (CRC Press, 1988).
66. Mekhalif, Z., Cossement, D., Hevesi, L. and Delhalle, J.; "Electropolymerization of pyrrole on silanized polycrystalline titanium substrates". *Applied Surface Science*, 254:(13), **2008**, 4056-4062.
67. Malinauskas, A.; "Electrocatalysis at conducting polymers". *Synthetic Metals*, 107:(2), **1999**, 75-83.
68. Inzelt, G., Pineri, M., Schultze, J.W. and Vorotyntsev, M.A.; "Electron and proton conducting polymers: recent developments and prospects". *Electrochimica Acta*, 45:(15-16), **2000**, 2403-2421.
69. Janata, J.; "Chemical sensors". *Analytical Chemistry*, 62:(12), **1990**, 33-44.

70. Janata, J. and Bezegh, A.; "Chemical sensors". *Analytical Chemistry*, 60:(12), **1988**, 62-74.
71. Pron, A. and Rannou, P.; "Processible conjugated polymers: from organic semiconductors to organic metals and superconductors". *Progress in Polymer Science*, 27:(1), **2002**, 135-190.
72. Stenger-Smith, J.D.; "Intrinsically electrically conducting polymers. Synthesis, characterization, and their applications". *Progress in Polymer Science*, 23:(1), **1998**, 57-79.
73. Becker, H., Spreitzer, H., Kreuder, W., Kluge, E., Vestweber, H., Schenk, H. and Treacher, K.; "Advances in polymers for PLEDs: from a polymerization mechanism to industrial manufacturing". *Synthetic Metals*, 122:(1), **2001**, 105-110.
74. Cui, X., Hong, L. and Lin, X.; "Electrochemical preparation, characterization and application of electrodes modified with hybrid hexacyanoferrates of copper and cobalt". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 526:(1-2), **2002**, 115-124.
75. Deronzier, A. and Moutet, J.C.; "Functionalized polypyrroles. New molecular materials for electrocatalysis and related applications". *Acc. Chem. Res.*, 22:(7), **1989**, 249-255.
76. McQuade, D.T., Pullen, A.E. and Swager, T.M.; "Conjugated Polymer-Based Chemical Sensors". *Chemical Reviews*, 100:(7), **2000**, 2537-2574.
77. Ivanov, S., Tsakova, V. and Mirsky, V.M.; "Conductometric transducing in electrocatalytical sensors: Detection of ascorbic acid". *Electrochemistry Communications*, 8:(4), **2006**, 643-646.
78. Sirringhaus, H., Tessler, N. and Friend, R.H.; "Integrated Optoelectronic Devices Based on Conjugated Polymers". *Science*, 280:(5370), **1998**, 1741-1744.
79. Ramanathan, K., Bangar, M.A., Yun, M., Chen, W., Myung, N.V. and Mulchandani, A.; "Bioaffinity Sensing Using Biologically Functionalized Conducting-Polymer Nanowire". *J. Am. Chem. Soc.*, 127:(2), **2005**, 496-497.
80. Bidez, P.R., Li, S., MacDiarmid, A.G., Venancio, E.C., Wei, Y. and Lelkes, P.I.; "Polyaniline, an electroactive polymer, supports adhesion and proliferation of cardiac myoblasts". *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17:(1-2), **2006**, 199-212.

81. Kwon, N.H., Rahman, M.A., Won, M.S. and Shim, Y.B.; "Lipid-bonded Conducting Polymer Layers for a Model Biomembrane: Application to Superoxide Biosensors". *Analytical Chemistry*, 78:(1), **2006**, 52-60.
82. Wang, J., Chen, J., Wang, C.Y., Zhou, D., Too, C.O. and Wallace, G.G.; "Electrochemical synthesis of polypyrrole films using stainless steel mesh as substrate for battery application". *Synthetic Metals*, 153:(1-3), **2005**, 117-120.
83. Kurian, M., Galvin, M.E., Trapa, P.E., Sadoway, D.R. and Mayes, A.M.; "Single-ion conducting polymer-silicate nanocomposite electrolytes for lithium battery applications". *Electrochimica Acta*, 50:(10), **2005**, 2125-2134.
84. Lisowska-Oleksiak, A., Kazubowska, K. and Kupniewska, A.; "Ionic transport of Li^+ in polymer films consisting of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) and poly(4-styrenesulphonate)". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 501:(1-2), **2001**, 54-61.
85. Soudan, P., Ho, H.A., Breau, L. and Belanger, D.; "Chemical synthesis and electrochemical properties of poly(cyano-substituted-diheteroareneethylene) as conducting polymers for electrochemical supercapacitors". *Journal of the Electrochemical Society*, 148:(7), **2001**, A775-A782.
86. Ferraris, J.P., Eissa, M.M., Brotherston, I.D. and Loveday, D.C.; "Performance Evaluation of Poly 3-(Phenylthiophene) Derivatives as Active Materials for Electrochemical Capacitor Applications". *Chem. Mater.*, 10:(11), **1998**, 3528-3535.
87. Li, W., Chen, J., Zhao, J., Zhang, J. and Zhu, J.; "Application of ultrasonic irradiation in preparing conducting polymer as active materials for supercapacitor". *Materials Letters*, 59:(7), **2005**, 800-803.
88. Li, G., Martinez, C. and Semancik, S.; "Controlled Electrophoretic Patterning of Polyaniline from a Colloidal Suspension". *J. Am. Chem. Soc.*, 127:(13), **2005**, 4903-4909.
89. Somani, P.R. and Radhakrishnan, S.; "Electrochromic materials and devices: present and future". *Materials Chemistry and Physics*, 77:(1), **2003**, 117-133.
90. Cho, I.-K., Lee, W.-J., Rho, B.-S. and Jeong, M.-Y.; "Polymer waveguide with integrated reflector mirrors for an inter-chip link system". *Optics Communications*, 281:(19), **2008**, 4906-4909.
91. Sindhu, S., Narasimha Rao, K., Ahuja, S., Kumar, A. and Gopal, E.S.R.; "Spectral and optical performance of electrochromic poly(3,4-

- ethylenedioxythiophene) (PEDOT) deposited on transparent conducting oxide coated glass and polymer substrates". *Materials Science and Engineering: B*, 132:(1-2), **2006**, 39-42.
92. Akcelrud, L.; "Electroluminescent polymers". *Progress in Polymer Science*, 28:(6), **2003**, 875-962.
 93. Huang, H., He, Q., Lin, H., Bai, F. and Cao, Y.; "Properties of an alternating copolymer and its applications in LEDs and photovoltaic cells". *Thin Solid Films*, 477:(1-2), **2005**, 7-13.
 94. Sonmez, G.; "Polymeric electrochromics". *Chemical Communications*, 1:(42), **2005**, 5251 - 5259.
 95. Perepichka, I.F., Perepichka, D.F., Meng, H. and Wudl, F.; "Light-Emitting Polythiophenes". *Advanced Materials*, 17:(19), **2005**, 2281-2305.
 96. Camalet, J.L., Lacroix, J.C., Aeiyaich, S., Chane-Ching, K. and Lacaze, P.C.; "Electrosynthesis of adherent polyaniline films on iron and mild steel in aqueous oxalic acid medium". *Synthetic Metals*, 93:(2), **1998**, 133-142.
 97. Nguyen Thi Le, H., Garcia, B., Deslouis, C. and Le Xuan, Q.; "Corrosion protection and conducting polymers: polypyrrole films on iron". *Electrochimica Acta*, 46:(26-27), **2001**, 4259-4272.
 98. Hien, N.T.L., Garcia, B., Pailleret, A. and Deslouis, C.; "Role of doping ions in the corrosion protection of iron by polypyrrole films". *Electrochimica Acta*, 50:(7-8), **2005**, 1747-1755.
 99. Júnior, G.C., Silva, A.P.S. and Guinesi, L.S.; "Synthesis, characterization and electropolymerization of a new polypyrrole iron(II) Schiff-base complex". *Polyhedron*, 23:(11), **2004**, 1953-1960.
 100. Fabre, B. and Simonet, J.; "Electroactive polymers containing crown ether or polyether ligands as cation-responsive materials". *Coordination Chemistry Reviews*, 178-180:(Part 2), **1998**, 1211-1250.
 101. Correia, J.P., Graczyk, M., Abrantes, L.M. and Vorotyntsev, M.A.; "Polypyrrole films functionalized with pendant titanocene dichloride complexes: Ellipsometric study of the electropolymerization process". *Electrochimica Acta*, 53:(3), **2007**, 1195-1205.
 102. Li, C. and Mu, S.; "Electrochromic properties of sulfonic acid ring-substituted polyaniline in aqueous and non-aqueous media". *Synthetic Metals*, 144:(2), **2004**, 143-149.

103. Hermas, A.A., Nakayama, M. and Ogura, K.; "Enrichment of chromium-content in passive layers on stainless steel coated with polyaniline". *Electrochimica Acta*, 50:(10), **2005**, 2001-2007.
104. Diaz, A.F. and Logan, J.A.; "Electroactive polyaniline films". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 111:(1), **1980**, 111-114.
105. Noufi, R., Nozik, A.J., White, J. and Warren, L.F.; "Enhanced Stability of Photoelectrodes with Electrogenenerated Polyaniline Films". *Journal of the Electrochemical Society*, 129:(10), **1982**, 2261-2265.
106. Yue, J., Wang, Z.H., Cromack, K.R., Epstein, A.J. and MacDiarmid, A.G.; "Effect of sulfonic acid group on polyaniline backbone". *J. Am. Chem. Soc.*, 113:(7), **1991**, 2665-2671.
107. Chung, C.-Y., Wen, T.-C. and Gopalan, A.; "Identification of electrochromic sites in poly(diphenylamine) using a novel absorbance-potential-wavelength profile". *Electrochimica Acta*, 47:(3), **2001**, 423-431.
108. Malinauskas, A. and Holze, R.; "A UV-visible spectroelectrochemical study of the electropolymerisation of N -benzylaniline". *Journal of Solid State Electrochemistry*, 3:(7), **1999**, 429-436.
109. Park, Y.W., Moon, J.S., Bak, M.K. and Jin, J.I.; "Electrical properties of polyaniline and substituted polyaniline derivatives". *Synthetic Metals*, 29:(1), **1989**, 389-394.
110. Athawale, A.A., Deore, B.A. and Chabukswar, V.V.; "Studies on poly(diphenylamine) synthesized electrochemically in nonaqueous media". *Materials Chemistry and Physics*, 58:(1), **1999**, 94-100.
111. Lapuente, R., Cases, F., Garcés, P., Morallón, E. and Vázquez, J.L.; "A voltammetric and FTIR-ATR study of the electropolymerization of phenol on platinum electrodes in carbonate medium: Influence of sulfide". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 451:(1-2), **1998**, 163-171.
112. Yang, H. and Bard, A.J.; "The application of fast scan cyclic voltammetry. Mechanistic study of the initial stage of electropolymerization of aniline in aqueous solutions". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 339:(1-2), **1992**, 423-449.
113. Yamada, K., Teshima, K., Kobayashi, N. and Hirohashi, R.; "Electropolymerization of aniline derivatives in non-aqueous solution without a proton donor". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 394:(1-2), **1995**, 71-79.

114. Chiang, J.-C. and MacDiarmid, A.G.; "Polyaniline: Protonic acid doping of the emeraldine form to the metallic regime". *Synthetic Metals*, 13:(1-3), **1986**, 193-205.
115. Gattrell, M. and Kirk, D.W.; "A Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study of the Passive Film Produced during Aqueous Acidic Phenol Electro-oxidation". *Journal of the Electrochemical Society*, 139:(10), **1992**, 2736-2744.
116. Vieira, S.N., Ferreira, L.F., Franco, D.L., Afonso, A.S., Gonçalves, R.A., Brito-Maduro, A.G. and Maduro, J.M.; "Electrochemical Modification of Graphite Electrodes with Poly(4-aminophenol)". *Macromolecular Symposia*, 245-246:(1), **2006**, 236-242.
117. Franco, D.L., Afonso, A.S., Vieira, S.N., Ferreira, L.F., Gonçalves, R.A., Brito-Maduro, A.G. and Maduro, J.M.; "Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: Electric and morphologic properties". *Materials Chemistry and Physics*, 107:(2-3), **2008**, 404-409.
118. Sankarapavinasam, S.; "Permeability and Electrocatalytic Properties of Film Prepared by Electropolymerization of M-Aminophenol". *Synthetic Metals*, 58:(2), **1993**, 173-185.
119. Andreozzi, R., Caprio, V., Insola, A. and Marotta, R.; "The oxidation of metol (N-methyl-p-aminophenol) in aqueous solution by UV/H₂O₂ photolysis". *Water Research*, 34:(2), **2000**, 463-472.
120. Sun, W., Jiao, K., Zhang, S., Zhang, C. and Zhang, Z.; "Electrochemical detection for horseradish peroxidase-based enzyme immunoassay using p-aminophenol as substrate and its application in detection of plant virus". *Analytica Chimica Acta*, 434:(1), **2001**, 43-50.
121. Cheek, G., Wales, C.P. and Nowak, R.J.; "pH response of platinum and vitreous carbon electrodes modified by electropolymerized films". *Analytical Chemistry*, 55:(2), **1983**, 380-381.
122. Geniès, E.M., Boyle, A., Lapkowski, M. and Tsintavis, C.; "Polyaniline: A historical survey". *Synthetic Metals*, 36:(2), **1990**, 139-182.
123. Guenbour, A., Kacemi, A., Benbachir, A. and Aries, L.; "Electropolymerization of 2-aminophenol: Electrochemical and spectroscopic studies". *Progress in Organic Coatings*, 38:(2), **2000**, 121-126.
124. Pham, M.-C., Dubois, J.-E. and Lacaze, P.-C.; "Obtaining thin films of "reactive polymers" on metal surfaces by electrochemical polymerization: Part II. Alcohol

- substituted polyphenylene oxide films". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 99:(3), **1979**, 331-340.
125. Pham, M.-C., Lacaze, P.-C., Mourcel, P. and Dubois, J.-E.; "The role of amines as complexing agents in film growth during electropolymerization of ester substituted phenols onto mild steel". *Journal of Applied Electrochemistry*, 16:(3), **1986**, 393-402.
126. Hür, E., Bereket, G., Duran, B., Özdemir, D. and Sahin, Y.; "Electropolymerization of m-aminophenol on mild steel and its corrosion protection effect". *Progress in Organic Coatings*, 60:(2), **2007**, 153-160.
127. Silva, F., Vieira, S., Goulart, L., Boodts, J., Brito-Madurro, A. and Madurro, J.O.; "Electrochemical Investigation of Oligonucleotide-DNA Hybridization on Poly(4-Methoxyphenethylamine)". *International Journal of Molecular Sciences*, 9:(7), **2008**, 1173-1187.
128. Silva, T.A.R., Ferreira, L.F., Boodts, J.F.C., Eiras, S.P., Madurro, J.M. and Brito-Madurro, A.G.; "Poly(4-hydroxyphenylacetic acid): A new material for immobilization of biomolecules". *Polymer Engineering & Science*, 48:(10), **2008**, 1963-1970.
129. Franco, D.L., Afonso, A.S., Ferreira, L.F., Gonçalves, R.A., Boodts, J.F.C., Brito-Madurro, A.G. and Madurro, J.M.; "Electrodes modified with polyaminophenols: Immobilization of purines and pyrimidines". *Polymer Engineering & Science*, 48:(10), **2008**, 2043-2050.
130. Silva, T.A.R., Ferreira, L.F., Souza, L.M., Goulart, L.R., Madurro, J.M. and Brito-Madurro, A.G.; "New approach to immobilization and specific-sequence detection of nucleic acids based on poly(4-hydroxyphenylacetic acid)". *Materials Science and Engineering: C*, 29:(2), **2009**, 539-545.
131. Brito-Madurro, A., Ferreira, L., Vieira, S., Ariza, R., Filho, L. and Madurro, J.; "Immobilization of purine bases on a poly-4-aminophenol matrix". *Journal of Materials Science*, 42:(9), **2007**, 3238-3243.
132. Ferreira, L.F., Boodts, J.F.C., Brito-Madurro, A.G. and Madurro, J.M.; "Gold electrodes modified with poly(4-aminophenol): incorporation of nitrogenated bases and an oligonucleotide". *Polymer International*, 57:(4), **2008**, 644-650.
133. Cosnier, S.; "Biosensors based on electropolymerized films: new trends". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377:(1), **2003**, 507-520.

134. Gooding, J.J.; "Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends". *Analytica Chimica Acta*, 559:(2), **2006**, 137-151.
135. D'Orazio, P.; "Biosensors in clinical chemistry". *Clinica Chimica Acta*, 334:(1-2), **2003**, 41-69.
136. Mello, L.D.and Kubota, L.T.; "Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries". *Food Chemistry*, 77:(2), **2002**, 237-256.
137. Afonso, A.S.; "Desenvolvimento de sensor bioeletroquímico para detecção de Hanseníase". *Dissertação de Mestrado*, **2008**, Universidade Federal de Uberlândia.
138. Patacas, R.C.; "Desenvolvimento, caracterização e optimização de um biossensor amperométrico para a determinação de nitrato baseado em microinterfaces gelificadas". *Dissertação de Mestrado*, **2007**, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
139. Ramanathan, K., Bangar, M.A., Yun, M., Chen, W., Myung, N.V.and Mulchandani, A.; "Bioaffinity Sensing Using Biologically Functionalized Conducting-Polymer Nanowire". *Journal of the American Chemical Society*, 127:(2), **2004**, 496-497.
140. Ramanathan, K., Pandey, S.S., Kumar, R., Gulati, A., Murthy, A.S.N.and Malhotra, B.D.; "Covalent immobilization of glucose oxidase to poly(o-amino benzoic acid) for application to glucose biosensor". *Journal of Applied Polymer Science*, 78:(3), **2000**, 662-667.
141. Mikkelsen, S.R.and Corton, E.; "Bioanalytical Chemistry". *John Wiley and Sons*, **2004**, New Jersey.
142. Sharma, S.K., Sehgal, N.and Kumar, A.; "Biomolecules for development of biosensors and their applications". *Current Applied Physics*, 3:(2-3), **2003**, 307-316.
143. Turner, A., Karube, I.and Wilson, G.; "Biosensors: Fundamentals and Applications". *Oxford University Press*, **1987**, Oxford, cap.6.
144. Gerard, M., Chaubey, A.and Malhotra, B.D.; "Application of conducting polymers to biosensors". *Biosensors and Bioelectronics*, 17:(5), **2002**, 345-359.
145. Ying-Sing, F., Shi-Hui, S.and De-Rong, Z.; "Piezoelectric crystal for sensing bacteria by immobilizing antibodies on divinylsulphone activated poly-m-aminophenol film". *Talanta*, 51:(1), **2000**, 151-158.

146. Malhotra, B.D., Chaubey, A. and Singh, S.P.; "Prospects of conducting polymers in biosensors". *Analytica Chimica Acta*, 578:(1), **2006**, 59-74.
147. Chaubey, A., Gerard, M., Singhal, R., Singh, V.S. and Malhotra, B.D.; "Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polypyrrole-polyvinylsulphonate composite films for application to lactate biosensors". *Electrochimica Acta*, 46:(5), **2001**, 723-729.
148. "Thermo Fisher Scientific Inc. - Chemistry of Crosslinking". **2009**, Disponível em: <http://www.piercenet.com/Products/Browse.cfm?fldID=CE4D6C5C-5946-4814-9904-C5946E01232683> Acesso em: 01232605/01232608/01232009.
149. Davis, F. and Higson, S.P.J.; "Structured thin films as functional components within biosensors". *Biosensors and Bioelectronics*, 21:(1), **2005**, 1-20.
150. Mousty, C.; "Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes--new trends". *Applied Clay Science*, 27:(3-4), **2004**, 159-177.
151. Davis, J., Huw Vaughan, D. and Cardosi, M.F.; "Elements of biosensor construction". *Enzyme and Microbial Technology*, 17:(12), **1995**, 1030-1035.
152. Lei, Y., Chen, W. and Mulchandani, A.; "Microbial biosensors". *Analytica Chimica Acta*, 568:(1-2), **2006**, 200-210.
153. Liu, S., Ye, L., He, P. and Fang, Y.; "Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode". *Analytica Chimica Acta*, 335:(3), **1996**, 239-243.
154. Swaile, B.A.H. and Chambers, J.Q.; "Electrochemical release of ethidium into and fluorescence detection of DNA-ethidium complexes in the diffusion layer at a carbon paste electrode". *Analytical Biochemistry*, 196:(2), **1991**, 415-420.
155. Zhu, N.N., Zhang, A.P., Wang, Q.J., He, P.G. and Fang, Y.Z.; "Electrochemical detection of DNA hybridization using methylene blue and electro-deposited zirconia thin films on gold electrodes". *Analytica Chimica Acta*, 510:(2), **2004**, 163-168.
156. Zhu, N., Chang, Z., He, P. and Fang, Y.; "Electrochemically fabricated polyaniline nanowire-modified electrode for voltammetric detection of DNA hybridization". *Electrochimica Acta*, 51:(18), **2006**, 3758-3762.
157. Teles, F.R.R. and Fonseca, L.P.; "Trends in DNA biosensors". *Talanta*, 77:(2), **2008**, 606-623.
158. Goulart, L.R., Vieira, C.U., Freschi, A.P.P., Capparelli, F.E., Fujimura, P.T., Almeida, J.F., Ferreira, L.F., Goulart, I.M.B., Brito-Maduro, A.G. and Maduro,

- J.M.; "Biomarkers for serum diagnosis of infectious diseases and their potential application in novel sensor platforms". *Critical Review in Immunology*, (In Press), **2009**.
159. Afonso, A.S., Goulart, I.M.B., Goulart, L.R., Machado, A.E.H., Madurro, J.M.and A.G., B.-M.; "Bioelectrode for sequence-specific gene detection of *Mycobacterium leprae*". *Biotechnology and Bioengineering*, **2009**, (Submetido).
 160. Franco, D.L.; "Eletropolimerização de aminofenóis para desenvolvimento de biossensores eletroquímicos aplicados à detecção de gene específico para câncer de próstata ". *Dissertação de Mestrado*, **2007**.
 161. Freudenrich, C.; "Como funciona o DNA". *Disponível em: <http://saude.hsw.uol.com.br/dna1.htm>*; , **2009**, Acesso em: 06/08/2009.
 162. Vinícius, M.; "DNA". *Disponível em: <http://www.universitario.com.br/celo/topicos/subtopicos/genetica/dna/dna.html>*, **2009**, Acesso em: 06/08/2009.
 163. Watson, J.D.and Crick, F.H.C.; "Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid". *Nature*, 171:(4356), **1953**, 737-738.
 164. Zhai, J., Cui, H.and Yang, R.; "DNA based biosensors". *Biotechnology Advances*, 15:(1), **1997**, 43-58.
 165. Jameson, J.L.and Hollenberg, A.N.; "Recent advances in studies of the molecular basis of endocrine disease". *Hormone and Metabolic Research*, 24:(5), **1992**, 201-209.
 166. Baird, P.A., Anderson, T.W., Newcombe, H.B.and Lowry, R.B.; "Genetic disorders in children and young adults: A population study". *American Journal of Human Genetics*, 42:(5), **1988**, 677-693.
 167. McPherson, M.J., Quirke, P.and Taylor, G.R.; "PCR, a Practical Approach". *IRL Press*, **1993**.
 168. Keller, G.H.and Manak, M.M. *DNA Probes*, (New York, 1989).
 169. Loewy, Z.G.and Pottathil, R. *Diagnostics in the Year 2000: Antibody, Biosensor and Nucleic Acid Technologies*, (New York, 1993).
 170. Marrazza, G., Chiti, G., Mascini, M.and Anichini, M.; "Detection of human apolipoprotein E genotypes by DNA electrochemical biosensor coupled with PCR". *Clinical Chemistry*, 46:(1), **2000**, 31-37.

171. Millan, K.M., Saraullo, A. and Mikkelsen, S.R.; "Voltammetric DNA biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode". *Analytical Chemistry*, 66:(18), **1994**, 2943-2948.
172. Hashimoto, K., Ito, K. and Ishimori, Y.; "Novel DNA sensor for electrochemical gene detection". *Analytica Chimica Acta*, 286:(2), **1994**, 219-224.
173. Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Farias, P.A.M. and Dontha, N.; "DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the human immunodeficiency virus". *International Journal of Computer Vision*, 18:(3), **1996**, 2629-2634.
174. Palecek, E., Fojta, M., Tomschik, M. and Wang, J.; "Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage". *Biosensors and Bioelectronics*, 13:(6), **1998**, 621-628.
175. Pividori, M.I., Merkoçi, A. and Alegret, S.; "Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods". *Biosensors and Bioelectronics*, 15:(5-6), **2000**, 291-303.
176. Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H. and Dontha, N.; "Nucleic-acid immobilization, recognition and detection at chronopotentiometric DNA chips". *Biosensors and Bioelectronics*, 12:(7), **1997**, 587-599.
177. Matsumoto, Y., Terui, N. and Tanaka, S.; "Accumulated detection of ethidium bromide using a UV-irradiated DNA film modified electrode and its application for electrochemical detection of an environmental pollutant". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 610:(2), **2007**, 193-198.
178. Waring, M.J.; "DNA modification and cancer". *Annual Review of Biochemistry*, 50:(1), **1981**, 159-192.
179. Minasyan, S.H., Tavadyan, L.A., Antonyan, A.P., Davtyan, H.G., Parsadanyan, M.A. and Vardevanyan, P.O.; "Differential pulse voltammetric studies of ethidium bromide binding to DNA". *Bioelectrochemistry*, 68:(1), **2006**, 48-55.
180. Fojta, M., Fulneckova, J., Kubicek, T. and Havran, L.; "Adsorptive transfer stripping AC voltammetry of DNA complexes with intercalators". *Electroanalysis*, 12:(12), **2000**, 926-934.
181. Palecek, E., Tomschik, M., Stankova, V. and Havran, L.; "Chronopotentiometric Stripping of DNA at Mercury Electrodes". *Electroanalysis*, 9:(13), **1997**, 990-997.

182. Wang, J., Cai, X., Rivas, G. and Shiraishi, H.; "Stripping potentiometric transduction of DNA hybridization processes". *Analytica Chimica Acta*, 326:(1-3), **1996**, 141-147.
183. Liu, J., Li, J. and Dong, S.; "Interaction of brilliant cresyl blue and methylene green with DNA studied by spectrophotometric and voltammetric methods". *Electroanalysis*, 8:(8-9), **1996**, 803-807.
184. Liu, S., Ye, J., He, P. and Fang, Y.; "Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode". *Analytica Chimica Acta*, 335:(3), **1996**, 239-243.
185. Arzum Erdem, Kagan Kerman, Burcu Meric and Mehmet Ozsoz. "Methylene Blue as a Novel Electrochemical Hybridization Indicator". *Electroanalysis*, 13:(3), **2001**, 219-223.
186. Erdem, A., Meric, B., Kerman, K., Dalbasti, T. and Ozsoz, M.; "Detection of Interaction Between Metal Complex Indicator and DNA by Using Electrochemical Biosensor". *Electroanalysis*, 11:(18), **1999**, 1372-1376.
187. Marrazza, G., Chianella, I. and Mascini, M.; "Disposable DNA electrochemical sensor for hybridization detection". *Biosensors and Bioelectronics*, 14:(1), **1999**, 43-51.
188. Erdem, A., Kerman, K., Meric, B., Akarca, U.S. and Ozsoz, M.; "Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus". *Analytica Chimica Acta*, 422:(2), **2000**, 139-149.
189. Johnston, D.H. and Thorp, H.H.; "Cyclic Voltammetry Studies of Polynucleotide Binding and Oxidation by Metal Complexes: Homogeneous Electron-Transfer Kinetics". *The Journal of Physical Chemistry*, 100:(32), **1996**, 13837-13843.
190. Boon, E.M., Ceres, D.M., Drummond, T.G., Hill, M.G. and Barton, J.K.; "Mutation detection by electro catalysis at DNA-modified electrodes". *Nature Biotechnology*, 18:(10 SUPPL.), **2000**, 1096-1100.
191. Kelley, S.O., Barton, J.K., Jackson, N.M. and Hill, M.G.; "Electrochemistry of Methylene Blue Bound to a DNA-Modified Electrode". *Bioconjugate Chemistry*, 8:(1), **1997**, 31-37.
192. Yang, W., Ozsoz, M., Hibbert, D.B. and Gooding, J.J.; "Evidence for the Direct Interaction Between Methylene Blue and Guanine Bases Using DNA-Modified Carbon Paste Electrodes". *Electroanalysis*, 14:(18), **2002**, 1299-1302.

193. Henry, O.Y.F., Acero Sanchez, J.L., Latta, D. and O'Sullivan, C.K.; "Electrochemical quantification of DNA amplicons via the detection of non-hybridised guanine bases on low-density electrode arrays". *Biosensors and Bioelectronics*, 24:(7), **2009**, 2064-2070.
194. Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Ozkan, Z. and Ozsoz, M.; "Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA". *Electrochemistry Communications*, 4:(9), **2002**, 705-709.
195. Lévy, B. and Enescu, M.; "Theoretical study of methylene blue: a new method to determine partial atomic charges; investigation of the interaction with guanine". *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 432:(3), **1998**, 235-245.
196. Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Erensoy, S., Akarca, U.S., Mascini, M. and Ozsoz, M.; "Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue". *Talanta*, 56:(5), **2002**, 837-846.
197. Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Justin Gooding, J., Nielsen, P.E. and Ozsoz, M.; "Electrochemical detection of hybridization using peptide nucleic acids and methylene blue on self-assembled alkanethiol monolayer modified gold electrodes". *Electrochemistry Communications*, 4:(10), **2002**, 796-802.
198. Ozkan, D., Kara, P., Kerman, K., Meric, B., Erdem, A., Jelen, F., Nielsen, P.E. and Ozsoz, M.; "DNA and PNA sensing on mercury and carbon electrodes by using methylene blue as an electrochemical label". *Bioelectrochemistry*, 58:(1), **2002**, 119-126.
199. Zhang, Y. and Hu, N.; "Cyclic voltammetric detection of chemical DNA damage induced by styrene oxide in natural dsDNA layer-by-layer films using methylene blue as electroactive probe". *Electrochemistry Communications*, 9:(1), **2007**, 35-41.
200. Zhao, G.C., Zhu, J.J. and Chen, H.Y.; "Spectroscopic studies of the interactive model of methylene blue with DNA by means of β -cyclodextrin". *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 55:(5), **1999**, 1109-1117.

201. Tuite, E. and Norden, B.; "Sequence-Specific Interactions of Methylene Blue with Polynucleotides and DNA: A Spectroscopic Study". *Journal of the American Chemical Society*, 116:(17), **2002**, 7548-7556.
202. Rohs, R., Sklenar, H., Lavery, R. and Roder, B.; "Methylene Blue Binding to DNA with Alternating GC Base Sequence: A Modeling Study". *Journal of the American Chemical Society*, 122:(12), **2000**, 2860-2866.
203. Li, W.-Y., Xu, J.-G. and He, X.-W.; "Characterization of the Binding of Methylene Blue to DNA by Spectroscopic Methods". *Analytical Letters*, 33:(12), **2000**, 2453 - 2464.
204. Hogan, M., Wang, J., Austin, R.H., Monitto, C.L. and Hershkowitz, S.; "Molecular motion of DNA as measured by triplet anisotropy decay". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79:(11), **1982**, 3518-3522.
205. Nafisi, S., Saboury, A.A., Keramat, N., Neault, J.-F. and Tajmir-Riahi, H.-A.; "Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue". *Journal of Molecular Structure*, 827:(1-3), **2007**, 35-43.
206. Enescu, M., Levy, B. and Gheorghe, V.; "Molecular Dynamics Simulation of Methylene Blue-Guanine Complex in Water: The Role of Solvent in Stacking". *Journal of Physical Chemistry B*, 104:(5), **2000**, 1073-1077.
207. Kelley, S.O., Boon, E.M., Barton, J.K., Jackson, N.M. and Hill, M.G.; "Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA". *Nucleic Acids Research*, 27:(24), **1999**, 4830-4837.
208. Tani, A., Thomson, A.J. and Butt, J.N.; "Methylene blue as an electrochemical discriminator of single- and double-stranded oligonucleotides immobilised on gold substrates". *Analyst*, 126:(10), **2001**, 1756-1759.
209. Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Meric, B., Gooding, J.J. and Ozsoz, M.; "Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes". *Analytica Chimica Acta*, 462:(1), **2002**, 39-47.
210. Lunn, G. and Sansone, E.B.; "Ethidium bromide: Destruction and decontamination of solutions". *Analytical Biochemistry*, 162:(2), **1987**, 453-458.
211. Hengen, P.N.; "Methods and reagents: Disposal of ethidium bromide". *Trends in Biochemical Sciences*, 19:(6), **1994**, 257-258.

212. Quillardet, P. and Hofnung, M.; "Ethidium bromide and safety - readers suggest alternative solutions". *Trends in Genetics*, 4:(4), **1988**, 89-90.
213. Zocher, R., Billich, A., Keller, U. and Messner, P.; "Destruction of ethidium bromide in solution by ozonolysis". *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 369:(10), **1988**, 1191-1194.
214. Lepecq, J.B. and Paoletti, C.; "A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: Physical--Chemical characterization". *Journal of Molecular Biology*, 27:(1), **1967**, 87-106.
215. Borisova, O.F., Shchiolkina, A.K., Karapetyan, A.T. and Surovaya, A.N.; "The heterogeneity of strong binding site of ethidium bromide on DNA. Fluorescent and non-fluorescent complexes". *Mol. Biology*, 32:(1), **1998**, 844-862.
216. Vardevanyan, P.O., Antonyan, A.P., Manukyan, G.A., Karapetyan, A.T., Shchyolkina, A.K. and Borisova, O.F.; "Ethidium bromide binding to native and denatured poly(dA)poly(dT)". *Molecular Biology*, 34:(2), **2000**, 272-276.
217. Guo, M., Chen, J., Liu, D., Nie, L. and Yao, S.; "Electrochemical characteristics of the immobilization of calf thymus DNA molecules on multi-walled carbon nanotubes". *Bioelectrochemistry*, 62:(1), **2004**, 29-35.
218. Qi, H., Li, X., Chen, P. and Zhang, C.; "Electrochemical detection of DNA hybridization based on polypyrrole/ss-DNA/multi-wall carbon nanotubes paste electrode". *Talanta*, 72:(3), **2007**, 1030-1035.
219. Vardevanyan, P.O., Antonyan, A.P., Parsadanyan, M.A., H.G., D. and A.T., K.; "The binding of ethidium bromide with DNA: interaction with single- and double-stranded structures". *Experimental and Molecular Medicine*, 35:(6), **2003**, 527-533.
220. Berg, H. and Eckardt, K.; "Interaction of anthracyclines and anthracyclones with DNA". *Zur Interaktion von Anthracyclinen und Anthracyclononen mit DN.*, 25:(4), **1970**, 362-367.
221. Tishchenko, E.I., Karapetian, A.T. and Borisova, O.F.; "Heterogeneous complexes of ethidium bromide and their role in the stabilization of the (dA)_n(dT)_n-structures". *Molekuliarnaia biologiya*, 30:(6), **1996**, 1370-1377.
222. Riccardi, C.S., Costa, P.I. and Yamanaka, H.; "Imunossensor amperométrico". *Química Nova*, 25:(2), **2002**, 316-320.
223. Skládal, P.; "Advances in electrochemical immunosensors". *Electroanalysis*, 9:(10), **1997**, 737-745.

224. Morgan, C., Newman, D. and Price, C.; "Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine". *Clinical Chemistry*, 42:(2), **1996**, 193-209.
225. Tan, Y., Chu, X., Shen, G.-L. and Yu, R.-Q.; "A signal-amplified electrochemical immunosensor for aflatoxin B1 determination in rice". *Analytical Biochemistry*, 387:(1), **2009**, 82-86.
226. Chen, H., Jiang, J.-H., Huang, Y., Deng, T., Li, J.-S., Shen, G.-L. and Yu, R.-Q.; "An electrochemical impedance immunosensor with signal amplification based on Au-colloid labeled antibody complex". *Sensors and Actuators B: Chemical*, 117:(1), **2006**, 211-218.
227. Yang, L., Li, Y. and Erf, G.F.; "Interdigitated Array Microelectrode-Based Electrochemical Impedance Immunosensor for Detection of Escherichia coli O157:H7". *Analytical Chemistry*, 76:(4), **2004**, 1107-1113.
228. Dijkema, M., Kamp, B., Hoogvliet, J.C. and van Bennekom, W.P.; "Development of an Electrochemical Immunosensor for Direct Detection of Interferon- γ at the Attomolar Level". *Analytical Chemistry*, 73:(5), **2001**, 901-907.
229. Ouerghi, O., Senillou, A., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Ben Ouada, H. and Cosnier, S.; "Gold electrode functionalized by electropolymerization of a cyano N-substituted pyrrole: application to an impedimetric immunosensor". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 501:(1-2), **2001**, 62-69.
230. Barsoukov, E. and MacDonald, J.R.; "Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment and Application". **2005**, 2nd ed. Wiley Interscience, New Jersey.
231. Mandal, R., Salam, M.S.A., Chakrabarti, C.L. and Back, M.H.; "An Electrochemical Investigation of Complexation of Pb(II) by a Well-Characterized Fulvic Acid in Model Systems - Effect of Competition with Major Cations and Trace Metals". *Electroanalysis*, 15:(10), **2003**, 903-906.
232. Daniels, J.S. and Pourmand, N.; "Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges". *Electroanalysis*, 19:(12), **2007**, 1239-1257.
233. Gu, H., Su, X. and Loh, K.P.; "Electrochemical Impedance Sensing of DNA Hybridization on Conducting Polymer Film-Modified Diamond". *The Journal of Physical Chemistry B*, 109:(28), **2005**, 13611-13618.
234. Prodromidis, M.I.; "Impedimetric immunosensors-A review". *Electrochimica Acta*, **2009**, In Press.

235. Manesse, M., Stambouli, V., Boukherroub, R. and Szunerits, S.; "Electrochemical impedance spectroscopy and surface plasmon resonance studies of DNA hybridization on gold/SiO_x interfaces". *The Analyst*, 133:(8), **2008**, 1097-1103.
236. Ionescu, R.E., Jaffrezic-Renault, N., Bouffier, L., Gondran, C., Cosnier, S., Pinacho, D.G., Marco, M.P., Sánchez-Baeza, F.J., Healy, T. and Martelet, C.; "Impedimetric immunosensor for the specific label free detection of ciprofloxacin antibiotic". *Biosensors and Bioelectronics*, 23:(4), **2007**, 549-555.
237. Armstrong, F.A. and Wilson, G.S.; "Recent developments in faradaic bioelectrochemistry". *Electrochimica Acta*, 45:(15-16), **2000**, 2623-2645.
238. Suni, I.I.; "Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27:(7), **2008**, 604-611.
239. Zhang, L., Liu, Y. and Chen, T.; "A mediatorless and label-free amperometric immunosensor for detection of h-IgG". *International Journal of Biological Macromolecules*, 43:(2), **2008**, 165-169.
240. Wang, R., Wang, Y., Lassiter, K., Li, Y., Hargis, B., Tung, S., Berghman, L. and Bottje, W.; "Interdigitated array microelectrode based impedance immunosensor for detection of avian influenza virus H5N1". *Talanta*, 79:(2), **2009**, 159-164.
241. Pei, R., Cheng, Z., Wang, E. and Yang, X.; "Amplification of antigen-antibody interactions based on biotin labeled protein-streptavidin network complex using impedance spectroscopy". *Biosensors and Bioelectronics*, 16:(6), **2001**, 355-361.
242. Hnaien, M., Diouani, M.F., Helali, S., Hafaid, I., Hassen, W.M., Renault, N.J., Ghrum, A. and Abdelghani, A.; "Immobilization of specific antibody on SAM functionalized gold electrode for rabies virus detection by electrochemical impedance spectroscopy". *Biochemical Engineering Journal*, 39:(3), **2008**, 443-449.
243. Valera, E., Ramón-Azcón, J., Rodríguez, Á., Castañer, L.M., Sánchez, F.J. and Marco, M.P.; "Impedimetric immunosensor for atrazine detection using interdigitated [mu]-electrodes (ID[mu]E's)". *Sensors and Actuators B: Chemical*, 125:(2), **2007**, 526-537.
244. Radi, A.-E., Muñoz-Berbel, X., Lates, V. and Marty, J.-L.; "Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of ochratoxin A". *Biosensors and Bioelectronics*, 24:(7), **2009**, 1888-1892.

245. Valera, E., Ramón-Azcón, J., Sanchez, F.J., Marco, M.P. and Rodríguez, Á.; "Conductimetric immunosensor for atrazine detection based on antibodies labelled with gold nanoparticles". *Sensors and Actuators B: Chemical*, 134:(1), **2008**, 95-103.
246. Gontijo, C.M.F. and Melo, M.N.; "Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro atual, desafios e perspectivas". *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7:(3), **2004**, 338-349.
247. Desjeux, P.; "The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95:(3), **2001**, 239-243.
248. World Health Organization. The world health report 2001. Vol. Geneva, 2001
Acesso em: 01/08/2009. Disponível em: <http://www.who.int/whr/2001/en/index.html>.
249. Dye, C. and Williams, B.G.; "Malnutrition, Age and the Risk of Parasitic Disease: Visceral Leishmaniasis Revisited". *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 254:(1339), **1993**, 33-39.
250. Dourado, Z.F., Silva, H.D., Silveira-Lacerda, E.P. and García-Zapata, M.T.A.; "Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rk39)". *Revista de Patologia Tropical*, 36:(3), **2007**, 205-214.
251. Loureiro, C.C.P., Dadalti, P., Gutierrez, M.C.G. and Ramos-e-Silva, M.; "Leishmaniose: Métodos diagnósticos". *Folha Médica*, 117:(2), **1998**, 131-134.
252. Gontijo, C.M.F. and Melo, M.N.; "Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro atual, desafios e perspectivas". *Rev Bras Epidemiol*, 7:(3), **2004**, 338-349.
253. Schallig, H.D.F.H. and Oskam, L.; "Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification". *Tropical Medicine and International Health*, 7:(8), **2002**, 641-651.
254. Sundar, S. and Rai, M.; "Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis". *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9:(5), **2002**, 951-958.
255. Mohammed, E.A.E.R., Wright, E.P., Rahman, A.M.A., Kolk, A., Laarman, J.J. and Pondman, K.W.; "Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA-immunofluorescence and indirect haemagglutination". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80:(2), **1986**, 271-274.

256. Burns Jr, J.M., Shreffler, W.G., Benson, D.R., Ghalib, H.W., Badaro, R. and Reed, S.G.; "Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90:(2), **1993**, 775-779.
257. Houghton, R.L., Petrescu, M., Benson, D.R., Skeiky, Y.A., Scalone, A., Badaró, R., Reed, S.G. and Gradoni, L.; "A Cloned Antigen (Recombinant K39) of *Leishmania chagasi* Diagnostic for Visceral Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Patients and a Prognostic Indicator for Monitoring Patients Undergoing Drug Therapy". *The Journal of Infectious Diseases*, 177:(5), **1998**, 1339-1344.
258. Reed, S.G., Shreffler, W.G., Burns Jr, J.M., Scott, J.M., Da Gloria Orge, M., Ghalib, H.W., Siddig, M. and Badaro, R.; "An improved serodiagnostic procedure for visceral leishmaniasis". *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 43:(6), **1990**, 632-639.
259. Nascimento, M.D.S.B., Souza, E.C., Silva, L.M., Leal, P.C., Cantanhede, K.L., Bezerra, G.F.B. and Viana, G.M.C.; "Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e intradermoreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil". *Cadernos de Saúde Pública*, 21:(6), **2005**, 1801-1807.
260. Sauerbrey, G.; "The use of quartz oscillators for weighing thin layers and for microweighing". *Zeitschrift fuer Physik*, 155:(1), **1959**, 206-222.
261. Johnstone, A.P. and Thorpe, P.; "Immunochemistry in practice". **1987**, Blackwell Science, p.318.
262. Bard, A.J. and Faulkner, L.R. *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*, (John Willey & Sons, Canada, 1980).
263. Benyoucef, A., Huerta, F., Ferrahi, M.I. and Morallon, E.; "Voltammetric and in situ FT-IRS study of the electropolymerization of o -aminobenzoic acid at gold and graphite carbon electrodes Influence of pH on the electrochemical behaviour of polymer films". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 624:(1-2), **2008**, 245-250.
264. Huang, W., Humphrey, B.D. and MacDiarmid, A.G.; "Polyaniline, a novel conducting polymer. Morphology and chemistry of its oxidation and reduction

- in aqueous electrolytes". *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, 82:(8), **1986**, 2385-2400.
265. Laviron, E., Roullier, L. and Degrand, C.; "A multilayer model for the study of space distributed redox modified electrode. Parte II: Theory and application of linear potencial sweep voltammetry for simple reaction". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 112:(1), **1986**, 11-23.
 266. Sur, U.K., Subramanian, R. and Lakshminarayanan, V.; "Cyclic voltammetric and electrochemical impedance studies on the structure, adsorption kinetics, and barrier properties of some organic dithiol self-assembled monolayers on gold". *Journal of Colloid and Interface Science*, 266:(1), **2003**, 175-182.
 267. Janek, R.P., Fawcett, W.R. and Ulman, A.; "Impedance Spectroscopy of Self-Assembled Monolayers on Au(111): Sodium Ferrocyanide Charge Transfer at Modified Electrodes". *Langmuir*, 14:(11), **1998**, 3011-3018.
 268. Protsailo, L.V. and Fawcett, W.R.; "Electrochemical Impedance Spectroscopy at Alkanethiol-Coated Gold in Propylene Carbonate". *Langmuir*, 18:(23), **2002**, 8933-8941.
 269. Steichen, M., Doneux, T. and Buess-Herman, C.; "On the adsorption of hexaammineruthenium (III) at anionic self-assembled monolayers". *Electrochimica Acta*, 53:(21), **2008**, 6202-6208.
 270. Beni, V., Valsesia, A., Colpo, P., Bretagnol, F., Rossi, F. and Arrigan, D.W.M.; "Electrochemical properties of polymeric nanopatterned electrodes". *Electrochemistry Communications*, 9:(7), **2007**, 1833-1839.
 271. Pinto, E.M., Gouveia-Caridade, C., Soares, D.M. and Brett, C.M.A.; "Electrochemical and surface characterisation of carbon-film-coated piezoelectric quartz crystals". *Applied Surface Science*, 255:(18), **2009**, 8084-8090.
 272. Zhi, Z.-l., Drazan, V., Wolfbeis, O.S. and Mirsky, V.M.; "Electrocatalytic activity of DNA on electrodes as an indication of hybridisation". *Bioelectrochemistry*, 68:(1), **2006**, 1-6.
 273. Oliveira, R.M.L., Vieira, S.N., Alves, H.C., França, E.G., Franco, D.L., Ferreira, L.F., Brito-Madurro, A.G. and Madurro, J.M.; "Electrochemical and morphological studies of an electroactive material derived from 3-hydroxyphenylacetic acid: a new matrix for oligonucleotide hybridization". *Journal of Materials Science*, **2009**, (Submetido).

274. Sonmez, G., Schottland, P. and Reynolds, J.R.; "PEDOT/PAMPS: An electrically conductive polymer composite with electrochromic and cation exchange properties". *Synthetic Metals*, 155:(1), **2005**, 130-137.
275. Ganesh, V., Pal, S.K., Kumar, S. and Lakshminarayanan, V.; "Self-assembled monolayers (SAMs) of alkoxycyanobiphenyl thiols on gold--A study of electron transfer reaction using cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy". *Journal of Colloid and Interface Science*, 296:(1), **2006**, 195-203.
276. Matyszewska, D. and Bilewicz, R.; "Voltammetric study of gold-supported lipid membranes in the presence of perfluorooctanesulphonic acid". *Bioelectrochemistry*, 76:(1-2), **2009**, 148-152.
277. Lange, N.A. *Lange's handbook of chemistry*, (McGraw-Hill, New York, 2005).
278. ZirChrom Separations, I. Dissociation Constants Of Organic Acids And Bases. in *Disponível em: <http://www.zirchrom.com/organic.htm>* (2006, Acesso: 02/07/2009).
279. Snook, G.A., Bond, A.M. and Fletcher, S.; "The use of massograms and voltammograms for distinguishing five basic combinations of charge transfer and mass transfer at electrode surfaces". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 526:(1-2), **2002**, 1-9.
280. Varela, H., Malta, M. and Torresi, R.M.; "Técnicas in situ de baixo custo em eletroquímica: a microbalança a cristal de quartzo". *Química Nova*, 23:(5), **2000**, 664-679.
281. Dai, H.-P., Wu, Q.-H., Sun, S.-G. and Shiu, K.-K.; "Electrochemical quartz crystal microbalance studies on the electropolymerization processes of ortho-phenylenediamine in sulfuric acid solutions". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 456:(1-2), **1998**, 47-59.
282. Rocha, F.R.P. and Teixeira, L.S.G.; "Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS". *Química Nova*, 27:(5), **2004**, 807-812.
283. Nakaema, M.K.K. and Sanches, R.; "Fluorometria no domínio da frequência". *Química Nova*, 22:(3), **1999**, 412-416.
284. Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, (Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999).
285. Gilbert, A. and Baggott, J. *Essentials of Molecular Photochemistry*, (Scientific Publications, Oxford, 1991).

286. Turro, N.J. *Modern Molecular Photochemistry*, (University Science Books, 1991).
287. Mackenzie, R.C.; "Nomenclature in thermal analysis, part IV". *Thermochimica Acta*, 28:(1), **1979**, 1-6.
288. Bernal, C., Couto, A.B., Breviglieri, S.T. and Cavaleiro, É.T.G.; "Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais - DSC". *Química Nova*, 25:(5), **2002**, 849-855.
289. Cavaleiro, E.T.G., Breviglieri, S.T., Marino, G. and Chierice, G.O.; "A Influência de Fatores Experimentais nos Resultados de Análises Termogravimétricas". *Química Nova*, 18:(3), **1995**, 305-308.
290. Wysoczanski, R. and Tani, K.; "Spectroscopic FTIR imaging of water species in silicic volcanic glasses and melt inclusions: An example from the Izu-Bonin arc". *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 156:(3-4), **2006**, 302-314.
291. Ayyagari, M.S., Marx, K.A., Tripathy, S.K., Akkara, J.A. and Kaplan, D.L.; "Controlled Free-Radical Polymerization of Phenol Derivatives by Enzyme-Catalyzed Reactions in Organic Solvents". *Macromolecules*, 28:(15), **1995**, 5192-5197.
292. Ikeda, R., Sugihara, J., Uyama, H. and Kobayashi, S.; "Enzymatic oxidative polymerization of 4-hydroxybenzoic acid derivatives to poly(phenylene oxide)s". *Polymer International*, 47:(3), **1998**, 295-301.
293. Ikeda, R., Tanaka, H., Uyama, H. and Kobayashi, S.; "A new crosslinkable polyphenol from a renewable resource". *Macromolecular Rapid Communications*, 21:(8), **2000**, 496-499.
294. Tlili, C., Korri-Yousoufi, H., Ponsonnet, L., Martelet, C. and Jaffrezic-Renault, N.J.; "Electrochemical impedance probing of DNA hybridisation on oligonucleotide-functionalised polypyrrole". *Talanta*, 68:(1), **2005**, 131-137.
295. Wang, J.; "SURVEY AND SUMMARY: From DNA biosensors to gene chips". *Nucl. Acids Res.*, 28:(16), **2000**, 3011-3016.
296. Peng, H., Soeller, C., Cannell, M.B., Bowmaker, G.A., Cooney, R.P. and Travas-Sejdic, J.; "Electrochemical detection of DNA hybridization amplified by nanoparticles". *Biosensors and Bioelectronics*, 21:(9), **2006**, 1727-1736.
297. La-Scalea, M.A., Serrano, S.H.P. and Gutz, I.G.R.; "DNA-modified electrodes: A new alternative for electroanalysis". *Química Nova*, 22:(3), **1999**, 417-424.

298. Palecek, E.; "From polarography of DNA to microanalysis with nucleic acid-modified electrodes". *Electroanalysis*, 8:(1), **1996**, 7-14.
299. Lodes, M.J., Suci, D., Wilmoth, J.L., Ross, M., Munro, S., Dix, K., Bernards, K., Stover, A.G., Quintana, M., Iihoshi, N., Lyon, W.J., Danley, D.L. and McShea, A.; "Identification of Upper Respiratory Tract Pathogens Using Electrochemical Detection on an Oligonucleotide Microarray". *PLoS ONE*, 2:(9), **2007**, e924.
300. Clarke, W.M. *Oxidation-Reduction Potential of Organic Systems*, (Waverley Press, Baltimore, 1960).
301. Clarke, W.M., Cohen, B. and Gibbs, H.D.; "Studies on oxidation-reduction. VIII. Methylene blue". *Public Health Reports*, 40:(1), **1925**, 1131–1201.
302. Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Shiraishi, H., Farias, P.A.M., Dontha, N. and Luo, D.; "Accumulation and trace measurements of phenothiazine drugs at DNA-modified electrodes". *Analytica Chimica Acta*, 332:(2-3), **1996**, 139-144.

Anexo 1: Curriculum Vitae

Lucas Franco Ferreira

188

FORMAÇÃO ACADÊMICA / TITULAÇÃO

- 2006 - 2009** Doutorado em Química.
Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlandia, Brasil
Título: Desenvolvimento de sistemas eletroquímicos miniaturizados para utilização como plataformas para imobilização de biomoléculas
Orientador: João Marcos Maduro
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2003 - 2005** Mestrado em Química.
Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlandia, Brasil
Título: Biossensor Amperométrico à Base de Tirosinase Aplicado na Determinação de Compostos Orgânicos em Amostras Ambientais, Ano de obtenção: 2005
Orientador: Yaico D Tanimoto de Albuquerque
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 1998 - 2002** Graduação em Licenciatura em Química.
Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlandia, Brasil
- 1998 - 2003** Graduação em Bacharelado em Química.
Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlandia, Brasil
Título: Desenvolvimento de Sensores Aplicados na Determinação de Compostos Fenólicos e Pesticidas Organofosforados e Carbamatos em alimentos e amostras ambientais
Orientador: Yaico D Tanimoto de Albuquerque
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. Goulart, L.R., Vieira, C.U., Freschi, A.P.P., Capparelli, F.E., Fujimura, P.T., Almeida, J.F., Ferreira, L.F., Goulart, I.M.B., Brito-Maduro, A.G. and Maduro, J.M.; "Biomarkers for serum diagnosis of infectious diseases and their potential application in novel sensor platforms". Critical Review in Immunology, (In Press), 2009.
2. Oliveira, R.M.L., Vieira, S.N., Alves, H.C., França, E.G., Franco, D.L., Ferreira, L.F., Brito-Maduro, A.G. and Maduro, J.M.; Electrochemical and morphological studies of an electroactive material derived from 3-hydroxyphenylacetic acid: a new matrix for oligonucleotide hybridization". Journal of Materials Science, 2009, (Aceito).
3. Silva, T. A. R., FERREIRA, L.F., SOUZA, L. M., GOULART FILHO, L.R., MADURRO, J. M., BRITO-MADURRO, A. G.
New approach to immobilization and specific-sequence detection of nucleic acids based on poly(4-hydroxyphenylacetic acid). Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems. , v.29, p.539 - 545, 2009.
4. DA SILVA, R.A.B., DE ALMEIDA, E.G.N., RABELO, A.C., DA SILVA, A.T.C., FERREIRA, L.F., RICHTER, E. M.
Three electrode electrochemical microfluidic cell: construction and characterization. Journal of the Brazilian Chemical Society. , v.20, p.1235-1241, 2009.
5. Franco, Diego L., Afonso, André S., Ferreira, Lucas F., Gonçalves, Rafael A., Boodts, Julien F.C., Brito-Maduro, Ana G., Maduro, João M.
Electrodes modified with polyaminophenols: Immobilization of purines and pyrimidines. Polymer Engineering and Science. , v.48, p.2043 - 2050, 2008.

6. Silva, Tatiana A.R., FERREIRA, L.F., Boodts, Julien F.C., Eiras, Sebastião P., Madurro, João M., Brito-Madurro, Ana G.
Poly(4-hydroxyphenylacetic acid): A new material for immobilization of biomolecules. *Polymer Engineering and Science.* , v.48, p.1963 - 1970, 2008.
7. FERREIRA, L.F., ALBUQUERQUE, Y. D. T.
Amperometric biosensing of carbamate and organophosphate pesticides utilizing screen-printed tyrosinase-modified electrodes. *Analytica Chimica Acta.* , v.596, p.210 - 221, 2007.
8. FRANCO, D. L., AFONSO, A. S., VIEIRA, S. N., FERREIRA, L.F., GONÇALVES, R. A., BRITO-MADURRO, A. G., MADURRO, J. M.
Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: Electric and morphologic properties. *Materials Chemistry and Physics.* , v.107, p.404 - 409, 2007.
9. FERREIRA, L.F., Boodts, J.F.C, BRITO-MADURRO, A. G., MADURRO, J. M.
Gold electrodes modified with poly(4-aminophenol): incorporation of nitrogenated bases and an oligonucleotide. *Polymer International.* , v.57, p.644 - 650, 2007.
10. MADURRO, A. G. B., FERREIRA, L.F., VIEIRA, S. N., GOULART FILHO, L., MADURRO, J. M.
Immobilization of purine bases on a poly-4-aminophenol matrix. *Journal of Materials Science.* , v.42, p.3238 - 3243, 2007.
11. VIEIRA, S. N., FERREIRA, L.F., FRANCO, D. L., AFONSO, A. S., GONÇALVES, R. A., MADURRO, A. G. B., MADURRO, J. M.
Electrochemical Modification of Graphite Electrodes with Poly(4-aminophenol). *Macromolecular Symposia.* , v.245-46, p.236 - 242, 2006.
12. MACHADO, A. E. H., MIRANDA, J. A., FREITAS, R. F. de, DUARTE, E.T. F. M., FERREIRA, L.F., ALBUQUERQUE, Y. D. T., RUGGIERO, R., SATTler, C., OLIVEIRA, L.
Destruction of the organic matter present in effluent from a cellulose and paper industry using photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology. A, Chemistry.* , v.155, p.231 - 241, 2003.

CITAÇÕES EM BASES BIBLIOGRÁFICAS

Web of Science	Número total de citações : 45; Número de trabalhos : 7 Data : 06/04/2009; Fator H: 4; Nome(s) do autor utilizado(s) na consulta para obter o total de citações: Ferreira LF
SCOPUS	Número total de citações : 66; Número de trabalhos : 9 Data : 06/04/2009 Nome do autor utilizado na consulta para obter o total de citações: Ferreira, Lucas F.

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS (COMPLETO)

1. FERREIRA, L.F., FRANCO, D. L., SOUZA, L. M., Boodts, J.F.C, MADURRO, J. M., BRITO-MADURRO, A. G.
Imobilização de sequência específica de ácidos nucleicos em matriz de poli(ácido 4-hidróxi-fenilacético), para detecção do vírus da dengue. In: XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2009, Fortaleza-CE.
Anais do XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica. , 2009.
2. FERREIRA, L.F., FRANCO, D. L., SOUZA, L. M., Boodts, J.F.C, BRITO-MADURRO, A. G., MADURRO, J. M.
Plataformas de poli(ácido 4-hidróxi-benzóico) para imobilização e hibridação de oligonucleotídeos In: XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2009, Fortaleza-CE.
Anais do XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica. , 2009.

3. FERREIRA, L.F., ALBUQUERQUE, Y. D. T.
Caracterização do processo de inibição da tirosinase pelos pesticidas metil paration, carbaril, carbofuram e diazinon In: XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2007, Águas de Lindóia-SP.
Anais do XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica. , 2007.
4. VIEIRA, S. N., FERREIRA, L.F., MADURRO, A. G. B., MADURRO, J. M.
Detecção de Biomoléculas em Superfície de Pasta de Carbono In: I Encontro de Química do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, 2006, Uberlândia.
Anais do I Encontro de Química do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. Uberlândia: Compose, 2006. p.198 - 200
5. FERREIRA, L.F., MADURRO, A. G. B., MADURRO, J. M.
Eletrodos de Grafite Modificados com Poli(4-aminofenol): Estudo Eletroquímico e Incorporação de Oligonucleotídeo In: I Encontro de Química do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, 2006, Uberlândia.
Anais do I Encontro de Química do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. Uberlândia: Compose, 2006. p.177 - 179
6. FERREIRA, L.F., ALBUQUERQUE, Y. D. T.
Determinação de Organofosforados e Carbamatos empregando biossensor à base de Tirosinase In: XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - SIBEE, 2005, Londrina.
Resumos do XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica. Londrina: Moirá, 2005. p.630 - 632
7. MADURRO, A. G. B., FERREIRA, L.F., VIEIRA, S. N., MADURRO, J. M.
Imobilização de Bases Purínicas em Matriz de poli(aminofenol) In: XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - SIBEE, 2005, Londrina.
Resumos do XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - SIBEE. Londrina: Moirá, 2005. p.1059 - 1061
8. FERREIRA, L.F., ALBUQUERQUE, Y. D. T.
Avaliação da resposta de um biossensor amperométrico à base de tirosinase e eletrodo de carbono modificado In: SIBEE - Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2004, Teresópolis - RJ.
XIV - Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica. , 2004. p.BIO02 -
9. FERREIRA, L.F., ALBUQUERQUE, Y. D. T.
Biossensor Amperométrico a base de Tirosinase na Determinação de Pesticidas Organofosforados e Carbamatos. In: III Mostra de Pós-Graduação e II Jornada Científica de Química, 2004, Uberlândia - MG.
CD de Resumos - III Mostra de Pós-Graduação e II Jornada Científica de Química. , 2004.
10. FERREIRA, L.F., ALBUQUERQUE, Y. D. T.
Caracterização de Biossensores à Base de Tirosinase na Determinação de Pesticidas In: II Mostra de Pós-Graduação em Química, 2003, Uberlândia.
CD de Resumos da II Mostra de Pós Graduação em Química. , 2003.
11. FERREIRA, L.F., ALBUQUERQUE, Y. D. T.
Avaliação de eletrodos de Carbono modificados com ftalocianina de Co(II) na determinação de compostos fenólicos In: XIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - SIBEE, 2002, Araraquara.
Anais do XIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica. Araraquara: Unesp, 2002. p.223 - 225

1. FRANCO, D. L., FERREIRA, L.F., Felipe, A.C., SOUZA, L. M., BRITO-MADURRO, A. G., MADURRO, J. M.
Interfacial studies of materials derived from 4-anisidine using electrochemical quartz crystal microbalance In: IV International Symposium on Advanced Materials and Nanostructures, 2009, Santo André-SP.
Anais do IV International Symposium on Advanced Materials and Nanostructures. , 2009.
2. FERREIRA, L.F., SOUZA, L. M., DA SILVA, L. G., RUGGIERO, R., BRITO-MADURRO, A. G., MADURRO, J. M.
Eletrosíntese e caracterização espectroscópica (UV-Vis e fluorescência) de um polímero derivado do ácido 4-hidroxibenzóico In: 48º Congresso Brasileiro de Química - CBQ, 2008, Rio de Janeiro-RJ.
Anais do 48º Congresso Brasileiro de Química. , 2008.
3. PEREIRA, M. C., DA SILVA, L. G., VIEIRA, S. N., FERREIRA, L.F., BRITO-MADURRO, A. G., RUGGIERO, R., MADURRO, J. M.
Estudo Fotofísico de poli(2-aminofenol) - QM-33 In: XXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Belo Horizonte-MG.
Anais do XXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química. , 2008. p.QM-33
4. PEREIRA, M. C., DA SILVA, L. G., VIEIRA, S. N., FERREIRA, L. F., FRANCO, D. L., BRITO-MADURRO, A. G., RUGGIERO, R., MADURRO, J. M.
Estudos de algumas propriedades espectroscópicas do filme derivado de 2-aminofenol In: 48º Congresso Brasileiro de Química - CBQ, 2008, Rio de Janeiro-RJ.
Anais do 48º Congresso Brasileiro de Química. , 2008.
5. SOUZA, L. M., MADURRO, J. M., BRITO-MADURRO, A. G., FERREIRA, L.F.
Investigação da estabilidade eletroquímica de eletrodos modificados com filmes poliméricos derivados do ácido 4-hidroxibenzóico In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia.
Livro de Resumos da 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2008.
6. FERREIRA, L.F., SOUZA, L. M., DA SILVA, L. G., RUGGIERO, R., BRITO-MADURRO, A. G., MADURRO, J. M.
Optical properties of polymeric films derivate of 4-hydroxybenzoic acid In: VII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais - VII SBPMat, 2008, Guarujá-SP.
Anais do VII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais. , 2008. p.G646 -
7. FERREIRA, L.F., SOUZA, L. M., ASSUNCAO, R. M. N., BARUD, H. S., MEIRELES, C. S., BRITO-MADURRO, A. G., MADURRO, J. M.
Thermal behavior and degradation of polymer derivate from 4-hydroxybenzoic acid In: VII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais - VII SBPMat, 2008, Guarujá-SP.
Anais do VII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais. , 2008. p.G959
8. FRANCO, D. L., FERREIRA, L.F., MADURRO, J. M., BRITO-MADURRO, A. G.
Electropolymerization of aminophenols on Au(111) and Au polycrystalline electrodes In: Polychar15 - World Forum on Advanced Materials, 2007, Búzios
Polychar15 - Book of Abstracts. Rio de Janeiro - RJ: In-Fólio Produção Editorial, Gráfica e Programação visual, 2007. v.PP81. p.166 - 166
9. Silva, T. A. R., FERREIRA, L.F., MADURRO, J. M., BRITO-MADURRO, A. G.
Estudo de biomoléculas incorporadas em matriz de poli(4-hidroxi-fenil-acético) por espectroscopia de impedância eletroquímica In: XXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química - MG, 2007, Uberlândia-MG.
Anais do XXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química - MG. , 2007. p.QM-17 -

10. SOUZA, L. M., FERREIRA, L.F., GONÇALVES, R. A., MADURRO, J. M., BRITO-MADURRO, A. G.
Formation of novel polymeric films derived from 4-hydroxybenzoic acid In: VI Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais - VI SBMat, 2007, Natal-RN.
Anais of VI Encontro da SBPMat. , 2007. p.A577 -
11. SOUZA, L. M., FERREIRA, L.F., BRITO-MADURRO, A. G., MADURRO, J. M.
Investigação de polímeros derivados do ácido 4-hidroxibenzoico por espectroscopia de impedância eletroquímica In: XXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química - MG, 2007, Uberlândia-MG.
Anais do XXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química - MG. , 2007. p.QM-24 -
12. FRANCO, D. L., AFONSO, A. S., FERREIRA, L.F., GOULART FILHO, L.R., BRITO-MADURRO, A. G., MADURRO, J. M.
Matrix of poly 3-aminophenol: electrochemical detection of prostate cancer gene In: 2nd International Symposium on Advanced Materials and Nanostructures, 2007, São Carlos.
2nd International Symposium on Advanced Materials and Nanostructures - Book of Abstracts. , 2007. p.88 -
13. Silva, T. A. R., FERREIRA, L.F., MADURRO, J. M., BRITO-MADURRO, A. G.
Poly(4-hydroxyphenylacetic acid): a new material to immobilization of biomolecules In: Polychar15 - World Forum on Advanced Materials, 2007, Búzios.
Polychar15 - Book of Abstracts. Rio de Janeiro - RJ: In-Fólio Produção Editorial, Gráfica e Programação visual, 2007. v.PP114. p.167 -
14. FERREIRA, L.F., VIEIRA, S. N., MADURRO, A. G. B., MADURRO, J. M.
Adsorção de oligonucleotídeos em eletrodos modificados com poli(4-aminofenol) In: XVII Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica - SIBAE, 2006, La Plata.
Anais do XVII Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica - XVII SIBAE. , 2006. p.425 -
15. FERREIRA, L.F., MADURRO, A. G. B., MADURRO, J. M.
Adsorption of Adenine and Guanine in Au(111) Electrodes Modified with Films of Poly(4-Aminophenol) In: 10th International Symposium on Polymer Electrolytes, 2006, Foz do Iguaçu.
Proceedings of 10th International Symposium on Polymer Electrolytes. , 2006.
16. VIEIRA, S. N., FERREIRA, L.F., FRANCO, D. L., AFONSO, A. S., GONÇALVES, R. A., MADURRO, A. G. B., MADURRO, J. M.
Electrochemical Modification of Graphite Electrodes with poly(4-aminophenol) In: World Polymer Congress - 41st International Symposium on Macromolecules, 2006, Rio de Janeiro.
Proceedings of World Polymer Congress - 41st International Symposium on Macromolecules. , 2006. p.168 - 169
17. FRANCO, D. L., FERREIRA, L.F., MADURRO, A. G. B., MADURRO, J. M.
Eletrodos de Au(111) modificados com filmes derivados de aminofenóis em diferentes pHs In: XX Encontro Regional da SBQ-MG, 2006, São João del-Rei.
Anais do XX Encontro Regional da SBQ-MG. , 2006.
18. FRANCO, D. L., FERREIRA, L.F., MADURRO, A. G. B., MADURRO, J. M.
Estudo da eletropolimerização de 3-aminofenol em diferentes eletrodos de trabalho In: XX Encontro Regional da SBQ-MG, 2006, São João del-Rei.
Anais do XX Encontro Regional da SBQ-MG. , 2006.
19. FERREIRA, L.F., RICHTER, E. M., MADURRO, A. G. B., MADURRO, J. M.
Estudo voltamétrico em eletrodos de ouro modificados com poli (p-aminofenol) In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia - SP.

20. RODRIGUES, B., FERREIRA, L.F., SILVA, S. G, FRANCO, D. V., MIRANDA, J. A., MACHADO, A. E. H., SATTTLER, C., OLIVEIRA, L.
Degradação fotocatalítica de um modelo de efluente contendo 2-clorofenol, empregando associação entre TiO_2 e um fotosensibilizador In: XXVI Congresso Latino Americano de Química e 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Salvador.
Livro de Resumos do XXVI Congresso Latino Americano de Química e 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química , 2004.
21. FERREIRA, L.F., SAFATLE, P. C. C., ALBUQUERQUE, Y. D. T.
Determinação dos parâmetros cinéticos de um biossensor à base da enzima tirosinase In: XVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Lavras.
CD de Resumos do XVIII Encontro Regional da SBQ , 2004. p.FQ-16 -
22. SAFATLE, P. C. C., FERREIRA, L.F., ALBUQUERQUE, Y. D. T.
Otimização de um transdutor amperométrico para preparação de um biossensor à base da enzima tirosinase In: XVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Lavras.
CD de resumos do XVIII Encontro Regional da SBQ , 2004. p.QA-25 -
23. FERREIRA, L.F., ALBUQUERQUE, Y. D. T.
Avaliação de Biossensores à Base de Tirosinase e Eletrodos Modificados com Ftalocianina de Co(II) In: 12º Encontro Nacional de Química, 2003, São Luís-MA.
Química Analítica Moderna: Uma contribuição para a química limpa , 2003. p.SR014 -
24. FERREIRA, L.F., ALBUQUERQUE, Y. D. T.
Determinação de Compostos Fenólicos Utilizando Eletrodo Compósito de Grafite - Ftalocianina de Co(II) In: XLIII Congresso Brasileiro de Química, 2003, Ouro Preto-MG.
Livro de Resumos do XLIII Congresso Brasileiro de Química. Ouro Preto: Segrac, 2003. p.79 -
25. FERREIRA, L.F., TEIXEIRA Jr., J. G., ALBUQUERQUE, Y. D. T.
Demanda Química de Oxigênio usando digestão em micro escala e titulação coulométrica de Cr (VI) In: 24º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2001, Poços de Caldas.
Livro de Resumos da 24º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Ipiranga-SP: Copy Service, 2001. p.EQ-48 -
26. TEIXEIRA Jr., J. G., FERREIRA, L.F., ALBUQUERQUE, Y. D. T.
Determinação da Demanda Química de Oxigênio utilizando Detecção espectrofotométrica do Cr(VI) e 1-5 Difenilcarbazida In: XV Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2001, Belo Horizonte.
Livro de Resumos do XV Encontro Regional da SBQ - MG , 2001. p.AB-84 -
27. MACHADO, A. E. H., DUARTE, E.T. F. M., ALBUQUERQUE, Y. D. T., FERREIRA, L.F., MIRANDA, J. A., RUGGIERO, R., SATTTLER, C., OLIVEIRA, L.
Estudo da Degradação do Efluente de uma Indústria de Papel e Celulose, induzida por fotocatalise mediada por dióxido de Titânio In: 1º Encontro sobre Aplicações Ambientais de Processos Oxidativos Avançados, 2001, Águas de São Pedro.
Livro de Resumos do 1º Encontro sobre Aplicações Ambientais de Processos Oxidativos

ORIENTAÇÕES E SUPERVISÕES

Iniciação científica

1. Letícia Maria de Souza. **Incorporação de Bases Nitrogenadas em Eletrodos Modificados com poli(ácido 4-hidroxibenzóico)**. 2006. Iniciação científica (Bacharelado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia

1. Talanta (Oxford) -

Vínculo: 2008 - Atual Regime: Parcial

2. Analytica Chimica Acta -

Vínculo: 2006 - Atual Regime: Parcial

3. Journal of Applied Electrochemistry

Vínculo: 2009 - Atual Regime: Parcial

BANCAS / PARTICIPAÇÃO EM BANCA DE TRABALHOS DE CONCLUSÃO

Graduação

1. FERREIRA, L.F., MARTINS, D. E. A.,
Participação em banca de Joyce Aparecida Tavares de Miranda. **Determinação do teor de proteínas totais extraídas da variedade de abacaxi da Smooth Cayenne, cultivados na região do triângulo mineiro**, 2008
(Farmácia) Centro Universitário do Triângulo
Referências adicionais : Brasil/Português.
2. FERREIRA, L.F., MARTINS, D. E. A.
Participação em banca de Ariely Alves Faria e Layla Chamone Barbosa. **Determinação de ferro em amostras de sulfato ferroso por titulometria**, 2008
(Farmácia) Centro Universitário do Triângulo
3. FERREIRA, L.F., MARTINS, D. E. A.
Participação em banca de Mayana Camargo de Araújo e Regiane Constantino. **Doseamento de cálcio em medicamentos manipulados preventivos de osteoporose**, 2008
(Farmácia) Centro Universitário do Triângulo
4. FERREIRA, L.F., MARTINS, D. E. A.
Participação em banca de Jardel F.S. de Souza, Michelly M. da Silva Natália B. Souza. **Doseamento de cápsulas de Paracetamol manipuladas**, 2008
(Farmácia) Centro Universitário do Triângulo
5. FERREIRA, L.F., MARTINS, D. E. A.
Participação em banca de Sandra Livia. **Avaliação da qualidade de óleos vegetais submetidos ao processo de frituras**, 2006
(Farmácia) Centro Universitário do Triângulo
6. FERREIRA, L.F., MARTINS, D. E. A.
Participação em banca de Thatyana Rocha Abraão. **Determinação de ácido acetilsalicílico em amostras de fármacos**, 2006
(Farmácia) Centro Universitário do Triângulo
7. FERREIRA, L.F., MARTINS, D. E. A.
Participação em banca de Flávia Ávila Souza. **Determinação de ácido ascórbico em amostras de fármacos**, 2006
(Farmácia) Centro Universitário do Triângulo

Palestras / Cursos Ministrados

1. **Sensores Biológicos: desenvolvimento e aplicações**, 2008. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
2. **Utilização de matrizes poliméricas na construção de sensores eletroquímicos para detecção de doenças parasitárias e infecto-contagiosas**, 2008. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
3. **Nanotecnologia Aplicada a Sensores**, 2007. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
4. **Soluções e Diluições**, 2006. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
5. **Polímeros - Imitando a natureza**, 2005. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Softwares sem registro ou patente

1. FERREIRA, L.F.
1º Congresso de Ética em Pesquisa da UFU, 2006

Desenvolvimento de WebSites

1. **Site: I Simpósio Nacional de Nanotecnologia e Nanomedicina** - <http://www.eventos.iqfu.ufu.br/2007/nano/>, 2007. (Outra produção técnica)
2. **Site: XXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química - MG** - <http://www.eventos.iqfu.ufu.br/2007/xxisbq/>, 2007. (Outra produção técnica)
3. **Site do evento: Química e Mercado de Trabalho - I Encontro de Química do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba/IV Mostra de Pós-Graduação e III Jornada Científica de Química** - <http://www.eventos.iqfu.ufu.br/2006/>, 2006. (Outra produção técnica)
4. **Site Empresa NANOBRAX** - <http://www.nanobrax.com>, 2006. (Outra produção técnica)
5. **Site: Instituto de Química - UFU** - <http://www.iqfu.ufu.br/>, 2006. (Outra produção técnica)
6. **Site: I Workshop de Pós-Graduação em Química** - <http://www.eventos.iqfu.ufu.br/2005/>, 2005. (Outra produção técnica)
7. **Site: Programa de Pós-Graduação em Química da UFU** - <http://www.cpgquimica.iqfu.ufu.br/>, 2005. (Outra produção técnica)
8. **Site: A Pesquisa na Formação do Químico - III Mostra de Pós-graduação e II Jornada Científica de Química** - <http://www.eventos.iqfu.ufu.br/2004/>, 2004. (Outra produção técnica)

EVENTOS - PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

1. **XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, 2009. (Simpósio)
2. **VII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais - VII SBPMat**, 2008. (Congresso)
3. **Polychar15 - World Forum on Advanced Materials**, 2007. (Congresso)
4. **VI Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais - VI SBPMat**, 2007. (Congresso)

5. **XXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química - MG**, 2007. (Congresso)
6. **I Simpósio Nacional de Nanomedicina e Nanotecnologia – NanoMed**, 2007 (Simpósio)
7. **10th Symposium on Polymer Electrolytes - ISPE**, 2006. (Congresso)
8. **Química e Mercado de Trabalho**, 2006. (Encontro)
9. **29º Reunial Anual da Sociedade Brasileira de Química: Química é Energia: transforma a vida e preserva o ambiente**, 2006. (Congresso)
10. **1º Escola de Eletroquímica**, 2006. (Outra)
11. **XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, 2005. (Congresso)
12. **III Mostra de Pós-Graduação e II Jornada Científica de Química**, 2004. (Encontro)
13. **XIVSimpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, 2004. (Simpósio)
14. **XVIII Encontro da Sociedade Brasileira de Química**, 2004. (Encontro)
15. **II Mostra de Pós-Graduação: O que é Ciencia?**, 2003. (Encontro)
16. **XLIII Congresso Brasileiro de Química**, 2003. (Congresso)
17. **12º Encontro Nacional de Química Analítica**, 2003. (Congresso)
18. **I Ciclo de Palestras da Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia**, 2002. (Encontro)
19. **I Mostra de Pós-Graduação**, 2002. (Encontro)
20. **XIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - SIBEE**, 2002. (Simpósio)
21. **24º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - A Química na América Latina**, 2001. (Congresso)
22. **XIV Encontro Regional da SBQ - Química: da Educação a Aplicação em Minas Gerais**, 2000. (Encontro)
23. **1º Jornada Científica de Química**, 1999. (Encontro)

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Cursos de Curta Duração

2008 - 2008	Curso de curta duração Potenciostato/Galvanostato Modelo PGSTAT 302N com Módulo de Impedância FRA Metrohm / Pensalab, Brasil
2007 - 2007	Curso de curta duração em Determination of polymer structures by light, nêutron and x-ray scattering Instituto de Macromoléculas Professora Eloísa Mano - UFRJ, IMA/UFRJ, Brasil
2007 - 2007	Curso de curta duração em Liquid Chromatography. Instituto de Macromoléculas Professora Eloísa Mano - UFRJ, IMA/UFRJ, Brasil

2007 - 2007	Curso de curta duração em Inorganic Polymers. Instituto de Macromoléculas Professora Eloísa Mano - UFRJ, IMA/UFRJ, Brasil
2007 - 2007	Curso de curta duração em Electron microscopy of polymers. Instituto de Macromoléculas Professora Eloísa Mano - UFRJ, IMA/UFRJ, Brasil
2007 - 2007	Curso de curta duração em Viscoelasticity and dynamic mechanical testing. Instituto de Macromoléculas Professora Eloísa Mano - UFRJ, IMA/UFRJ, Brasil
2007 - 2007	Curso de curta duração em Análise eletroquímica do domínio da frequência em eletrodos sólidos: aspectos teóricos e práticos Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlandia, Brasil
2007 - 2007	Curso de curta duração em Integrated Rheology / Thermal Analyses. Instituto de Macromoléculas Professora Eloísa Mano - UFRJ, IMA/UFRJ, Brasil
2007 - 2007	Curso de curta duração em Tribology. Instituto de Macromoléculas Professora Eloísa Mano - UFRJ, IMA/UFRJ, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em Experimentação no Ensino de Química. Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlandia, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Atividade Biológica de Drogas Orgânica. Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Riscos Químicos. Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlandia, Brasil
2003 - 2003	Curso de curta duração em Análise de Resíduos de Pesticidas. Universidade Federal de Ouro Preto, UFOP, Ouro Preto, Brasil
2003 - 2003	Curso de curta duração em Desinfecção Química. Universidade Federal de Ouro Preto, UFOP, Ouro Preto, Brasil
2003 - 2003	Curso de curta duração em Programa de Qualidade em Laboratório de Pesquisa. Universidade Federal do Maranhão, UFMA, Sao Luis, Brasil
2001 - 2001	Curso de curta duração em Iniciação ao Desenvolvimento Sustentável. Fundação Estadual do Meio Ambiente, FEAM, Belo Horizonte, Brasil
2001 - 2001	Curso de curta duração em Introdução a Química Forense. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
2000 - 2000	Curso de curta duração em Quimiometria. Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlandia, Brasil
1999 - 1999	Curso de curta duração em Educação Ambiental Em Química. Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlandia, Brasil

Monitorias

2002 - 2003	Extensão universitária em Monitoria Disciplina Química Analítica Qualitativa. Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlandia, Brasil
--------------------	--

ORGANIZAÇÃO DE EVENTO

1. FERREIRA, L.F., BRITO-MADURRO, A. G., MADURRO, J. M., GOULART FILHO, L., VIEIRA, S. N., CASTRO, C. M., FRESCHI, A. P. P., CAPPARELLI, F. E., FARIA, P. C. B. I
Simpósio Nacional de Nanotecnologia e Nanomedicina, 2007. (Congresso, Organização de evento)
2. FERREIRA, L.F., EIRAS, S. P., BENTO, M. L., MORAIS, S. L., RICHTER, E. M., TERRONES, M. E. G., AQUINO, F. J. T.
XXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química - MG, 2007. (Congresso, Organização de evento)
3. FERREIRA, L.F., EIRAS, S. P., RICHTER, E. M., TERRONES, M. E. G., MORAIS, S. L., BENTO, M. L.
Química e Mercado de Trabalho - I Encontro de Química do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba - IV Mostra de Pós-Graduação em Química - III Jornada Científica de Química, 2006. (Congresso, Organização de evento)
4. 4. FERREIRA, L.F., CRISTOVAN, F. H., FRANCA, E. F., XAVIER, T. P., SEVERINO, D., PAVANIN, L. A., EIRAS, S. P., CAVALCANTI, R. S., JORGE, F. A. S.
III Mostra de Pós-Graduação e II Jornada Científica de Química, 2004. (Congresso, Organização de evento)
5. 5. FERREIRA, L.F., SEVERINO, D., EIRAS, S. P., FRANCA, E. F., CRISTOVAN, F. H., PAVANIN, L. A., XAVIER, T. P.
O que é Ciência - II Mostra de Pós-Graduação em Química, 2003. (Congresso, Organização de evento)

TRABALHOS – ESTÁGIO OU INICIAÇÃO CIENTÍFICA VOLUNTÁRIA

1. FERREIRA, L.F., MACHADO, A. E. H.
Avaliação do processo de fotodegradação da matéria orgânica de efluentes líquidos de uma indústria de papel e celulose, empregando radiação UV e TiO₂ como fotocatalizador, 2000.
2. FERREIRA, L.F., ALBUQUERQUE, Y. D. T.
Investigação do processo de tratamento de efluente líquido produzido da degradação do lixo urbano por oxidação fotocatalítica heterogênea, 2000.

LINHAS DE PESQUISA

1. Desenvolvimento de sistemas eletroquímicos miniaturizados para utilização como plataformas para imobilização de biomoléculas
Objetivos: Desenvolvimento de sistemas eletroquímicos miniaturizados, baseados na tecnologia de screen-printed, utilizados como plataformas de imobilização de biomoléculas para desenvolvimento de biossensores aplicados no diagnóstico de doenças parasitárias e infecciosas
2. Desenvolvimento de Tecnologias Moleculares com Aplicações Diagnósticas em Imunohematologia Humana
Objetivos: Desenvolvimento de sensores biológicos a partir da deposição de filmes poliméricos em materiais condutores, para a imobilização de biomoléculas, tais como fragmentos de DNA, enzimas, anticorpos e tecidos biológicos para a detecção de doenças infecciosas e genéticas.

OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES

2009	Aprovado no concurso publico para cargo professor Assistente I, na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM.
2006 – 2008	Representante discente junto ao Conselho do Instituto de Química - UFU, no período de Setembro/2006 a Setembro/2008.

199

TOTAIS DE PRODUÇÃO

Produção bibliográfica

Artigos completos publicado em periódico.....	12
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	38

Produção Técnica

Softwares (multimídia).....	1
Curso de curta duração ministrado (extensão).....	4
Curso de curta duração ministrado (outro).....	1
Outra produção técnica.....	8

Orientações

Orientação em andamento (iniciação científica).....	1
---	---

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	10
Participações em eventos (simpósio).....	3
Participações em eventos (encontro).....	8
Participações em eventos (outra).....	1
Organização de evento (congresso).....	5
Participação em banca de trabalhos de conclusão (graduação).....	6

Demais trabalhos relevantes

Demais trabalhos relevantes.....	2
----------------------------------	---