

Universidade Federal de Uberlândia

Programa de Mestrado em Química

Instituto de Química

Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia LAFIP-NANOTEC



Pâmela Oliveira Martins

***SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO
POLI(ÁCIDO 3-HIDROXIFENILACÉTICO) NO
DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR PARA
DETECÇÃO DE MARCADOR CARDÍACO***

UBERLÂNDIA

2011

Pâmela Oliveira Martins

***SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO
POLI(ÁCIDO 3-HIDROXIFENILACÉTICO) NO
DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR PARA
DETECÇÃO DE MARCADOR CARDÍACO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à obtenção do título de mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Graci Brito Madurro

UBERLÂNDIA

2011



ALUNO(A): PÂMELA OLIVEIRA MARTINS

NÚMERO DE MATRÍCULA: 100305

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

***“Desenvolvimento de biossensor para detecção de
marcador cardíaco sobre plataforma de poli(ácido 3-
hidroxifenilacético)”***

ORIENTADOR(A):

PROF. DR. JOÃO MARCOS MADURRO

A Dissertação foi **APROVADA** em apresentação pública realizada no Auditório D do Bloco 5O, no Campus Santa Mônica, no dia 25 de fevereiro de 2011, às 9h00 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

Prof. Dr. João Marcos Madurro
(IQUFU)

Prof^a Dra. Sheila Cristina Canobre
(IQUFU)

Prof. Dr. Arnaldo César Pereira
(UFSJ)

ASSINATURA:

Uberlândia, 25 de fevereiro de 2011.

Dedico este trabalho a minha amada avó Iracema que hoje se encontra na presença de Deus, mas, enquanto eu pude desfrutar do seu convívio aqui na Terra, aprendi coisas que levarei para toda vida. Obrigada vovó, te amo muito; mesmo não estando pertinho da senhora, a sua luz e bondade ficaram gravadas em mim para sempre e tudo de bom que passamos juntas jamais será esquecido...

Agradecimentos

- ❖ Agradeço a Deus em primeiro lugar, pois se não fosse por Sua vontade, esse trabalho não teria se concretizado; todos os dias ELE me deu forças e persistência para nunca desistir.
- ❖ Aos meus pais, Luiz Antônio e Aparecida, pois tudo que sou e conquistei devo a eles. Por todas as lições e ensinamentos; todo amor e cuidado que sempre tiveram comigo, por me ensinarem a ser uma mulher de bem e honesta. Obrigada pai e mãe, sei que vocês abdicaram de alguns de seus sonhos para que os meus fossem realizados.
- ❖ A minha família que sempre esteve ao meu lado incondicionalmente; minhas tias, tios, meus avós, primos, meu padrinho e madrinha; sempre com muita paciência, apoio e amor. Agradeço a Deus todos os dias por desfrutar dessa convivência maravilhosa.
- ❖ Ao meu namorado Miquéias que é o meu esteio, meu porto-seguro, meu colega de trabalho, meu parceiro para todos os desafios. O seu amor, sua amizade e carinho me fazem querer sempre ser melhor. Muito deste trabalho eu devo a você.
- ❖ Aos meus inestimáveis colegas de grupo: Lara, Deusmaque, Lucas Ferreira, Lucas Franco, Ana Cristina, Erick, Héden, Sabrina, Alex Ander, Larissa, Natália e Luciano; por todos os momentos maravilhosos que passamos juntos, por toda experiência, dificuldades e aprendizados que a nossa convivência nos permitiu compartilhar. Em especial, agradeço a Ana Consuelo que foi minha amiga e parceira em momentos muito difíceis da minha vida e ao Diego, por toda paciência, humor, alegria e todo conhecimento compartilhado. Obrigada a todos os membros do LAFIP-NANOTEC que contribuíram imensamente para o meu crescimento profissional e principalmente como ser humano.

- ❖ Ao meu orientador Prof. João Marcos Madurro, pela oportunidade concedida de fazer parte do Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia, e, principalmente, por acreditar em meu potencial.
- ❖ A minha co-orientadora Profa. Ana Graci Britto-Madurro pelos valiosos conselhos, sugestões e ensinamentos.
- ❖ A Coordenação de Pós-Graduação em Química, em especial a Mayta, por todo apoio e suporte oferecido nesses 2 anos de curso.
- ❖ Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia.
- ❖ A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.
- ❖ Aos membros da banca que aceitaram cordialmente participar e contribuir para o aprimoramento deste trabalho.

A todos vocês e tantos outros que de alguma forma participaram da realização deste trabalho, o meu Muito Obrigada!

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”

Martin Luther King

Resumo

Martins, P.O., “*Síntese, caracterização e aplicação do poli(ácido 3-hidroxifenilacético) no desenvolvimento de biossensor para detecção de marcador cardíaco.*” Dissertação de Mestrado, Instituto de Química – UFU, 2011.

Neste trabalho foram realizados estudos de caracterização de um novo material, o poli(ácido 3-hidroxifenilacético) e sua aplicação para construção de um imunossensor amperométrico para detecção do Infarto Agudo do Miocárdio (IAM). Inicialmente, foi realizada a eletropolimerização do ácido 3-hidroxifenilacético em três pH's diferentes (0,0; 6,5 e 12,0) onde foi possível avaliar, eletroquimicamente, a relação entre o comportamento do polímero formado e o pH do meio reacional. Foi possível constatar que em meio ácido (pH 0,0) a formação do material eletroquimicamente ativo é mais evidenciada. Além disso, com o auxílio de técnicas eletroquímicas, foram realizadas investigações sobre a estrutura do material polimérico formado, utilizando sondas catiônicas e aniônicas. Monômero e polímero foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de Infravermelho (FTIR), Ultra-Violeta (UV/Vis.) e Fluorescência; análises térmicas (TGA e DTA) e análises estruturais (DRX). Estes estudos foram de extrema importância para destacar as principais diferenças entre o monômero e o material eletropolimerizado e, principalmente, avaliar as principais características do polímero, no sentido de viabilizar a sua utilização como plataforma do imunossensor proposto. Os estudos do imunossensor foram conduzidos utilizando-se duas substâncias que atuaram como indicadores da reação entre anticorpo específico para o IAM (anti-troponina T) e antígeno específico para o IAM (troponina T), o cloreto de hexaaminrutênio II e o ferro/ferricianeto de potássio. Os resultados obtidos mostraram que o cloreto de hexaaminrutênio II teve melhor desempenho para indicar a formação do complexo anticorpo-antígeno, característico no evento do IAM.

Palavras chave: ácido 3-hidroxifenilacético, eletropolimerização, poli(ácido 3-hidroxifenilacético), biossensores, imunossensor amperométrico, infarto agudo do miocárdio.

Abstract

Martins, P.O., *"Synthesis, characterization and application of poly(3-hydroxyphenylacetic acid) in the development of a biosensor for detection of cardiac marker."* Master's Thesis, Instituto de Química - UFU, 2011.

In this work was realized characterization studies of a new material, poly (3-hydroxyphenylacetic acid) and its application for the construction of an amperometric immunosensor for detection of Acute Myocardial Infarction (AMI). Initially, it was carried out the electropolymerization of 3-hydroxyphenylacetic acid at three different pH's (0.0, 6.5 and 12.0) which could be assessed, electrochemically, the relationship between the behavior of the polymer and the reaction's pH. It was found that in the acid solutions (pH 0.0) the formation of electrochemically active material is more evident. Moreover, using electrochemical techniques, were carried out investigations on the structure of the polymeric material by using cationic and anionic probes. Monomer and polymer were characterized by infrared spectroscopy (FTIR), Ultra-Violet (UV/Vis.) and fluorescence; thermal analysis (DTA and TGA) and structural analysis (XDR). These studies were extremely important to highlight the main differences between the starting material (monomer) and electropolymerized material (polymer), and in particular assess the main characteristics of the polymer in order to enable its use as a platform to the proposed immunosensor. Studies of the immunosensor were conducted using two substances that acted as indicators of the reaction between the specific antibody for the AMI (anti-troponin T) and specific antigen for AMI (troponin T), hexaaminruthenium chloride and ferro/ferricyanide potassium. The results showed that the hexaaminruthenium chloride showed the best performance to indicate the formation of antibody-antigen complex wich occurs in the AMI.

Key words: 3-hydroxyphenylacetic acid, electropolymerization, poly (3-hydroxyphenylacetic acid), biosensors, amperometric immunosensor, acute myocardial infarction.

Lista de Figuras

Figura 1.1: Esquema de dopagem nos átomos de silício.....	pag. 20
Figura 1.2: Escala de condutividade de alguns materiais.....	pag. 21
Figura 1.3: Principais classes de polímeros condutores.....	pag. 22
Figura 1.4: Mecanismo de eletropolimerização para heterociclos de cinco membros.....	pag. 23
Figura 1.5: Principais aplicações para os polímeros condutores.....	pag. 24
Figura 1.6: Representação esquemática de um biossensor.....	pag. 27
Figura 1.7: Especificidade de interação entre antígeno e anticorpo.....	pag. 29
Figura 1.8: Estrutura de um anticorpo.....	pag. 30
Figura 1.9: Coração humano no evento do IAM. Detalhe ao lado, coágulo sanguíneo provocado pela obstrução da artéria coronária.....	pag. 32
Figura 1.10: Tecido muscular cardíaco.....	pag. 35
Figura 1.11: Complexo formado pelas troponinas C, T e I.....	pag. 36
Figura 2.1: Estrutura do ácido 3-hidroxifenilacético.....	pag. 37
Figura 3.1: Barras de grafite e eletrodo de grafite, comparados a uma moeda.....	pag. 42
Figura 3.2: Eletrodo de grafite conectado a base, eletrodo auxiliar de platina e eletrodo de referência Ag/AgCl, comparados a uma caneta esferográfica.....	pag. 43
Figura 3.3: Célula eletroquímica de 3 compartimentos contendo os eletrodos de trabalho, auxiliar e referência Ag/AgCl, ligados ao potenciostato.....	pag. 44
Figura 3.4: Célula eletroquímica de extração de 1 compartimento, eletrodos de grafite em barra e eletrodo de referência Ag/AgCl.....	pag. 45
Figura 4.1: Curva de titulação de 20,0 mL de 3-HFA ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) com solução padrão de NaOH ($0,935 \text{ mol.L}^{-1}$). Estruturas de equilíbrio entre pKa's do 3-HFA.....	pag. 48

Figura 4.2: Voltamograma cíclico do eletrodo de grafite em solução 5,00 mmol.L⁻¹ K₄Fe(CN)₆/ K₃Fe(CN)₆ contendo 0,10 mol.L⁻¹ KCl; $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$ Eletrodo auxiliar de platina; Eletrodo de referência Ag/AgCl.....**pag. 50**

Figura 4.3: Voltamograma cíclico do eletrodo de grafite em solução HClO₄ 0,50 mmol.L⁻¹ após 1 ciclo voltamétrico. Em (A) pH = 0,0; (B) pH = 6,5 e (C) pH = 12,0; $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$**pag. 51**

Figura 4.4: Voltamograma cíclico em solução 2,50 mmol.L⁻¹ de 3-HFA em diferentes valores de pH: (a) 0,0; (b) 6,5 e (c) 12,0 sobre eletrodo de grafite. Eletrólito suporte: HClO₄ 0,50 mol.L⁻¹; $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$. Estruturas de equilíbrio entre pK_a's do 3-HFA.....**pag. 52**

Figura 4.5: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de grafite, depois de sucessivas varreduras de potencial, 100 ciclos, 50 mV.s^{-1} , em HClO₄ 0,50 mol L⁻¹; solução de 3-HFA 2,5 mmol.L⁻¹; em (A) pH = 0,0; (B) pH = 6,5 e (C) pH = 12,0. As setas indicam o comportamento da corrente com as consecutivas varreduras de potencial.....**pag. 54**

Figura 4.6: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de grafite modificados com poli(3-HFA) após eletropolimerização, somente em solução de HClO₄ 0,50 mol.L⁻¹. Número de ciclos = 10; Em (A) pH = 0,0; (B) pH = 6,5 e (C) pH = 12,0; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$**pag. 56**

Figura 4.7: Voltamogramas cíclicos obtidos após eletropolimerização, somente em solução de HClO₄ 0,50 mol.L⁻¹, na ausência do monômero, para os eletrodos de grafite: (a) não-modificado e (b) modificados com poli(3-HFA). Em (A) pH = 0,0; (B) pH = 6,5 e (C) pH = 12,0; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$**pag. 57**

Figura 4.8: Voltamogramas cíclicos obtidos para medidas das propriedades de troca aniônica dos eletrodos: (a) eletrodo de grafite; (b) EG/3-HFA no pH = 0,0; (c) EG/3-HFA no pH = 6,5 e (d) EG/3-HFA no pH = 12,0 em solução aquosa de 5,00 mmol.L⁻¹ de K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆ contendo KCl 0,10 mol.L⁻¹; $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$**pag. 60**

Figura 4.9: Voltamogramas cíclicos obtidos para medidas das propriedades de troca aniônica dos eletrodos: (a) eletrodo de grafite; (b) EG/ 3-HFA no pH = 0,0; (c) EG/3-HFA no pH = 6,5 e (d) EG/3-HFA no pH = 12,0 em solução aquosa de 5,00 mmol.L⁻¹ de Ru(NH₃)₆Cl₂ contendo KCl 0,10 mol.L⁻¹; $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$**pag. 61**

Figura 4.10: Espectro UV/Vis. do 3-HFA em solução HClO₄ 0,5 mol. L⁻¹ em diferentes pH's: (a) 0,0 ; (b) 6,5 e (c) 12,0.....**pag. 63**

Figura 4.11: Espectro de absorção UV/Vis. obtido para: (a) 3-HFA e (b) poli(3-HFA) eletropolimerizado em pH ácido (0,0).....**pag. 64**

Figura 4.12: Espectros de (a) excitação e (b) emissão para: (A) 3-HFA e (B) poli(3-HFA) eletropolimerizado em pH ácido (0,0).....pag. 66

Figura 4.13: Termograma obtido para o 3-HFA onde a curva (a) representa a perda de massa do material (TG) e a curva (b) representa a variação de energia envolvida no processo (DTA).....pag. 68

Figura 4.14: Termograma obtido para o poli(3-HFA) eletropolimerizado em pH ácido (0,0) onde a curva (a) representa a perda de massa do material (TG) e a curva (b) representa a variação de energia envolvida no processo (DTA).....pag. 69

Figura 4.15: Ilustração de emissão de raios X por um átomo ao incidir sobre o mesmo um elétron de alta energia.....pag. 70

Figura 4.16: Difrátogramas obtidos para (A) 3-HFA e (B) poli(3-HFA) eletropolimerizado em pH ácido (0,0).....pag. 72

Figura 4.17: Espectros comparativos de FTIR obtidos em pastilhas de KBr para: (a) 3-HFA e (b) poli(3-HFA) eletropolimerizado em pH ácido (0,0), com 20 ciclos consecutivos, em resolução de 4 cm^{-1} pag. 73

Figura 4.18: Perfil das harmônicas em anéis aromáticos substituídos.....pag. 76

Figura 4.19: Em (A) Espectro FTIR obtido para o 3-HFA; em (B) ampliação da deformação correspondente às harmônicas.....pag. 76

Figura 4.20: Em (A) Espectro FTIR obtido para o poli(3-HFA) eletropolimerizado em pH ácido (0,0); em (B) ampliação da deformação correspondente às harmônicas.pag. 77

Figura 4.21: Fórmula estrutural do cloreto de hexaaminrutênio II.....pag. 78

Figura 4.22: Esquema ilustrativo da imobilização e detecção da interação das biomoléculas imobilizadas na superfície do eletrodo de grafite modificado com poli(3-HFA) eletropolimerizado em pH ácido (0,0).....pag. 79

Figura 4.23: (A) VPD obtido para solução $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$ $2,5\text{ mmol.L}^{-1}$ contendo KCl $0,05\text{ mol.L}^{-1}$ em PBS $0,1\text{ mol.L}^{-1}$; $v = 400\text{ mV.s}^{-1}$; (B) VC obtido para solução $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$ $2,5\text{ mmol.L}^{-1}$ contendo KCl $0,05\text{ mol.L}^{-1}$ em PBS $0,1\text{ mol.L}^{-1}$; $v = 100\text{ mV.s}^{-1}$ pag. 80

Figura 4.24: VPD obtido para solução $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$ $16,0\text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ contendo KCl $0,32\text{ mmol.L}^{-1}$ em PBS $0,1\text{ mol.L}^{-1}$; (a) EG/3-HFA modificado com Ac/BSA; (b) EG/3-HFA

modificado com Ac/BSA/Ag⁺ (Ag⁺ → alvo específico); (c) EG/3-HFA modificado com Ac/BSA/Ag⁻ (Ag⁻ → alvo não-específico); $v = 400 \text{ mV.s}^{-1}$ pag. 81

Figura 4.25: Fórmula estrutural do Ferrocianeto de potássio.....pag. 82

Figura 4.26: Fórmula estrutural do Ferricianeto de potássio.....pag.82

Figura 4.27: (A) VPD obtido para solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 2,5 mmol.L⁻¹ contendo KCl 0,05 mol.L⁻¹ em PBS 0,1 mol.L⁻¹; $v = 400 \text{ mV.s}^{-1}$; (B) VC obtido para solução $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 2,5 mmol.L⁻¹ contendo KCl 0,05 mol.L⁻¹ em PBS 0,1 mol.L⁻¹; $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$ pag. 83

Figura 4.28: VPD obtido para solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,33 mmol.L⁻¹ contendo KCl 6,6 mmol.L⁻¹ em PBS 0,1 mol.L⁻¹; (a) EG/3-HFA modificado com Ac/BSA; (b) EG/3-HFA modificado com Ac/BSA/Ag⁺ (Ag⁺ → alvo específico); (c) EG/3-HFA modificado com Ac/BSA/Ag⁻ (Ag⁻ → alvo não-específico); $v = 400 \text{ mV.s}^{-1}$ pag. 84

Lista de Tabelas

Tabela 1: Dados relacionados ao infarto agudo do miocárdio registrados no ano de 2010, nos estados brasileiros.....**pag. 33**

Tabela 2: Principais diferenças entre valores de corrente (I) e potencial (E), encontrados para a sonda aniônica e catiônica; onde a: eletrodo de grafite; b: EG/3-HFA pH = 0,0 ; c: EG/3-HFA pH = 6,5 e d: EG/3-HFA pH = 12,0.....**pag. 59**

Tabela 3: Potencial de oxidação primeiro ciclo de oxidação do 3-HFA e comprimento de onda de absorção em função do pH do meio reacional.....**pag.64**

Tabela 4: Deformações obtidas para o espectro IR do 3-HFA e poli(3-HFA).....**pag. 75**

Tabela 5: Principais diferenças entre o indicador catiônico $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2$ e o indicador aniônico $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$; onde: (a) EG/3-HFA modificado com Ac/BSA, (b) EG/3-HFA modificado com Ac/BSA/Ag⁺ (Ag⁺ → alvo específico) e (c) EG/3-HFA modificado com Ac/BSA/Ag⁻ (Ag⁻ → alvo não-específico).....**pag. 86**

Lista de abreviaturas e símbolos

3-HFA = Ácido 3-hidroxifenilacético

Ac = Anticorpo

Ag = Antígeno

AVC = Acidente Vascular Cerebral

BSA = Albumina de Soro Bovino

CK-MB = Creatinoquinase MB

cm = centímetros

cTnC = Troponina C

cTnI = Troponina I

cTnT = Troponina T

DNA = Ácido desoxirribonucléico

DRX = Difração de Raios X

dsDNA = DNA dupla fita

DTA = Análise Térmica Diferencial

ECG = Eletrocardiograma

EG/3-HFA = Eletrodo de grafite modificado com poli(3-HFA)

E_{pa} = Potencial de pico anódico

E_{pc} = Potencial de pico catódico

FTIR = Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier

g = gramas

IAM = Infarto Agudo do Miocárdio

Ig = Imunoglobulina

I_{pa} = Corrente de pico anódico

I_{pc} = Corrente de pico catódico

Ka = constante de afinidade

L = litros

LDH = Lactato desidrogenase

mA = miliamperes

mL = mililitros

mV = milivolts

MΩ = Mega ohms

nm = nanômetros

PA = Para análise

PBS = Solução Tampão Fosfato

PC = Polímero condutor

PIC = Polímero intrinsecamente condutor

poli(3-HFA) = poli(3-HFA)

ppb = partes por bilhão

ppm = partes por milhão

C = carga

RNA = Ácido ribonucléico

s = segundos

ssDNA = DNA simples fita

TGA = Análise Termogravimétrica

TSH = Hormônio Estimulante da Tireóide

UV/Vis. = Ultravioleta/Visível

v = velocidade

V = volts

VC = Voltametria Cíclica

VPD = Voltametria de Pulso Diferencial

λ = comprimento de onda

μA = microamperes

μC = microcoulombs

SUMÁRIO

1. Introdução	18
1.1 Polímeros condutores.....	18
1.2 Preparação de polímeros condutores	22
1.3 Aplicação dos polímeros condutores	24
1.4 Eletrodos modificados com polímeros	25
1.5 Aplicação de polímeros em biossensores	26
1.6 Classes de Biossensores.....	27
1.6.1 Imunossensores	29
i) Considerações importantes sobre antígenos e anticorpos	29
1.6.2 Diagnóstico do Infarto Agudo do Miocárdio (IAM)	31
i) Troponinas Cardíacas	34
ii) A Troponina T como marcador cardíaco	36
2. Objetivos.....	37
2.1 Objetivos gerais	37
2.2 Objetivos específicos	38
3. Experimental	39
3.1 Preparo das soluções	39
3.2 Determinação dos pKa's do 3-HFA.....	42
3.3 Descrição dos eletrodos e potenciostatos utilizados	42
3.4 Eletropolimerização do 3-HFA.....	43
3.5 Propriedades de troca iônica	44
3.6 Extração do poli(3-HFA)	45
3.7 Espectroscopia no Ultravioleta/Visível (UV/Vis.)	46
3.8 Espectroscopia de Fluorescência	46
3.9 Análise Termogravimétrica (TGA)	46
3.10 Difração de Raios X (DRX).....	46
3.11 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)	47
3.12 Procedimento de construção do Imunossensor para diagnóstico do Infarto Agudo do Miocárdio (IAM)	47
3.12.1 Imobilização e detecção das biomoléculas	47
4. Resultados e discussões.....	48

4.1. Determinação dos pKa's do 3-HFA.....	48
4.2 Voltametria cíclica	49
4.2.1 Preparação dos eletrodos.....	49
4.2.2 Condicionamento dos eletrodos para eletropolimerização do 3-HFA.....	50
4.2.3 Investigação da influência do pH nos parâmetros voltamétricos	52
4.2.4 Eletropolimerização do 3-HFA.....	53
4.2.6 Comportamento eletroquímico dos filmes de poli(3-HFA).....	55
4.2.7 Influência dos pares redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ e $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$ no comportamento eletroquímico do poli(3-HFA)	58
4.3 Espectroscopia no Ultravioleta/Visível (UV/Vis.)	62
4.4 Espectroscopia de Fluorescência	65
4.5 Análise Termogravimétrica (TGA)	66
4.7 Difração de Raios X (DRX).....	70
4.8 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)	72
4.9 Aplicação das plataformas de poli(3-HFA) para construção de imunossensor	77
4.9.1 Cloreto de hexaaminrutênio II como indicador	78
i) Considerações importantes sobre o Cloreto de hexaaminrutênio II.....	78
ii) Comportamento eletroquímico.....	79
iii) Detecção utilizando Cloreto de Hexaaminrutênio II como indicador da formação do complexo Anticorpo-Antígeno	80
4.9.2 Ferro/ferricianeto de potássio como indicador	82
i) Considerações importantes sobre o ferro/ferricianeto de potássio	82
ii) Comportamento eletroquímico do ferro/ferricianeto de potássio.....	83
iii) Detecção utilizando Ferro/Ferricianeto de Potássio como indicador da formação do complexo Anticorpo-Antígeno	84
5. Conclusões e Perspectivas.....	86
6. Referências Bibliográficas.....	88

1. Introdução

1.1 Polímeros condutores

Polímeros são compostos de origem natural ou sintética com alta massa molar formados pela repetição de um grande número de unidades químicas. Existem polímeros orgânicos e inorgânicos; sendo os primeiros os mais estudados e mais importantes comercialmente. Entre os polímeros incluem-se materiais como filmes que embalam alimentos, fibras têxteis, borrachas etc¹.

A diferença entre *macromolécula* e *polímero* consiste no fato de que neste a alta molar é proveniente da repetição de unidades estruturais simples (poli “muitos”; meros “partes”) – e naquela é consequência da complexidade molecular, como as macromoléculas presentes nos organismos vivos. Assim, os polímeros são considerados macromoléculas, mas recíproca não é obrigatoriamente verdadeira.

As substâncias que dão origem aos polímeros por reação química são chamadas de *monômeros*. As unidades que se repetem ao longo da cadeia polimérica e que caracterizam a composição química do polímero são chamadas de *unidades repetitivas* ou *meros*. Em muitos casos, a unidade repetitiva é quase equivalente ao monômero que originou o polímero, como nos polímeros vinílicos¹.

Nas últimas décadas, uma nova classe de polímeros orgânicos tem sido desenvolvida, cuja importância está relacionada à possibilidade de conduzir eletricidade². Os membros desta nova classe de materiais, chamados de “metais sintéticos”, possuem uma característica em comum: longos sistemas π conjugados, ou seja, uma alternância de ligações simples e duplas ao longo da cadeia. O interesse evidente é combinar em um mesmo material as propriedades elétricas de um semicondutor ou metal com as vantagens de um polímero³.

Deste modo, um polímero orgânico que possui propriedades elétricas, eletrônicas, magnéticas e ópticas de um metal, mantendo ainda as propriedades físicas, processabilidade, etc., comumente associada com um polímero convencional, é denominado de um “polímero intrinsecamente condutor – (PIC)”, mais comumente conhecido como um “metal sintético”^{3,4}.

Alguns polímeros passam de isolantes a polímeros condutores (PC) pela adição de agentes de transferência de carga. Estes são chamados de “dopantes”, em analogia

aos semicondutores inorgânicos e o seu uso acarreta uma dramática mudança nas propriedades dos polímeros já conhecidas.

Dopagem eletrônica consiste num procedimento de adição de impurezas químicas a um elemento semiconductor, para transformá-lo num elemento mais condutor, porém de forma controlada. O conceito de semiconductor intrínseco está relacionado ao material que, não-intencionalmente, possui não mais de um átomo de elemento químico estranho (qualquer elemento) para cada bilhão de átomos do material escolhido. O teor de impureza neste caso é chamado 1 ppb, ou uma parte por bilhão. A interferência da impureza não é suficiente para interferir na estabilidade do material, sendo o material, portanto, estável. Por outro lado, o semiconductor dopado (ou extrínseco) possui intencionalmente cerca de um átomo de elemento químico desejado (não qualquer elemento) para cada milhão de átomos do material escolhido. O teor da impureza é 1ppm (uma parte por milhão) no semiconductor dopado⁵.

No campo dos materiais inorgânicos, três elementos são comuns na dopagem eletrônica: carbono, silício e germânio; todos possuem quatro elétrons na camada de valência. Existem dois tipos principais de dopagem utilizados:

Tipo N: Ocorre com adição de fósforo ou arsênio ao silício. Tanto o arsênio quanto o fósforo possuem cinco elétrons na camada de valência. Ocorrem ligações covalentes entre quatro elétrons e um deles fica livre, ou seja, o elétron livre (defeito) ganha movimento e gera a corrente elétrica. O nome N provém da negatividade gerada da carga negativa existente (elétron livre).

Tipo P: Nesta dopagem, há adição de boro ou gálio ao silício. Ambos possuem três elétrons na camada de valência. Quando são adicionados ao silício criam lacunas, que conduzem corrente elétrica e a ausência de um elétron cria uma carga positiva (por isso o nome P), conforme verificado na Figura 1.1.

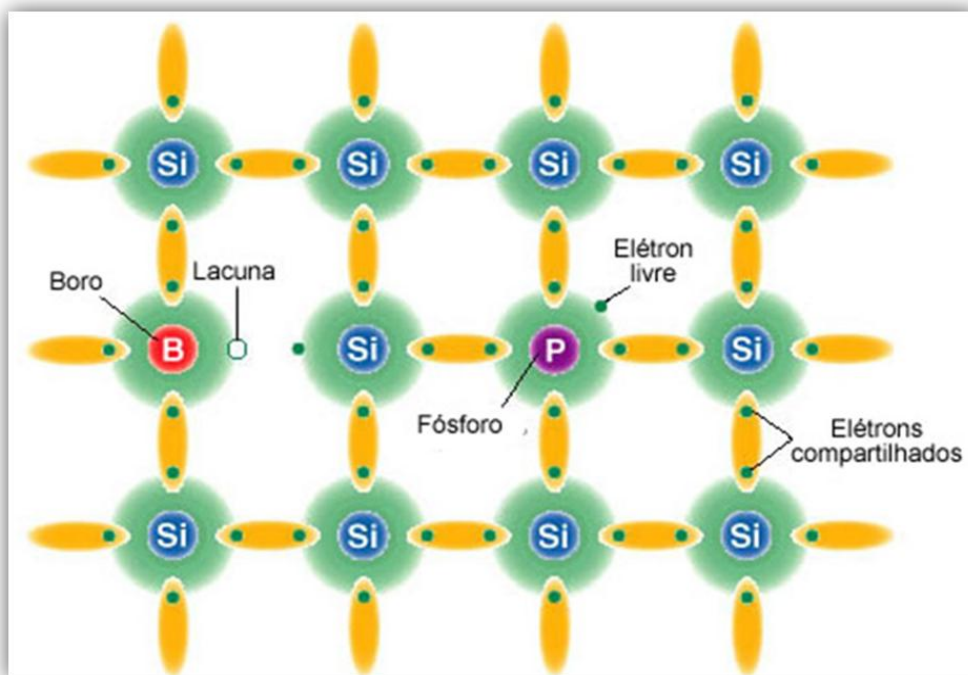


Figura 1.1: Esquema de dopagem nos átomos de silício⁵.

Matveeva⁶ sugere que a condutividade nos polímeros condutores seja governada pelos transportes intermolecular (ou intercadeia), intramolecular e interpartículas. A dopagem destes polímeros fornece muitos portadores de carga em potencial, que precisam se mover para contribuir com a condutividade. O fator limitante no processo de condução de um polímero dopado é, portanto, a mobilidade dos portadores. Sendo assim, qualquer mudança estrutural na cadeia polimérica afetará as propriedades condutoras⁴.

No começo dos anos 70, Shirakawa e Ikeda^{7, 8} demonstraram a possibilidade de preparar filmes auto-suportados de poliacetileno (CH)_x pela polimerização direta do acetileno. O polímero produzido apresentou propriedades semicondutoras, mas atraiu pouco interesse até 1977, quando MacDiarmid e colaboradores⁹ descobriram que, tratando o poliacetileno com ácido ou base de Lewis, era possível aumentar a condutividade em até 13 ordens de grandeza. Esses processos envolviam a remoção ou adição de elétrons da cadeia polimérica (dopagem). Em ambos os casos a dopagem é aleatória e não altera a estrutura do material. A interação impureza-cadeia gera

deformações e “defeitos carregados” localizados, responsáveis pelo aumento na condutividade¹⁰.

Desde a publicação do trabalho de MacDiarmid e colaboradores⁹, houve um crescimento significativo da pesquisa sobre estruturas poliméricas conjugadas, levando ao desenvolvimento de novas classes de polímeros condutores. Os valores de condutividade elétrica de muitos polímeros condutores (após dopagem) são apresentados na Figura 1.2.

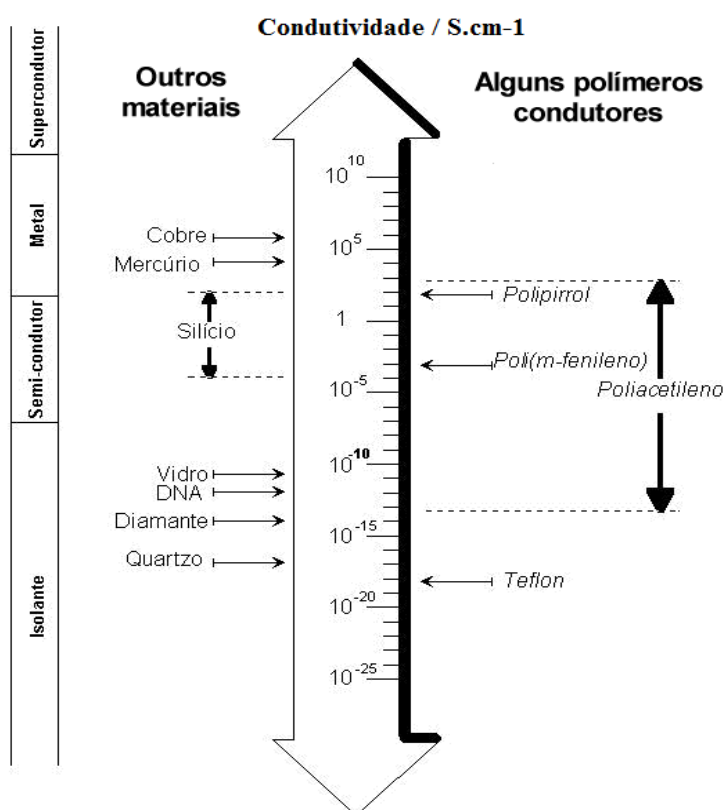


Figura 1.2: Escala de condutividade de alguns materiais¹¹.

A Figura 1.3 mostra as principais classes de polímeros condutores estudadas:

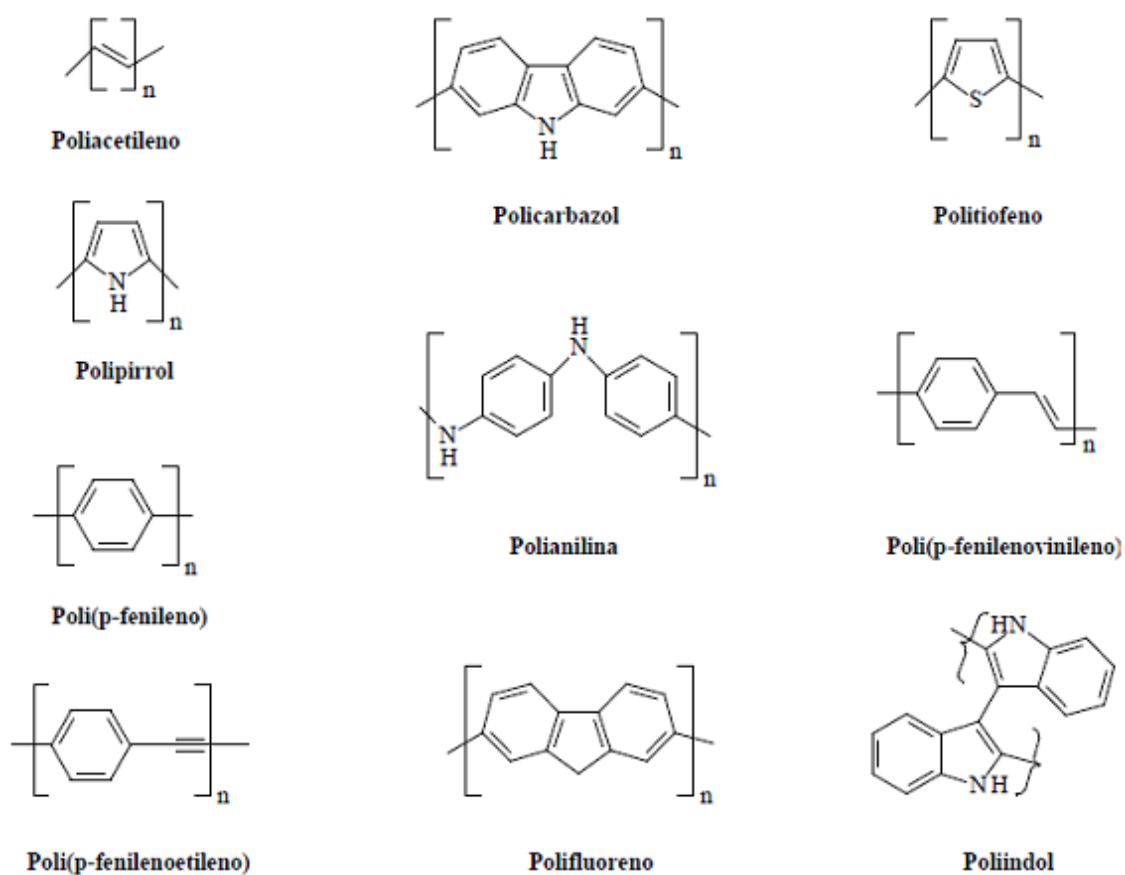


Figura 1.3: Principais classes de polímeros condutores¹².

1.2 Preparação de polímeros condutores

Em geral, a obtenção dos polímeros condutores é bastante simples, sendo o método eletroquímico o mais relatado¹². 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^{13, 14}, conforme pode ser observado na Figura 1.4. 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^{13, 15, 16}.

Os polímeros condutores podem também ser obtidos por síntese química¹⁷. 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.

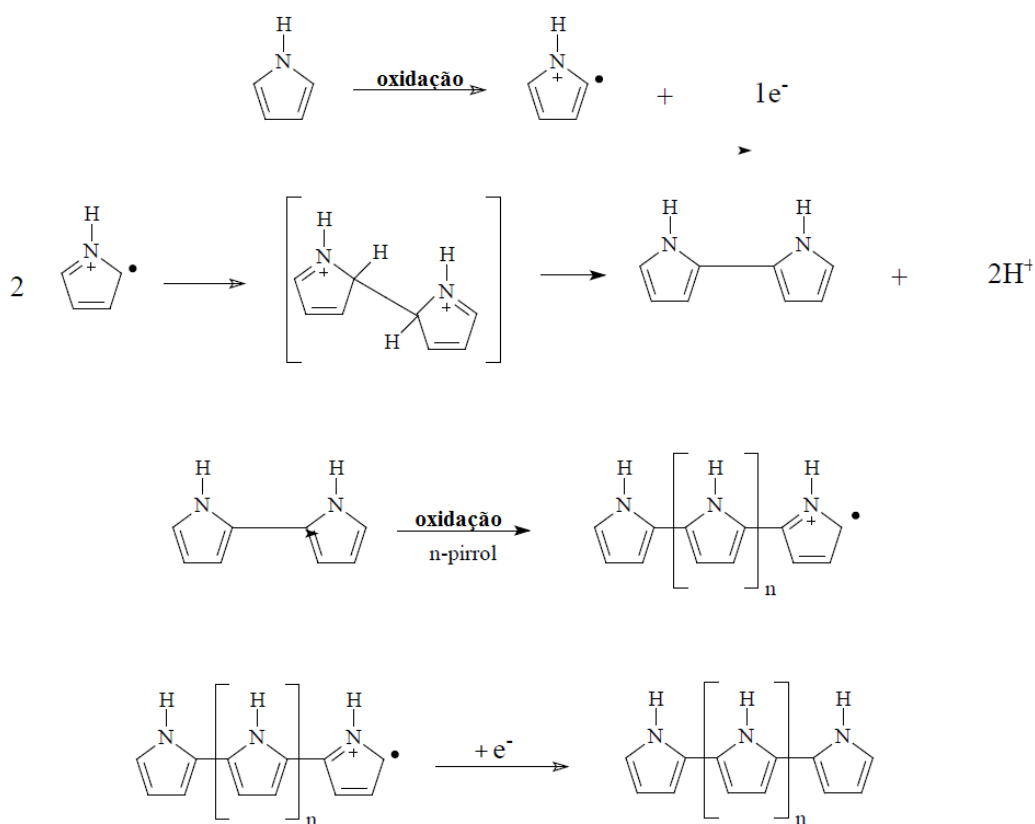


Figura 1.4: Mecanismo de eletropolimerização para heterociclos de cinco membros¹⁴.

Enquanto a maioria dos materiais condutores orgânicos produzidos comercialmente é preparada por polimerização química¹⁸, muitos monômeros podem ser eletropolimerizados diretamente sobre um metal ou sobre eletrodos semicondutores¹⁹, permitindo assim, a caracterização *in situ* dos filmes poliméricos por métodos eletroquímicos e espectroscópicos²⁰.

1.3 Aplicação dos polímeros condutores

A Figura 1.5 representa um resumo das principais aplicações dos polímeros condutores.

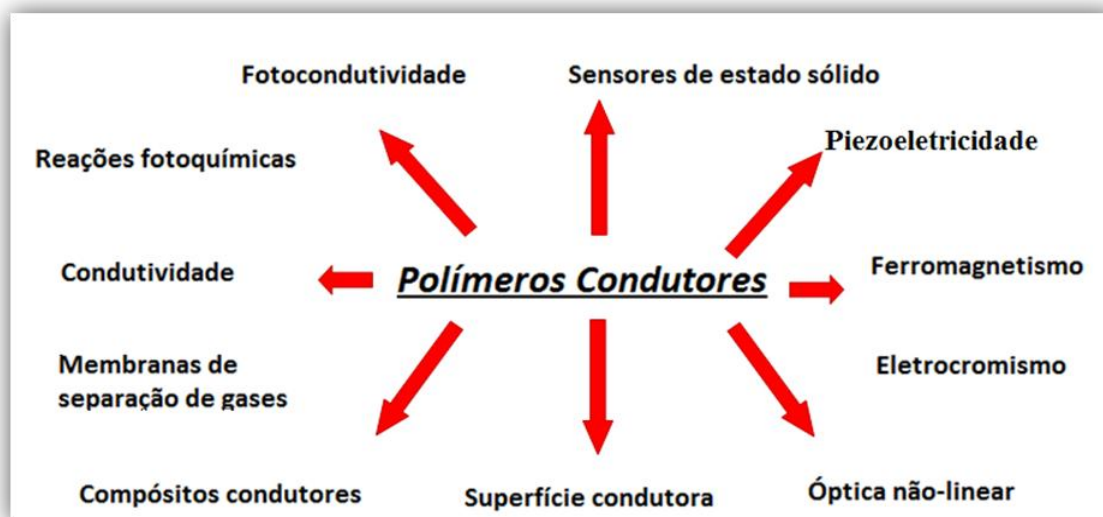


Figura 1.5: Principais aplicações para os polímeros condutores.

As propriedades destes polímeros são fortemente dependentes de sua microestrutura e morfologia, as quais estão relacionadas à presença de defeitos e reticulações que, entre outros fatores, são determinadas pelo método de síntese, condições e outras variáveis difíceis de serem controladas simultaneamente. Um dos maiores desafios para melhorar e garantir o desempenho 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 condutividade²¹.

1.4 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. Respostas eletroquímicas maiores são obtidas quando uma maior quantidade de camadas é depositada na superfície do eletrodo. Vários métodos são usados para preparar eletrodos recobertos com filmes poliméricos²²⁻²⁵.

- **Cobertura por banho:** quando um eletrodo é mantido em solução do polímero, sendo o recobrimento efetuado por adsorção.
- **Evaporação:** um pequeno volume da solução polimérica é colocado sobre a superfície do eletrodo e evapora-se o solvente. O eletrodo modificado é utilizado em um eletrólito ou solvente onde o polímero seja insolúvel.
- **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.
- **Cobertura e rotação:** o eletrodo é mantido girando após uma gota de solução polimérica ter sido colocada em sua superfície. Posteriormente, o solvente é evaporado e o material polimérico fica adsorvido na superfície do eletrodo.
- **Eletropolimerização:** os produtos da reação no eletrodo são insolúveis no solvente usado. A solução monomérica é adicionada a uma célula eletroquímica que por sua vez, se encontra conectada a um potenciostato. O equipamento, devidamente ajustado, aplica um potencial (de oxidação ou redução) à solução utilizada promovendo o início da eletropolimerização. A eletropolimerização de vários compostos monoméricos substituídos pode proporcionar ao eletrodo propriedades elétricas e analíticas interessantes.
- **Polimerização por métodos não eletroquímicos:** polimerização ativada por plasma, foto-induzida por UV (Ultra-Violeta) ou polimerização de organossilanos.

Apesar dos eletrodos modificados por polímeros apresentarem respostas eletroquímicas relevantes elas também são complicadas de serem discutidas devido à sobreposição de processos como transporte e transferência de carga, movimento de contra-íons para dentro e para fora do polímero, movimento do filme polimérico, inchaço com o solvente e difusão do analito no filme²⁶. Apesar destes fatos, a modificação polimérica do eletrodo permanece um procedimento conveniente e simples para melhorar o desempenho de eletrodos²².

Um fator importante e decisivo para atender à preparação de filmes poliméricos finos é ter estabilidade suficiente a longo prazo em diferentes ambientes²⁷. Neste contexto, o conhecimento sobre a estrutura dos polímeros condutores, resposta eletroquímica, mecanismo de deposição e cinética associadas a estas transições são extremamente importantes nas aplicações destes materiais²⁸.

A preparação e estudo das propriedades dos eletrodos revestidos com filmes redox de materiais poliméricos têm sido assunto de algumas investigações^{30,31}; principalmente a sua aplicação em sensores. Vantagens oferecidas por esses sistemas sobre monocamadas ligadas diretamente e quimicamente incluem a fácil preparação, estabilidade, maiores sinais para caracterização mais simples e cobertura superficial satisfatória³⁰.

A preparação de filmes poliméricos derivados de éteres alquil-arílicos e fenóis tem sido extensamente estudada pelo grupo LAFIP/NANOTEC³²⁻⁴¹. O interesse nestes monômeros está voltado principalmente para a aplicação em sensores biológicos, uma que vez, após eletropolimerização, 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 poliméricos.

1.5 Aplicação de polímeros em biossensores

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 ativos²⁹. É bem conhecido que a função de um sensor é fornecer informações em nosso ambiente físico, químico e biológico³⁰.

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 converte 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 ambiental⁴². 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. A Figura 1.6 mostra a disposição esquemática de um biossensor:

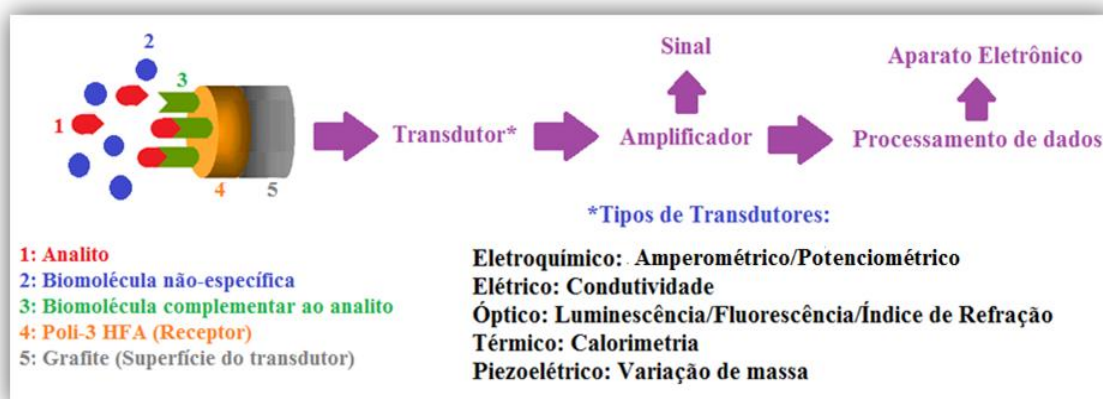


Figura 1.6: Representação esquemática de um biossensor.

1.6 Classes de Biossensores

Os biossensores são classificados de acordo com o tipo de biomolécula imobilizada na superfície do transdutor ⁴⁸. Portanto, as principais classes de biossensores são: **Imunossensores**, **Biossensores Enzimáticos**, **Biossensores Microbiológicos e Genossensores** e, o princípio de funcionamento de cada um dos respectivos biossensores pode ser entendido da seguinte maneira:

- **Imunossensores:** baseiam-se no uso de um anticorpo que reage especificamente com uma substância (antígeno) a ser testada. A imobilização do receptor (por exemplo, antígeno) sobre um substrato é conveniente para aplicações de reconhecimento biomolecular para detecção da molécula alvo (por exemplo, anticorpo) presente na solução. A especificidade da interação antígeno-anticorpo permite o desenvolvimento de imunossensores para diagnósticos clínicos, monitoramento ambiental, dentre outros⁴³.
- **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^{43, 44}.
- **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 colaboradores⁴⁵ 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 e outros compostos a base de cobalto ou rutênio, para redução dos potenciais de oxidação^{46,47}.

1.6.1 Imunossensores

O imunossensor é um tipo de biossensor baseado na reação imunológica, sendo que o antígeno (Ag) ou anticorpo (Ac) é imobilizado na superfície do transdutor. Assim, diversos tipos de imunossensores podem ser construídos, de acordo com o tipo de transdutor empregado⁴⁹.

i) Considerações importantes sobre antígenos e anticorpos

Os antígenos possuem estruturas químicas que favorecem a complementaridade com o anticorpo, através de ligações não-covalentes. 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 cruzada⁵⁰. A especificidade de interação entre antígeno e anticorpo está ilustrada na Figura 1.7:

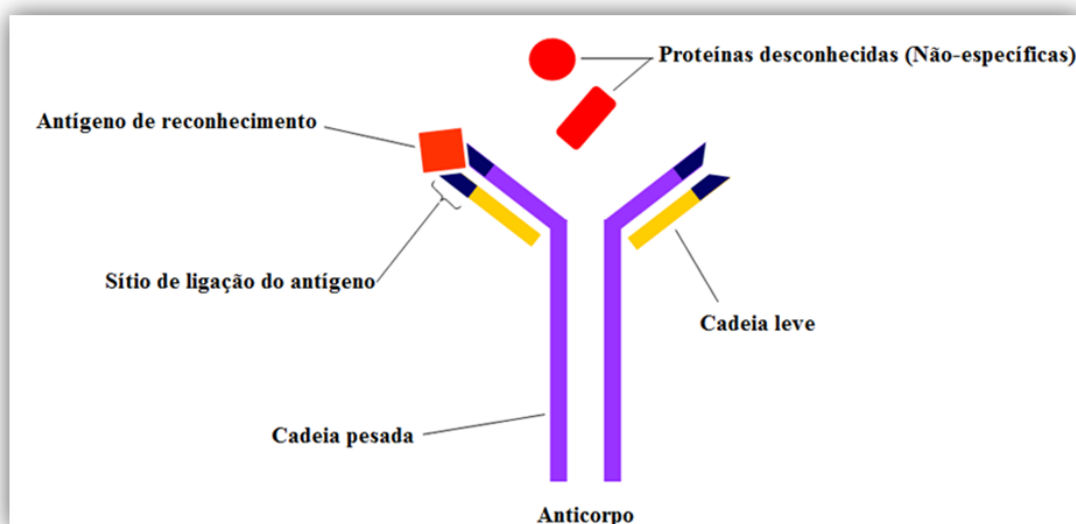


Figura 1.7: Especificidade de interação entre antígeno e anticorpo.

Os anticorpos (Ac) pertencem à família das glicoproteínas denominadas 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 antígenos (Ag). 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 às 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 replicarem⁵⁰. A Figura 1.8 mostra detalhadamente a estrutura de um anticorpo.

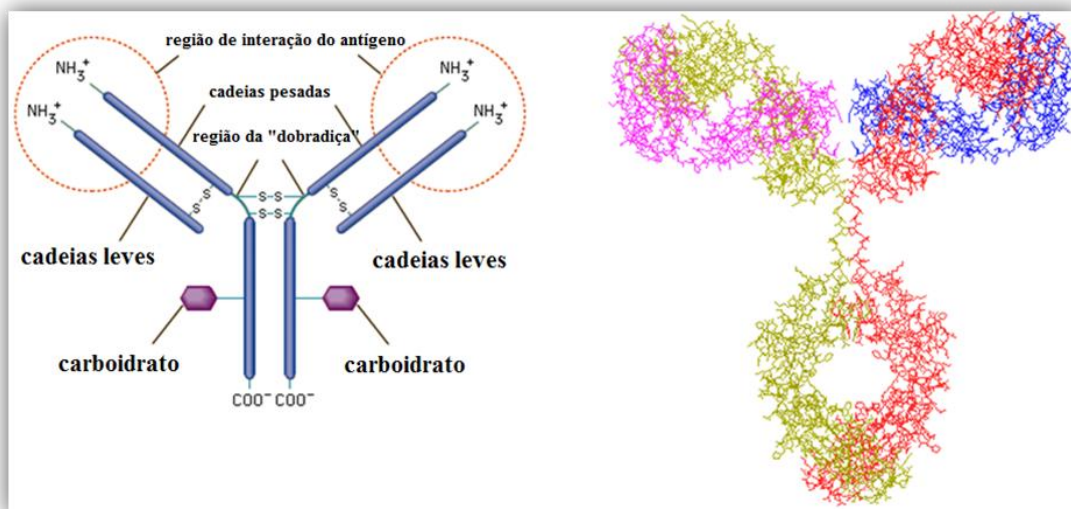
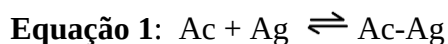


Figura 1.8: Estrutura de um anticorpo.

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 (Ag-Ac), do antígeno livre (Ag) e dos sítios livres dos anticorpos (Ac) no equilíbrio, de acordo com a Equação 2.



Equação 2: $K_a = [\text{Ac-Ag}]/[\text{Ac}].[\text{Ag}]$

Os valores das constantes de afinidade entre 10^4 e $10^{12} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ resultam na alta sensibilidade dos imunoenaios. 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 empregado⁴⁹. Uma alternativa é o uso de indicadores eletroquimicamente ativos, como ferro/ferricianeto de potássio e cloreto de hexaaminrutênio II, os quais foram utilizados neste trabalho.

1.6.2 Diagnóstico do Infarto Agudo do Miocárdio (IAM)

O Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) é uma lesão no músculo cardíaco causada pela obstrução (total ou parcial) da artéria coronária, responsável pela irrigação do coração. Quando a artéria está obstruída, parte do músculo cardíaco (miocárdio) deixa de receber sangue e nutrientes, sofrendo uma injúria irreversível. Cerca de 20 minutos depois, essa privação mata os tecidos da região atingida. Quanto maior a artéria bloqueada, maior será a área afetada⁵¹. Dentre os sintomas mais comuns do infarto do miocárdio, pode-se citar:

- **Dor no peito ou desconforto torácico:** são os sintomas mais comuns do infarto. A dor ou desconforto ocorrem geralmente no centro do peito, com características do tipo pressão ou aperto, de grau moderado a intenso. Geralmente, a dor pode durar por vários minutos ou parar e voltar novamente. Em alguns casos, a dor do infarto pode parecer com um tipo de indigestão, queimação no estômago ou azia.

Outros sintomas observados durante um infarto são⁵²:

- Sensação de desconforto nos ombros, braços, dorso (costas), pescoço, mandíbula ou no estômago. Algumas pessoas podem ainda sentir uma sensação de dor tipo aperto nos braços e sensação de incômodo na língua ou no queixo.

- Palidez da pele, suor frio pelo corpo, inquietação, palpitações e respiração curta também podem ocorrer.
- Pode haver também náuseas, vômitos, tonturas, confusão mental e desmaios.

A Figura 1.9 ilustra o comportamento de uma artéria coronária no evento do infarto.

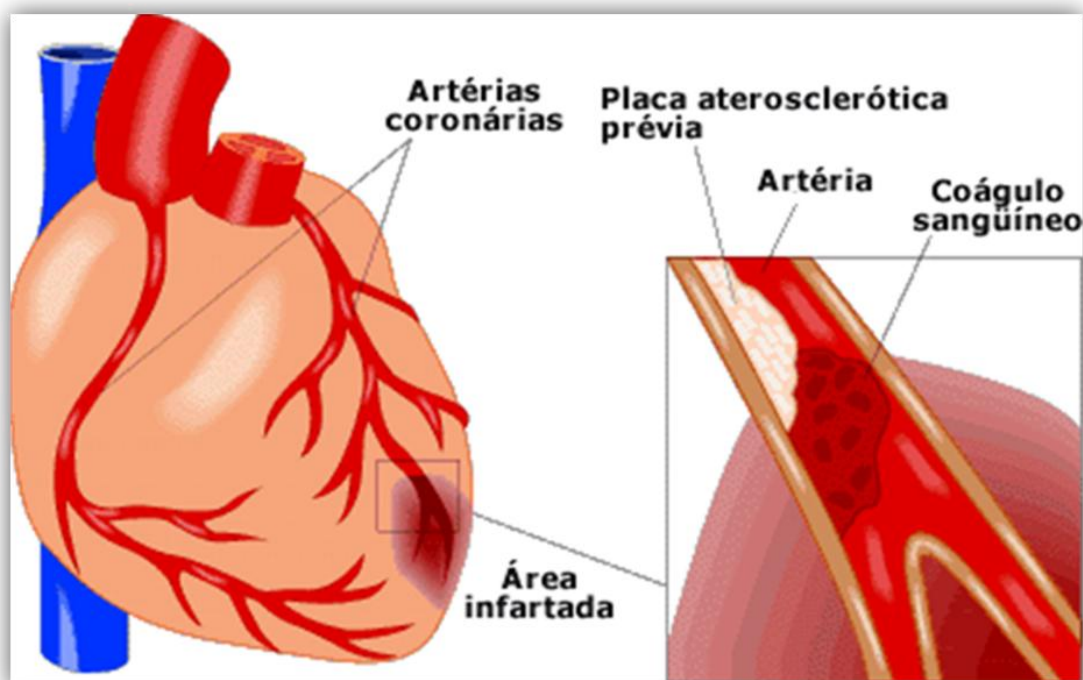


Figura 1.9: Coração humano no evento do IAM. Detalhe ao lado, coágulo sanguíneo provocado pela obstrução da artéria coronária⁵³.

Popularmente conhecido como ataque cardíaco, o infarto agudo do miocárdio é a consequência mais assustadora dos problemas relacionados ao coração. Estima-se que no Brasil apenas metade dos infartados chega com vida a um hospital. Aqueles que dão entrada mais rapidamente têm maiores chances de sobreviver, assim como de diminuir eventuais sequelas⁵³. A Tabela 1 mostra os principais eventos relacionados ao infarto registrados no Brasil durante o ano de 2010.

Tabela 1: Dados relacionados ao infarto agudo do miocárdio registrados no ano de 2010, nos estados brasileiros.

Unid. Federação	Internações	Óbitos - Geral	Óbitos - Homens	Óbitos - Mulheres
Total	6290	822	446	376
São Paulo	1965	268	141	127
Minas Gerais	769	92	48	44
Rio Grande do Sul	614	76	38	38
Rio de Janeiro	439	66	35	31
Paraná	440	65	34	31
Bahia	359	38	22	16
Santa Catarina	291	31	18	13
Pernambuco	232	25	15	10
Ceará	174	23	14	9
Mato Grosso	95	23	17	6
Paraíba	62	16	8	8
Goiás	129	15	8	7
Pará	76	11	8	3
Rio Grande do Norte	66	10	6	4
Piauí	74	9	4	5
Espírito Santo	98	9	4	5
Maranhão	52	8	3	5
Sergipe	62	8	3	5
Amazonas	89	7	5	2
Mato Grosso do Sul	60	6	5	1
Distrito Federal	69	6	3	3
Alagoas	32	5	2	3
Rondônia	11	3	3	0
Tocantins	18	2	2	0
Acre	7	0	0	0
Roraima	7	0	0	0

Fonte: Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS).

O diagnóstico é feito pela análise dos sintomas, histórico de doenças pessoais e de familiares, e pelos resultados de exames solicitados. Abaixo seguem os principais exames realizados para o diagnóstico do infarto do miocárdio⁵⁴.

- **Eletrocardiograma (ECG):** na presença de um infarto, geralmente há alterações no eletrocardiograma que o identifica. Este exame pode mostrar também a presença de arritmias cardíacas causadas pelo próprio infarto.
- **Dosagem de enzimas cardíacas:** quando as células do músculo cardíaco começam a morrer, há a liberação de uma grande quantidade de enzimas cardíacas na circulação sanguínea. Por isso, faz-se a dosagem dessas enzimas para diagnosticar o infarto. Muitas vezes, são feitas várias dosagens no decorrer do dia para melhor avaliação e diagnóstico. As enzimas mais pesquisadas são a Troponina, CK-Total, CK-MB, Mioglobina e LDH.
- **Angiografia coronariana:** consiste na passagem de um catéter através de um vaso sanguíneo (cateterismo), que visa mapear e estudar a circulação coronariana do coração. Caso este procedimento identifique uma obstrução coronariana, pode-se realizar uma angioplastia no mesmo momento para desobstruir a coronária e restaurar o fluxo sanguíneo normal para o coração. Algumas vezes, durante a angioplastia, pode ser necessária a colocação de um “stent” (um pequeno tubo em forma de mola) para manter a artéria coronária aberta e desobstruída.

Dentre os numerosos marcadores bioquímicos da injúria miocárdica, recentemente estudados⁵⁵, as **troponinas cardíacas T e I** podem ser apontadas como os mais promissores, em virtude da sua elevada especificidade e sensibilidade. Diversos estudos apontam para a detecção de graus menores de injúria, habitualmente não identificados pelos outros métodos e marcadores em uso corrente.

i) Troponinas Cardíacas

As troponinas são componentes protéicos que fazem parte da musculatura estriada cardíaca e que ocorrem de três tipos, a troponina **C**, a troponina **T** e a troponina **I**, ligadas entre si e a tropomiosina⁵⁶. A troponina C (cTnC) possui a mesma estrutura no músculo esquelético e no músculo cardíaco. Mas as troponinas cardíacas como a troponina T (cTnT) e a troponina I (cTnI) são produtos de diferentes genes em comparação as troponinas T e I da musculatura esquelética. Ambas as troponinas cTnT

e cTnI podem ser medidas por radioimunoensaio que usam técnicas similares e os mesmos instrumentos laboratoriais para testes mais familiares como o hormônio estimulante da tireóide (TSH) ⁵⁶. A Figura 1.10 mostra a disposição do complexo formado pelas troponinas C, T e I no tecido muscular cardíaco.

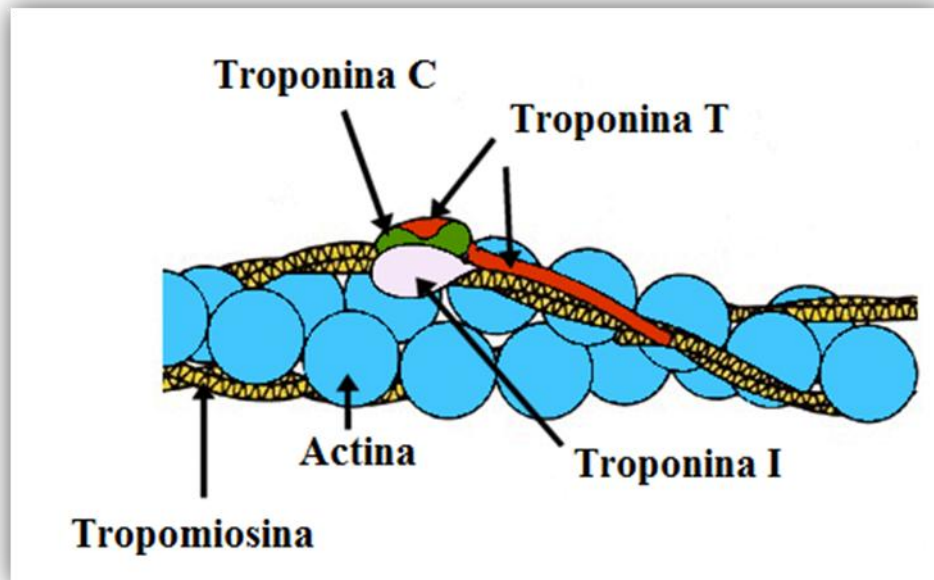


Figura 1.10: Tecido muscular cardíaco⁵⁷.

Os níveis de cTnT e cTnI são indetectáveis no sangue pelos métodos disponíveis na atualidade de forma que os valores normais de cTnT e cTnI são efetivamente zero. Após o infarto do miocárdio ocorre necrose do tecido miocárdio e a liberação na circulação de componentes intracelulares, incluindo conhecidas enzimas como creatino-kinase (CK), suas isoenzimas (CK-MB) bem como as troponinas cTnT e cTnI, as quais podem ser detectadas no mesmo espaço de tempo que as CK e CK-MB. Todos os casos de infarto de miocárdio apresentam níveis detectáveis de cTnT e cTnI cerca de 12 horas após o evento ou mesmo mais precocemente ⁵⁶. A Figura 1.11 mostra a estrutura do complexo formado pelos 3 tipos de troponinas cardíacas.

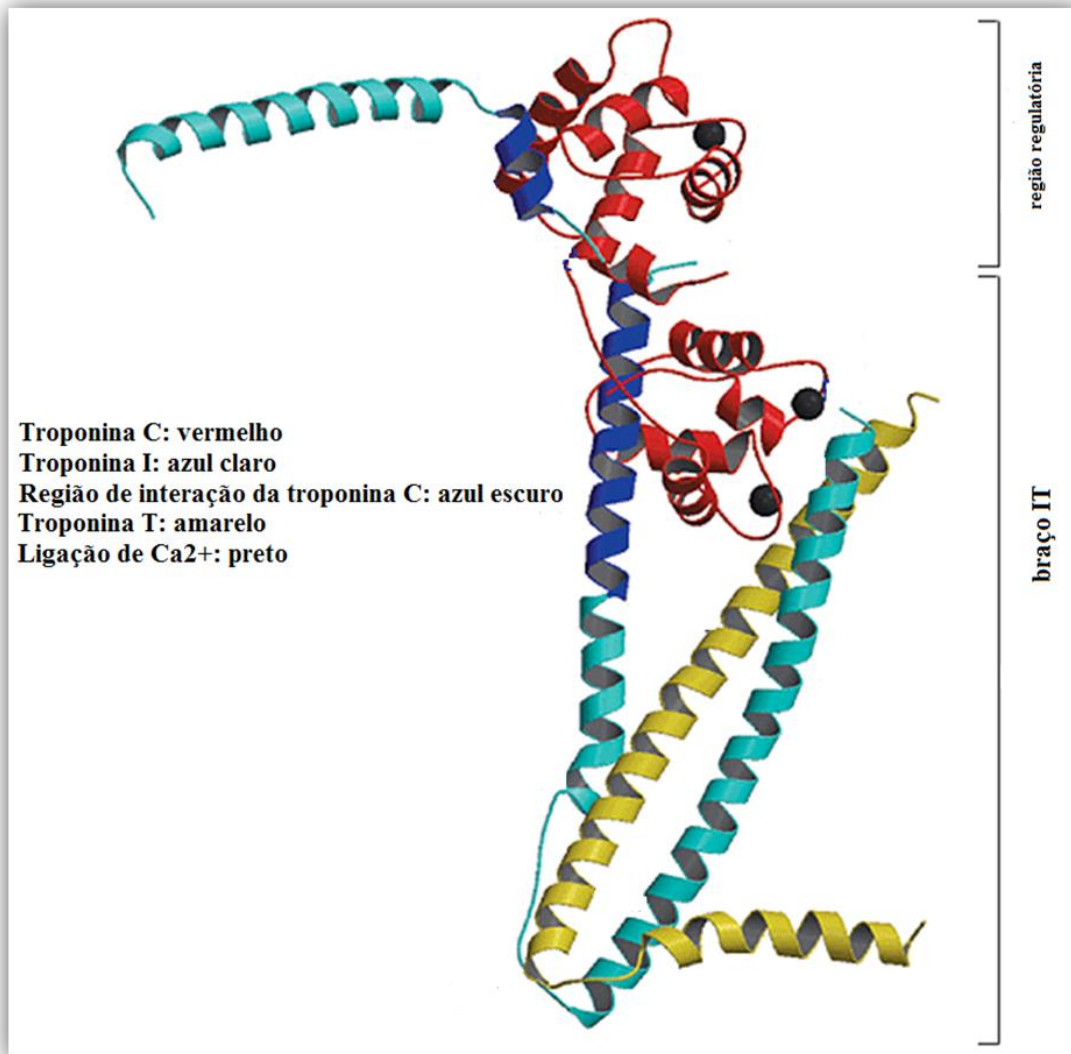


Figura 1.11: Complexo formado pelas troponinas C, T e I⁵⁸.

ii) A Troponina T como marcador cardíaco

A medição de troponina T cardíaca (cTnT) é um valioso guia no diagnóstico das lesões de células do miocárdio. É um marcador cardiospecífico que pode ser usado no auxílio do diagnóstico de Síndrome Coronariana Aguda para identificar necrose, por exemplo, Infarto Agudo do Miocárdio (IAM). Comparado com o “padrão ouro” baseado na dosagem de Creatina Quinase MB (CK-MB), normalmente utilizado, a troponina T mostrou-se mais específica e mais sensível na detecção da injúria cardíaca⁵⁹. A troponina T origina-se exclusivamente do miocárdio e tem um peso

molecular de 39,7 kDa. O aumento da concentração de troponina T no sangue também pode ocorrer em outros casos clínicos como insuficiência cardíaca, cardiomiopatia, contusão cardíaca, miocardite, insuficiência renal, embolia pulmonar, acidente vascular cerebral (AVC) entre outros.

Recentemente, devido à necessidade de métodos rápidos para a medição quantitativa de cTnT, foram desenvolvidos imunoenaios de eletroquimiluminescência e sondas para a introdução na aplicação clínica de rotina. No entanto esses métodos exigem marcadores os quais envolvem inúmeras etapas, inclusive testes qualitativos⁵⁹.

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho está focado na investigação e caracterização de um material polimérico derivado do ácido 3-hidroxifenilacético, (3-HFA) e a sua posterior aplicação na construção de um imunossensor. O 3-HFA é um material eletroquimicamente ativo, de fórmula molecular $C_8H_8O_3$ e que apresenta em sua estrutura química dois grupos funcionais; uma hidroxila (-OH) e um grupamento aceto (-CH₂COOH) como mostra a Figura 2.1:

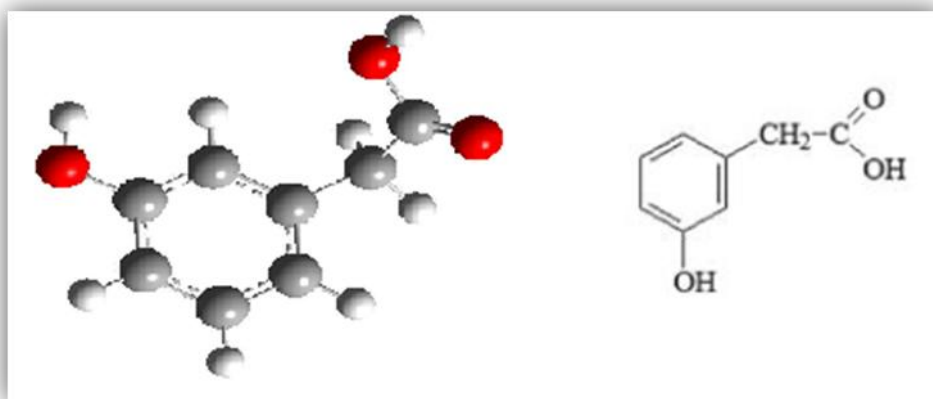


Figura 2.1: Estrutura do ácido 3-hidroxifenilacético.

Os grupamentos hidroxila e aceto podem interagir com biomoléculas devido à sua polaridade e reatividade, formando ligações com estas, o que confere maior estabilidade na construção de biossensores e diminui os efeitos de lixiviação da sonda.

Sabe-se que as propriedades físicas e químicas do material polimérico formado dependem fortemente das condições nas quais ele foi sintetizado, tais como técnicas eletroquímicas, utilização de solventes específicos e pH do meio reacional. Desta forma, foi investigada a síntese e caracterização eletroquímica do poli(ácido 3-hidroxifenilacético) ou poli(3-HFA), bem como a extração deste polímero e caracterização por técnicas como: Espectroscopia no Ultravioleta / Visível (UV/Vis.), Fluorescência, Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Análise Termogravimétrica (TGA) e Difração de Raios X (DRX). Estes estudos foram realizados no sentido de contribuir para o entendimento da estrutura deste material, bem como a visualização de possíveis aplicações, sendo que a principal delas está voltada para a construção de um imunossensor para o diagnóstico do infarto do miocárdio.

As plataformas de poli(3-HFA) foram avaliadas na construção do referido imunossensor. O reconhecimento da interação entre o antígeno (troponina T) específico para o infarto do miocárdio e o anticorpo (anti-troponina T) imobilizado na superfície do eletrodo de grafite modificado com poli(3-HFA) ou EG/3-HFA, foi conduzido por medidas de Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) em soluções de cloreto de hexaaminrutênio II e ferro/ferricianeto de potássio.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar experimentalmente a curva de titulação do 3-HFA;
- Eletropolimerizar o 3-HFA sobre eletrodos de grafite, em função do pH do meio reacional;
- Caracterizar por métodos eletroquímicos o poli(3-HFA) eletropolimerizado em diferentes valores de pH;
- Caracterizar o 3-HFA por UV/Vis, Fluorescência, TGA, DRX e FTIR;
- Extrair e caracterizar o poli(3-HFA) por UV/Vis , Fluorescência, TGA, DRX e FTIR;
- Incorporar e detectar anti-troponina T aos eletrodos modificados;

- Detectar a interação entre sonda (EG/3-HFA com anti-troponina T imobilizada em sua superfície) e o alvo (troponina T) em diferentes indicadores: cloreto de hexaaminrutênio II e ferro/ferricianeto de potássio;
- Estudar o comportamento, sensibilidade e seletividade do biossensor construído.

3. Experimental

Todas as soluções utilizadas no procedimento de eletropolimerização bem como as de análise para 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 como recebidos. Para preparo das soluções aquosas, foi utilizada água ultra purificada em sistema Milli-Q com resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$.

3.1 Preparo das soluções

- **Solução de HClO₄ (0,50 mol.L⁻¹):** Foram pipetados 43,20 mL de HClO₄ concentrado (70%) e o volume foi transferido para um balão volumétrico de 1,00 L sendo completado com água deionizada.
- **Solução de NaOH (0,10 mol.L⁻¹):** Foram pesados 0,40 g de NaOH e transferidos para um balão volumétrico de 100,00 mL, sendo o volume completado com água deionizada.
- **Solução Padrão de NaOH (0,935 mol.L⁻¹):** Foram pesados 0,75 g de KHC₈H₄O₄ (biftalato de potássio) e adicionados a um balão volumétrico de 50,00 mL e o volume foi completado com água deionizada. Posteriormente, foi adicionado 3 gotas de fenolftaleína e titulou-se a solução obtida com solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹.

- **Solução de 3-HFA (0,10 mol.L⁻¹):** Foram pesados 0,38 g de 3-HFA e transferidos para um balão volumétrico de 25,00 mL sendo o volume completado com água deionizada.
- **Solução de 3-HFA (2,50 mmol. L⁻¹):** Foram pesados 0,0380 g de 3-HFA e transferidos para um balão de 100,00 mL e o volume foi ajustado com solução aquosa de HClO₄ 0,50 mol L⁻¹.
- **Solução de K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆.3H₂O (5,00 mmol.L⁻¹ contendo 0,10 mol.L⁻¹ de KCl):** Foram pesados 0,1646 g de K₃Fe(CN)₆, 0,2112 g de K₄Fe(CN)₆.3H₂O e 0,7484 g de KCl. As massas foram transferidas para um balão volumétrico de 100,00 mL e o volume completado com água deionizada.
- **Solução de K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆.3H₂O (2,5 mmol.L⁻¹ contendo 0,05 mol.L⁻¹ de KCl):** Foram pesados 0,02469 g de K₃Fe(CN)₆, 0,02639 g de K₄Fe(CN)₆.3H₂O e 0,0932 g de KCl. As massas foram transferidas para um balão volumétrico de 25,00 mL e o volume completado com água deionizada.
- **Solução de K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆.3H₂O (0,33 mmol.L⁻¹ contendo 6,6 mmol.L⁻¹ de KCl):** Foram pesados 0,1646 g de K₃Fe(CN)₆, 0,2112 g de K₄Fe(CN)₆.3H₂O e 0,7484 g de KCl. As massas foram transferidas para um balão volumétrico de 100,00 mL e o volume completado com água deionizada. Em seguida, as soluções foram diluídas para as concentrações desejadas.
- **Solução de [Ru(NH₃)₆]Cl₂ (5,00 mmol.L⁻¹ contendo 0,1 mol.L⁻¹ de KCl):** Foram pesados 0,0343 g de [Ru(NH₃)₆]Cl₂ e 0,1864 g de KCl. As massas foram transferidas para um balão de 25,00 mL e o volume completado com água deionizada.
- **Solução de [Ru(NH₃)₆]Cl₂ (2,5 mmol.L⁻¹ contendo 0,05 mol.L⁻¹ de KCl):** Foram pesados 0,0171 g de [Ru(NH₃)₆]Cl₂ e 0,0932 g de KCl. As massas foram

transferidas para um balão de 25,00 mL e o volume completado com água deionizada.

- **Solução de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$ ($16,00 \mu\text{mol.L}^{-1}$ contendo $0,32 \text{ mmol.L}^{-1}$ de KCl):** Foram pesados 0,0343 g de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$ e 0,1864 g de KCl . As massas foram transferidas para um balão de 25,00 mL e o volume completado com água deionizada. Em seguida, as soluções foram diluídas para as concentrações desejadas.
- **Solução Tampão Fosfato (PBS) ($0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,40):** Foram pesadas 0,72 g de Na_2HPO_4 , 0,12 g de KH_2PO_4 , 4,00 g de NaCl e 0,10 g de KCl. As massas foram transferidas para um balão volumétrico de 500,00 mL 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 $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$.
- **Solução de BSA (0,5 %):** Foram pesados 0,05 g de Albumina de Soro Bovino (BSA) e transferiu-se para um balão volumétrico de 10,00 mL e o volume foi ajustado com solução de PBS.
- **Solução de troponina T ($0,83 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$):** As amostras do antígeno foram preparadas a partir de diluições da solução estoque adquirida pela Sigma Aldrich®. Desta forma, pipetou-se 2,00 μL da solução mãe ($100,00 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$) e completou-se com PBS para o volume final de 241,00 μL .
- **Solução de anti-troponina T ($0,28 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$):** As amostras do anticorpo específico foram preparadas a partir da diluição da solução estoque adquirida pela Sigma Aldrich®. Assim, pipetou-se 16,87 μL da solução mãe ($4,00 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$) e completou-se com solução PBS para o volume final de 241,00 μL .
- **Solução de anti-troponina I ($0,83 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$):** As amostras do anticorpo não-específico (contraprova) foram preparadas a partir da diluição da solução estoque fornecida pelo INGEB-UFU. Assim, pipetou-se 25,00 μL da solução mãe ($18,00 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$) e completou-se com solução PBS para o volume final de 542,17 μL .

3.2 Determinação dos pKa's do 3-HFA

Para a determinação dos pKa's do 3-HFA utilizou-se 20,00 mL da solução de 3-HFA $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ como solução titulada e solução padrão de NaOH $0,935 \text{ mol.L}^{-1}$ como titulante. Os valores de pKa's obtidos foram calculados pelo programa CurTiPot® 3.2.

3.3 Descrição dos eletrodos e potenciostatos utilizados

Como eletrodos de trabalho, foram utilizados eletrodos de grafite de 6,15 mm de diâmetro e eletrodos de grafite em barra. O grafite adquirido foi colado sobre o latão com cola de prata. Após o tempo de cura da cola de prata, estimado em aproximadamente 24 h, os espaços vazios entre a base e o teflon foram preenchidos com cola Araldite® 24 h. Após o período de 24 h, os eletrodos foram lixados primeiramente em lixa d'água 200 e em seguida 1200 para remover o excesso de Araldite® e promover o polimento da superfície do eletrodo. Posteriormente estes eletrodos foram polidos com suspensão aquosa de alumina $0,3 \text{ }\mu\text{m}$ sobre feltro e, em seguida, limpos em água deionizada e mantidos por 10 minutos em banho de ultrassom, enxaguados novamente com água deionizada em abundância e secos com N_2 ultra puro. Finalmente os eletrodos de grafite foram conectados ao suporte de base para utilização.



Figura 3.1: Barras de grafite e eletrodo de grafite, comparados a uma moeda.

Eletrodos de Ag/AgCl, KCl (3,00 mol.L⁻¹) e placa de platina (área 2 cm²) 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.



Figura 3.2: Eletrodo de grafite conectado a base, eletrodo auxiliar de platina e eletrodo de referência Ag/AgCl, comparados a uma caneta esferográfica.

3.4 Eletropolimerização do 3-HFA

Para eletropolimerização do 3-HFA foi utilizada célula eletroquímica de três compartimentos, com volume total de trabalho de aproximadamente 25 mL. A eletropolimerização foi realizada por voltametria cíclica. Foram realizados 100 ciclos de potencial com velocidade de varredura de 50 mV.s⁻¹, na faixa de potencial de -0,70 a +1,20 V para as soluções contendo o monômero 3-HFA nos pH's 0,0 e 6,5; para a solução monomérica de pH 12,0 a faixa foi de -0,7 a +0,8 V. Nas investigações da eletropolimerização em função do pH, utilizou-se o mesmo procedimento, contudo as soluções de 3-HFA foram ajustadas para os respectivos pH de análise com cristais de NaOH. Os valores de pH selecionados foram: 0,0; 6,5 e 12,0. Foram mantidos constantes a velocidade de varredura e o número de ciclos. Todos os experimentos foram realizados a temperatura ambiente (25 ± 1°C).

Após eletropolimerização, os eletrodos contendo os filmes poliméricos de poli(3-HFA) foram lavados com água deionizada e secos sob fluxo de N₂ ultra puro. Posteriormente, os eletrodos foram mergulhados em solução contendo somente solução

de HClO_4 na ausência do monômero, e 10 ciclos voltamétricos foram realizados na mesma faixa de eletropolimerização para remoção do monômero residual.

Análises do comportamento eletroquímico do eletrodo de grafite modificado com poli(3-HFA), 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 $-0,10$ a $+0,50$ V e em solução de HClO_4 na faixa de $+0,00$ a $+1,00$ V. Quando avaliado o comportamento do eletrodo modificado com 3-HFA eletropolimerizado em valores de pH 6,50 e 12,0, a solução de HClO_4 foi ajustada para o respectivo pH, utilizando-se NaOH , e as faixas de varredura foram de $+0,00$ a $+1,00$ V para todos os 3 valores de pH.

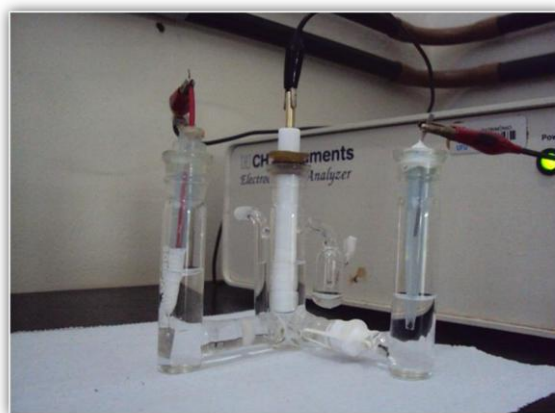


Figura 3.3: Célula eletroquímica de 3 compartimentos contendo os eletrodos de trabalho, auxiliar e referência Ag/AgCl , conectados ao potenciostato.

3.5 Propriedades de troca iônica

As propriedades de troca iônica para os eletrodos de grafite e os EG/3-HFA foram investigadas pelo estudo da reação de transferência eletrônica nas superfícies modificadas utilizando-se dois diferentes pares redox, denominados ferro/ferricianeto de potássio (sonda redox negativa) e cloreto de hexaaminrutênio (II) (sonda redox positiva). Medidas de voltametria cíclica foram conduzidas em $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ na faixa de potencial de $-0,10$ a $+0,50\text{V}$ e de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2$ na faixa de potencial de $-0,40$ a $+0,10\text{V}$. 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, visando verificar a contribuição da eletroatividade dos filmes poliméricos no processo de transferência eletrônica dos pares redox utilizados.

3.6 Extração do poli(3-HFA)

O procedimento para eletrogeração do poli(3-HFA) em quantidade suficiente para que se pudesse realizar análises químicas foi análogo ao descrito no item 3.4. Foram utilizados 100 ciclos de potencial, cobrindo-se o intervalo de potencial de -0,70 a +1,20 V, com velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} sobre eletrodos de barra de grafite, com área geométrica de aproximadamente $6,21 \text{ cm}^2$. Eletrodos de platina e Ag/AgCl, KCl ($3,00 \text{ mol.L}^{-1}$) 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 polímeros foram extraídos das barras de grafite com acetonitrila P.A., secos com cristais de Na_2SO_4 anidro e concentrados em rotaevaporador. O material sólido coletado foi então utilizado para as análises de caracterização, sendo este mantido protegido da luz e umidade em dessecador sob vácuo durante o período de utilização do material para as análises. O material polimérico extraído e utilizado para as análises de caracterização foi eletropolimerizado somente em pH ácido (0,0).

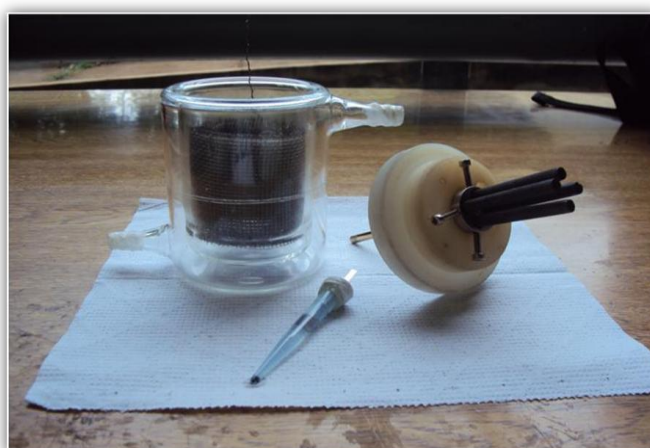


Figura 3.4: Célula eletroquímica de extração de 1 compartimento, eletrodos de grafite em barra e eletrodo de referência Ag/AgCl.

3.7 Espectroscopia no Ultravioleta/Visível (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 1,00 cm. Acetonitrila P.A. e soluções de HClO_4 0,5 mol.L⁻¹ (ajustada para os 3 pH's de trabalho) foram utilizadas como solventes para as amostras analisadas.

3.8 Espectroscopia de Fluorescência

Os respectivos espectros de fluorescência para o 3-HFA e para o poli(3-HFA) extraído foram registrados utilizando-se acetonitrila P.A. como solvente.

Todos os espectros de fluorescência foram realizados à temperatura ambiente utilizando-se Fluorímetro Hitachi modelo F-4500.

3.9 Análise Termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica foi analisada através de Termogravimetria (TGA), conduzida sobre atmosfera de nitrogênio (70 cm³ min⁻¹), com taxa de aquecimento de 5,0 °C min⁻¹ de 25 a 600 °C em equipamento SDT da TA Instruments.

3.10 Difração de Raios X (DRX)

As análises de Difração de Raios X (DRX) foram realizadas em equipamento X-Ray Diffractometer modelo XRD-6000 da Shimadzu. A radiação utilizada foi a $K\alpha$ do Cu, o ângulo de espalhamento foi de 5 a 80 θ com velocidade de varredura de 4° min.⁻¹.

3.11 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

Espectros de FTIR para o 3-HFA e para o poli(3-HFA) foram obtidos em pastilhas de KBr, em faixa de comprimento de onda de 500 a 4500 cm^{-1} , utilizando-se 20 ciclos e resolução de 4 cm^{-1} . O equipamento utilizado foi o IR Prestige-21 da Shimadzu.

3.12 Procedimento de construção do Imunossensor para diagnóstico do Infarto Agudo do Miocárdio (IAM)

3.12.1 Imobilização e detecção das biomoléculas

Os eletrodos que foram utilizados nas análises de detecção da interação das biomoléculas foram previamente modificados com poli(3-HFA) eletropolimerizado em pH ácido (0,0).

Portanto, os eletrodos modificados com poli(3-HFA) ou EG/3-HFA selecionados para imobilização e detecção das biomoléculas foram submetidos a medidas de Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) em PBS 0,1 mol.L^{-1} para registrar a linha de base. Após o procedimento, os eletrodos foram retirados da solução tampão, lavados em água deionizada e secos com N_2 ultra puro.

Depois de registrados os VPD da estabilização da linha base dos EG/3-HFA, o anticorpo foi imobilizado sobre a superfície funcionalizada. Para este procedimento, 18,0 μL da solução de anti-troponina T, foram adicionadas sobre a superfície do eletrodo e o mesmo foi mantido a 25°C em estufa, por 20 minutos, até evaporação do solvente. Posteriormente o eletrodo foi lavado em PBS 0,1 mol.L^{-1} por 6 segundos e seco com N_2 ultra puro. Em seguida, gotejou-se na superfície do eletrodo, contendo o anticorpo imobilizado, 18,0 μL da solução de BSA 0,5%, repetindo-se o procedimento realizado para a imobilização do anticorpo. A realização desta etapa garante o bloqueio da superfície do eletrodo contra adsorções inespecíficas. Posteriormente, realizou-se imobilização dos alvos: específico (troponina T) e não-específico (anti-troponina I) para o infarto agudo do miocárdio. Adicionou-se 18,0 μL de cada alvo sobre a superfície dos eletrodos contendo anti-troponina T/BSA, por um período de 20 minutos a 25°C, para

promover a reação de formação do complexo antígeno-anticorpo. Os imunossensores foram lavados por 6 segundos, em PBS 0,1mol.L⁻¹ e secos com N₂ ultra puro.

Medidas de VPD em soluções de ferro/ferricianeto de potássio e cloreto de hexaaminrutênio II foram utilizadas para detecção da interação entre as biomoléculas dos eletrodos contendo: Ac/BSA; Ac/BSA/Ag⁺ (Ag⁺ → alvo específico) e Ac/BSA/Ag⁻ (Ag⁻ → alvo não-específico).

Todos os experimentos de detecção das biomoléculas foram realizados em célula eletroquímica de um compartimento, com capacidade total aproximadamente 1mL.

4. Resultados e discussões

4.1. Determinação dos pKa's do 3-HFA

A escolha dos diferentes pH's nos quais os experimentos foram realizados deu-se através da construção da curva de titulação do 3-HFA:

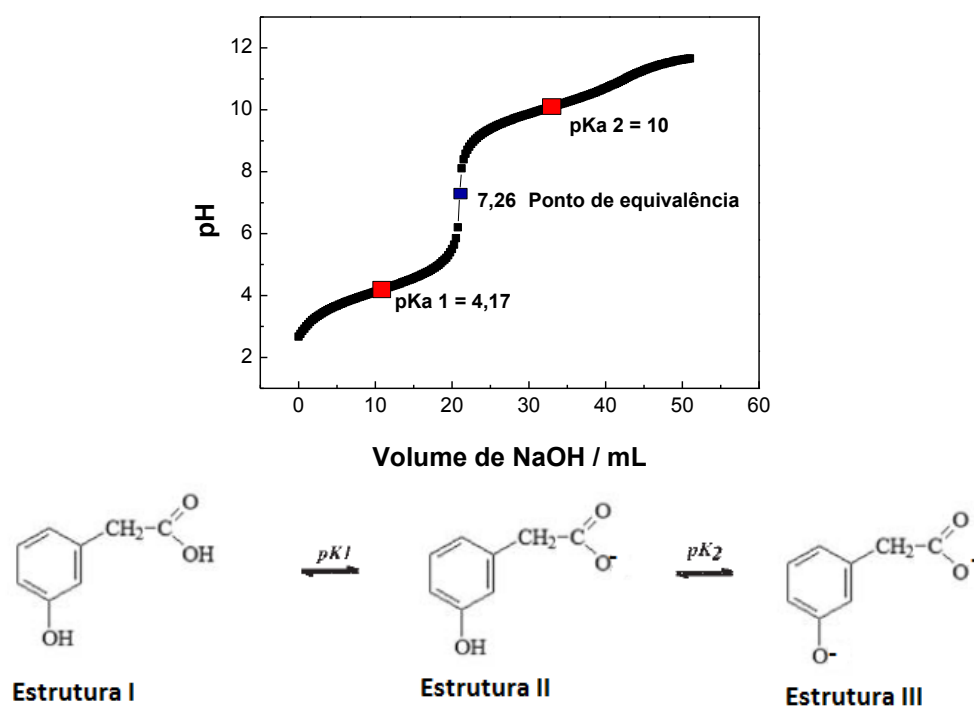


Figura 4.1: Curva de titulação de 20,0 mL de 3-HFA (0,1 mol.L⁻¹) com solução padrão de NaOH (0,935 mol.L⁻¹). Estruturas de equilíbrio entre pKa's do 3-HFA.

Em um meio fortemente ácido, o 3-HFA encontra-se na forma neutra (estrutura I). Com o aumento do pH ocorre a desprotonação do grupamento carboxila (estrutura II). Quando o pH se torna igual ao pK_{a1} , as concentrações das formas protonadas e desprotonadas são equivalentes (estruturas I e II). Quando o valor do pH for igual ao ponto de equivalência ($pH = 7,26$) ocorrerá somente a estrutura II na solução. O aumento do pH ocasiona a desprotonação do grupamento fenólico. No pH igual ao pK_{a2} o equilíbrio equimolar fenol/fenóxido é estabilizado (estrutura II e III). Em um pH fortemente básico a concentração do íon fenóxido aumentará até que ocorra a conversão total (estrutura III).

Portanto, os pH's de trabalho escolhidos, além do pH inicial (0,0) foram 6,5 e 12,0 o que equivale, aproximadamente, a duas unidades acima do pK_{a1} e pK_{a2} , respectivamente. Este procedimento foi realizado no sentido de garantir que, ao preparar as 3 soluções, cada qual no seu respectivo pH, houvesse a predominância de cada uma das estruturas acima citadas; pH 0,0 predominância da estrutura I, pH 6,5 predominância da estrutura II e pH 12,0 predominância da estrutura III.

4.2 Voltametria cíclica

4.2.1 Preparação dos eletrodos

Antes dos procedimentos que serão descritos abaixo, inclusive os de eletropolimerização, os eletrodos de grafite foram selecionados e condicionados para o uso. O perfil do voltamograma cíclico padrão para os eletrodos a serem utilizados é mostrado na Figura 4.2.

Os parâmetros de interesse obtidos em um voltamograma cíclico são a relação das correntes de pico (I_{pc}/I_{pa}) e a separação dos potenciais de pico ($E_{pa} - E_{pc}$).

Utilizando-se o 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.L⁻¹ contendo KCl 0,10 mol.L⁻¹ 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 eletroquímico⁶⁰. Para uma reação reversível, os picos de corrente catódica (I_{pc}) e anódica (I_{pa}) são aproximadamente iguais em valores absolutos, mas com sinais opostos.

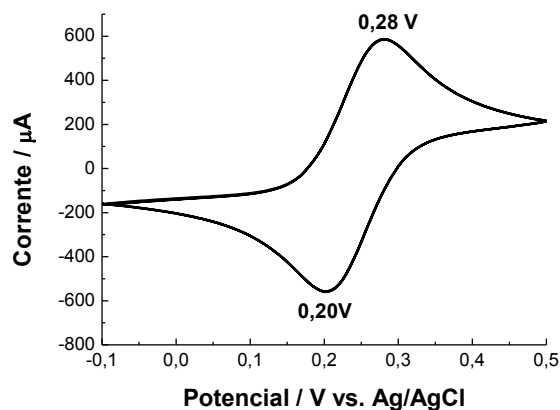


Figura 4.2: Voltamograma cíclico do eletrodo de grafite em solução 5,00 mmol.L⁻¹ K₄Fe(CN)₆/ K₃Fe(CN)₆ contendo 0,10 mol.L⁻¹ KCl; $\nu = 100 \text{ mV.s}^{-1}$. Eletrodo auxiliar de platina; Eletrodo de referência Ag/AgCl.

A Figura 4.2 mostra o comportamento eletroquímico típico do par redox ferro/ferricianeto de potássio sobre os eletrodos de grafite. Observa-se um ΔE de 0,08 V e uma relação entre corrente de pico anódico/corrente de pico catódico de 0,96. Este resultado satisfaz as condições acima estabelecidas.

4.2.2 Condicionamento dos eletrodos para eletropolimerização do 3-HFA

A obtenção do poli(3-HFA) foi realizada através de voltamogramas cíclicos consecutivos. Deste modo, para verificar que todo processo eletroquímico observado fosse resultante da eletropolimerização do 3-HFA, um procedimento de varredura de potencial na região de formação do material polimérico foi realizado para o eletrodo de grafite somente em contato com o eletrólito suporte, ou seja, na ausência do 3-HFA. A Figura 4.3 descreve o comportamento eletroquímico do eletrodo de grafite através de 1 ciclo de varredura de potencial em solução de HClO₄ 0,50 mol.L⁻¹. Este procedimento foi realizado para os 3 valores de pH's estudados.

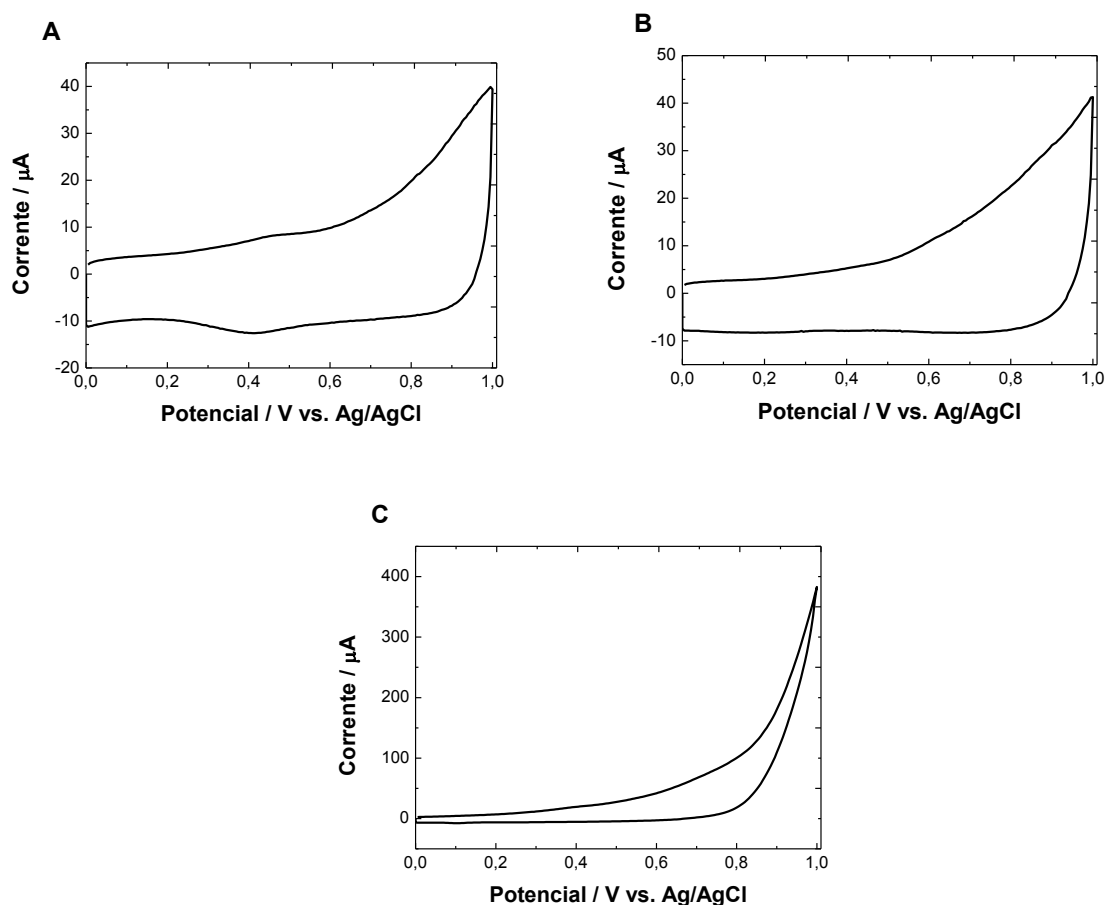


Figura 4.3: Voltamograma cíclico do eletrodo de grafite em solução HClO_4 $0,50 \text{ mmol.L}^{-1}$, após 1 ciclo voltamétrico. Em (A) $\text{pH} = 0,0$; (B) $\text{pH} = 6,5$ e (C) $\text{pH} = 12,0$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Com relação ao parâmetro de condicionamento, os eletrodos foram submetidos a sucessivos ciclos de varredura de potencial na região de $+0,00$ a $+1,00 \text{ V}$, em solução de HClO_4 $0,50 \text{ mol.L}^{-1}$. Isto garante uma limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo para melhor utilização no processo de eletropolimerização. Foi observado que os perfis voltamétricos das soluções de pH 's $0,0$ e $6,5$ são parecidos sendo que no caso onde o $\text{pH} = 6,5$ houve um ligeiro aumento de corrente. Diferentemente da solução onde o $\text{pH} = 12,0$, pois para a mesma faixa de potencial ($+0,00$ a $+1,0 \text{ V}$) obteve-se valores de correntes próximos à $400 \mu\text{A}$. Este fato deve-se à provável alteração da superfície e a alta concentração de hidroxilas no meio reacional.

4.2.3 Investigação da influência do pH nos parâmetros voltamétricos

Foi realizada uma investigação da região de atividade eletroquímica do 3-HFA nos 3 diferentes valores de pH propostos. Desta forma, investigações preliminares sobre o comportamento eletroquímico do 3-HFA foram realizadas sobre eletrodos de grafite utilizando-se ácido perclórico como eletrólito suporte. A Figura 4.4 mostra o voltamograma cíclico referente ao primeiro ciclo de varredura do 3-HFA em cada um dos pH's.

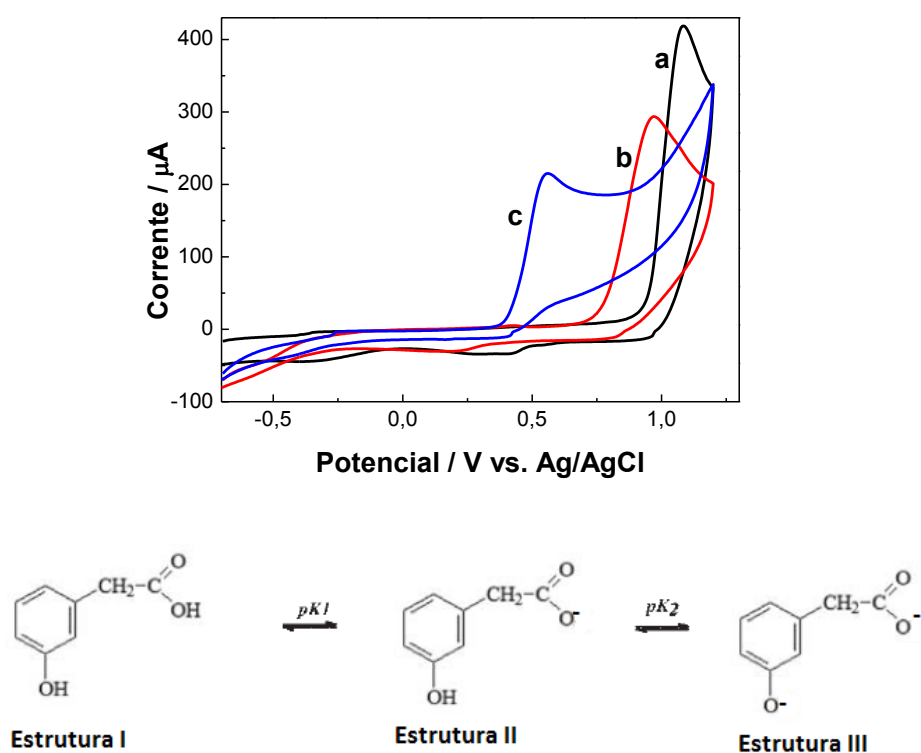


Figura 4.4: Voltamograma cíclico em solução $2,50 \text{ mmol.L}^{-1}$ de 3-HFA em diferentes valores de pH: (a) 0,0; (b) 6,5 e (c) 12,0 sobre eletrodo de grafite. Eletrólito suporte: HClO_4 $0,50 \text{ mol.L}^{-1}$; $\nu = 50 \text{ mV.s}^{-1}$. Estruturas de equilíbrio entre pK_a 's do 3-HFA.

Pode-se observar que, para cada um dos diferentes pH's: 0,0 6,5 e 12,0, aparecem as correntes de pico da oxidação eletroquímica do 3-HFA nos potenciais de pico + 1,05 V, + 0,91 V e 0,50 V, respectivamente.

A diminuição dos valores de potenciais de oxidação com o aumento do pH ocorre devido à diferença das estruturas do 3-HFA que estão presentes em cada uma das diferentes soluções.

Na solução onde $\text{pH} = 0,0$ a estrutura do 3-HFA encontra-se na forma neutra. Já na solução onde $\text{pH} = 6,5$ o 3-HFA já sofreu a sua primeira desprotonação, portanto a estrutura presente no meio é o ânion carboxilato (estrutura II). E no $\text{pH} = 12,0$ o 3-HFA sofre a sua segunda desprotonação e a estrutura presente no meio é o ânion fenolato correspondente (estrutura III).

Observa-se que o potencial necessário para a oxidação do monômero em meio básico ($\text{pH} 12,0$) 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 eletropolimerização com a formação do primeiro cátion-radical.

4.2.4 Eletropolimerização do 3-HFA

Diante da avaliação dos parâmetros descritos acima, investigações sobre a eletropolimerização do 3-HFA em concentração de $2,50 \text{ mmol.L}^{-1}$ foram realizadas utilizando-se 100 ciclos de potencial na faixa de $-0,7$ a $+1,20 \text{ V}$ contendo solução $0,50 \text{ mol.L}^{-1}$ de HClO_4 como eletrólito suporte. A velocidade de varredura utilizada foi de 50 mV.s^{-1} . Este procedimento foi realizado para os três pH's propostos. A Figura 4.5 mostra os voltamogramas cíclicos referentes aos sucessivos ciclos de potencial do 3-HFA nos três casos:

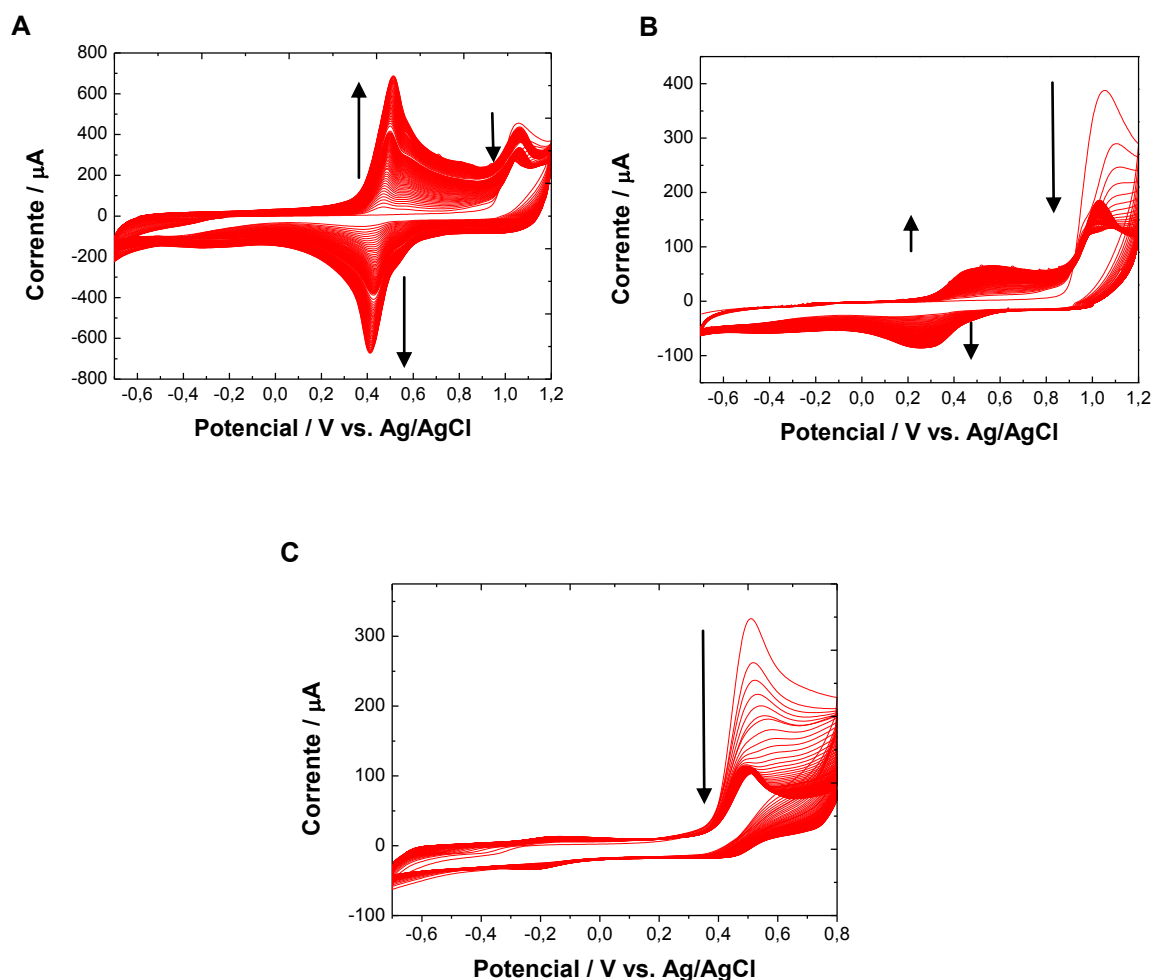


Figura 4.5: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de grafite, depois de sucessivas varreduras de potencial, 100 ciclos, 50 mV.s^{-1} , em HClO_4 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$; solução de 3-HFA $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$; em (A) pH = 0,0; (B) pH = 6,5 e (C) pH = 12,0. As setas indicam o comportamento da corrente com as consecutivas varreduras de potencial.

A Figura 4.5 mostra que o primeiro ciclo de oxidação do monômero para os três valores de pH investigados ocorre em potenciais diferentes, sendo que quanto maior o valor de pH menor será o valor do potencial de oxidação.

Diferentemente dos casos onde o pH do meio reacional era 0,0 (Figura 4.5 A) e pH 6,5 (Figura 4.5 B), no pH 12,0 (Figura 4.5 C) a faixa de potencial utilizada foi de -0,7 a +0,8 V pois neste caso, o valor do potencial de pico do primeiro ciclo de oxidação

é bem menor quando comparado aos dois casos anteriores, o que torna desnecessário utilizar a mesma faixa dos pH's ácido e neutro.

Pode-se observar a oxidação do monômero em cerca de + 1,05 V (Figura 4.5 A), + 0,91 V (Figura 4.5 B) e + 0,50 V (Figura 4.5 C), os quais se referem à formação do cátion-radical, sendo evidente que à medida que se aumenta o número de ciclos de potencial há um decréscimo nos valores das correntes de pico e ligeiro aumento nos potenciais de oxidação. O ligeiro aumento dos potenciais de oxidação deve-se à formação do material derivado do 3-HFA na superfície do eletrodo que, consequentemente, dificulta o fluxo de elétrons que promovem a oxidação do monômero.

O decréscimo dos valores de corrente de pico do monômero está relacionado ao consumo deste próximo à superfície do eletrodo, para que ocorra a formação e deposição do material resultante da eletropolimerização do 3-HFA. Na Figura 4.5(A) observa-se que com o aumento dos ciclos surge o aparecimento de dois picos, um de oxidação e outro de redução, localizados em +0,52 e +0,41 V, respectivamente. Este processo redox reversível mostra 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 4.5(B), com as ondas de oxidação e redução localizadas em 0,30 e 0,16V, respectivamente; com o aumento nas correntes de picos indicando de modo análogo, a formação de material eletroativo. Entretanto, na Figura 4.5(C) observa-se a eletrooxidação do monômero em pH 12,0 mas nenhum par redox é observado, ocorrendo somente uma diminuição da corrente de pico de oxidação do cátion-radical, indicando a formação de material eletroinativo na superfície do eletrodo.

4.2.6 Comportamento eletroquímico dos filmes de poli(3-HFA)

Após o procedimento de eletropolimerização os eletrodos de grafite modificados com filmes poliméricos de poli(3-HFA), foram submetidos a ciclos de potencial, na mesma faixa dos parâmetros da Figura 4.5. Este procedimento visa à remoção do monômero residual que possivelmente ficou retido na estrutura do filme polimérico durante a eletropolimerização. A Figura 4.6 mostra 10 ciclos de varredura de potencial obtidos para o eletrodo modificado com poli(3-HFA) somente em solução do eletrólito

suporte nos 3 valores de pH. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos após o eletrodo de grafite modificado com poli(3-HFA) ter sido retirado da solução monomérica, lavado em água deionizada e seco com N₂ ultra puro.

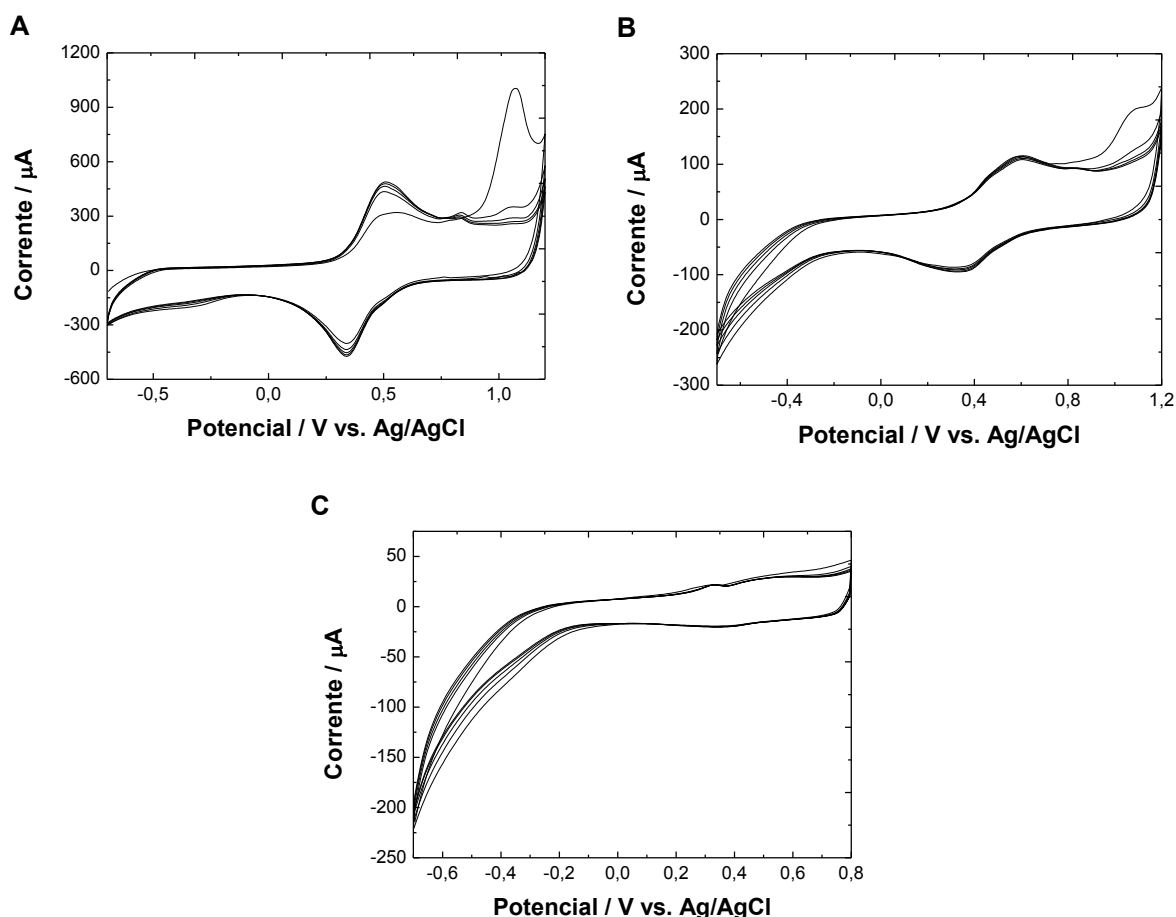


Figura 4.6: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de grafite modificados com poli(3-HFA) após eletropolimerização, somente em solução de HClO₄ 0,50 mol.L⁻¹. Número de ciclos = 10. Em (A) pH = 0,0; (B) pH = 6,5 e (C) pH = 12,0; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Observa-se que há no primeiro ciclo de potencial uma forte intensidade de corrente de pico anódico em (A) e (B), que diminui significativamente após o segundo ciclo de varredura de potencial, ficando evidente o processo de oxidação referente ao monômero. No caso de (C), não são observadas mudanças significativas, o que sustenta a proposta de que não se forma material eletroativo na superfície do eletrodo quando o pH = 12,0. Em (A) e (B) o monômero residual pode ter 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 subseqüentes. A modificação do eletrodo de grafite é confirmada quando se compara os perfis eletroquímicos dos eletrodos de grafite e dos eletrodos de grafite modificados poli(3-HFA). A Figura 4.7 mostra a região de atividade eletroquímica dos eletrodos modificados com poli(3-HFA) comparados ao dos eletrodos não modificados, nos 3 pH's estudados.

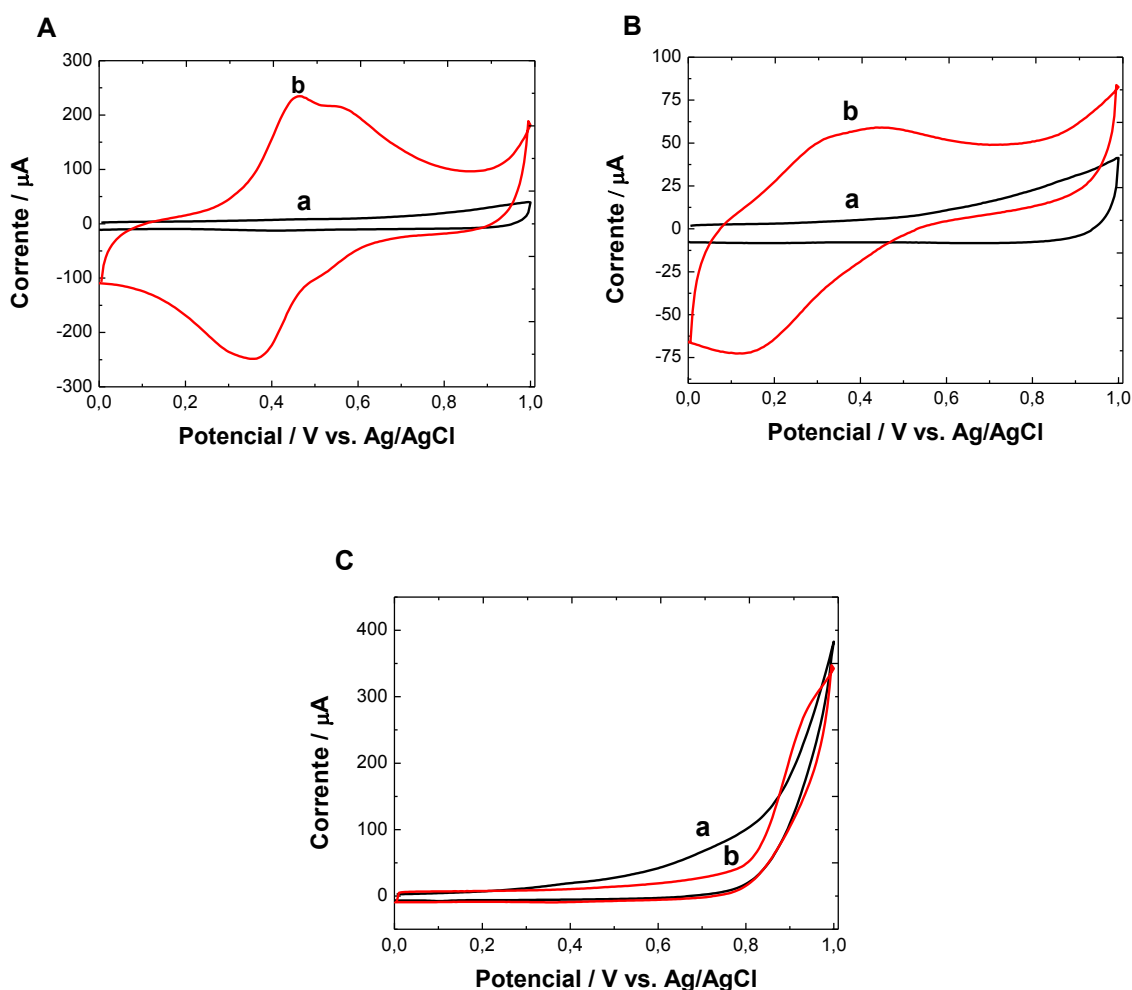


Figura 4.7: Voltamogramas cíclicos obtidos após eletropolimerização, somente em solução de HClO_4 $0,50 \text{ mol.L}^{-1}$, na ausência do monômero, para os eletrodos de grafite: (a) não-modificado e (b) modificados com poli(3-HFA). Em (A) $\text{pH} = 0,0$ (B) $\text{pH} = 6,5$ e (C) $\text{pH} = 12,0$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Pode-se observar nitidamente que há modificação na superfície do eletrodo de grafite após o procedimento de eletropolimerização em (A) e (B). Os valores de corrente aumentam consideravelmente nos dois casos, além disso, também é possível observar os picos de oxidação e redução representativos dos materiais eletroativos, que neste caso é o poli(3-HFA). Este fato implica que o material eletropolimerizado fica imobilizado sobre a superfície do eletrodo. E, como mencionado anteriormente, em (C) não são observadas mudanças significativas na superfície do eletrodo após os ciclos de polimerização.

4.2.7 Influência dos pares redox $\text{Fe(CN)}_6^{3-}/\text{Fe(CN)}_6^{4-}$ e $\text{Ru(NH}_3)_6^{2+}$ no comportamento eletroquímico do poli(3-HFA)

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 investigação⁶¹⁻⁶⁷.

Com o intuito de investigar as propriedades de troca iônica dos filmes poliméricos de poli(3-HFA), voltamogramas cíclicos foram registrados em soluções 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(3-HFA) com as sondas redox, fornece importantes informações sobre a 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(3-HFA)⁶⁸. A Tabela 2 mostra as principais diferenças obtidas entre as sondas aniônicas e catiônicas.

Tabela 2: Principais diferenças entre valores de corrente (I) e potencial (E), encontrados para a sonda aniônica e catiônica; onde **a**: eletrodo de grafite; **b**: EG/3-HFA modificado no pH = 0,0 ; **c**: EG/3-HFA modificado no pH = 6,5 e **d**: EG/3-HFA modificado no pH = 12,0.

	SONDA ANIÔNICA $\text{Fe(CN)}_6^{3-}/\text{Fe(CN)}_6^{4-}$				SONDA CATIÔNICA $\text{Ru(NH}_3)_6^{2+}$			
	a	b	c	d	a	b	c	d
I_{pa} / μA	584,16	122,16	201,68	366,13	179,0	421,65	422,61	1145,33
I_{pc} / μA	-558,61	-117,44	-180,41	-335,81	-228,72	-717,35	-787,32	-1364,41
I_{pc}/I_{pa}	0,96	0,96	0,89	0,91	1,27	1,70	1,86	1,19
E_{pa} / V	0,28	0,31	0,34	0,28	-0,09	-0,21	-0,23	-0,18
E_{pc} / V	0,20	0,19	0,15	0,20	-0,15	-0,31	-0,30	-0,38
ΔE ($E_{pa}-E_{pc}$) / V	0,08	0,12	0,19	0,08	0,06	0,1	0,07	0,2

A técnica utilizada para investigar as propriedades de bloqueio do filme de poli(3-HFA), utilizando a difusão dos pares redox como sonda, foi a voltametria cíclica. A Figura 4.8 mostra os voltamogramas cíclicos dos eletrodos de grafite e os eletrodos de grafite modificados com poli(3-HFA) ou EG/3-HFA em solução 5,00 mmol.L⁻¹ ferro/ferricianeto de potássio contendo 0,10 mol.L⁻¹ de KCl como eletrólito suporte em velocidade de varredura de 100 mV.s⁻¹. Este ensaio foi realizado para os EG/3-HFA eletropolimerizados nos três diferentes valores de pH e também para o eletrodo de grafite limpo.

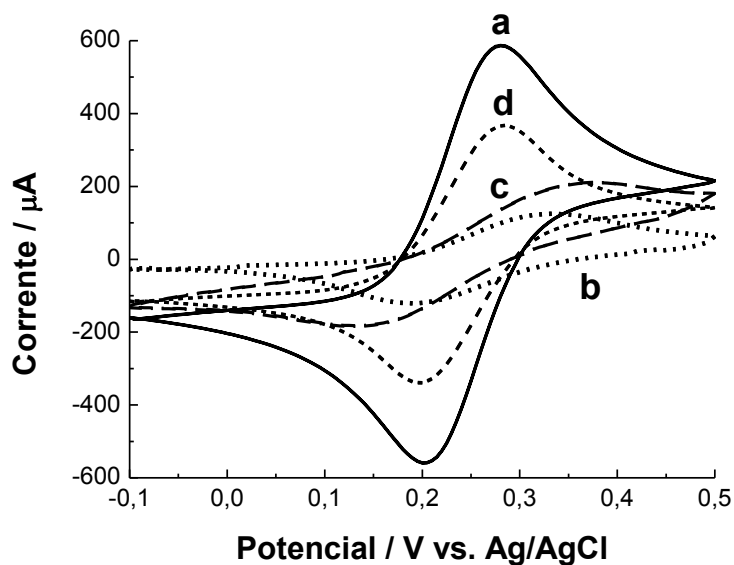


Figura 4.8: Voltamogramas cíclicos obtidos para medidas das propriedades de troca aniônica dos eletrodos: (a) eletrodo de grafite; (b) EG/3-HFA no pH = 0,0; (c) EG/3-HFA no pH = 6,5 e (d) EG/3-HFA no pH = 12,0 em solução aquosa de 5,00 mmol.L⁻¹ de K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆ contendo KCl 0,10 mol.L⁻¹; $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$.

De acordo com a Figura 4.8, o eletrodo de grafite mostra um comportamento reversível ($\Delta E = 80 \text{ mV}$) para o par redox (a), indicando que a reação de transferência eletrônica é controlada por difusão. Diferentemente do eletrodo não-modificado, para os eletrodos de grafite contendo poli(3-HFA) foi observado um $\Delta E = 132 \text{ mV}$ para o pH 0,0 (b), $\Delta E = 190 \text{ mV}$ para pH 6,5 (c) e $\Delta E = 90 \text{ mV}$ para pH 12,0 (d); indicando que a reação do par redox aniônico é dificultada. Portanto, os eletrodos modificados (b) e (c) provocam um aumento nos valores de potencial de oxidação e uma diminuição drástica dos valores de corrente devido a falta de afinidade entre o esqueleto polimérico e o par redox ferro/ferri.

Diante da análise da Figura 4.8, pode-se inferir que os EG/3-HFA inibem a reação do par redox aniônico. Este estudo sugere que o poli(3-HFA) apresenta um esqueleto polimérico aniônico, repulsando eletrostaticamente o ferro/ferricianeto de potássio e inibindo seu processo redox.

Portanto, no intuito de se estabelecer um estudo comparativo, realizou-se o mesmo procedimento, mas utilizando-se uma sonda catiônica; o que pode ser observado na Figura 4.9:

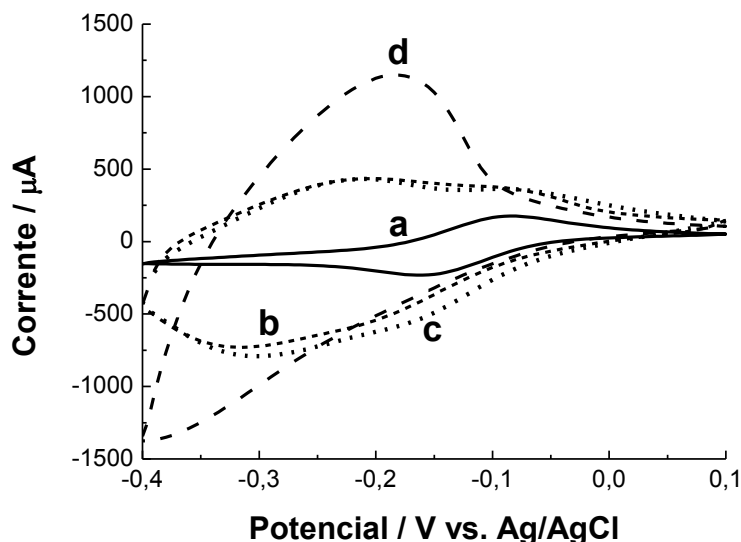


Figura 4.9: Voltamogramas cíclicos obtidos para medidas das propriedades de troca aniônica dos eletrodos: (a) eletrodo de grafite; (b) EG/ 3-HFA no pH = 0,0; (c) EG/3-HFA no pH = 6,5 e (d) EG/3-HFA no pH = 12,0 em solução aquosa de 5,00 mmol.L⁻¹ de Ru(NH₃)₆Cl₂ contendo KCl 0,10 mol.L⁻¹; $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$.

Foi observado um aumento de corrente de pico para todos os eletrodos modificados com poli(3-HFA), investigados em solução da sonda catiônica, além da diminuição dos valores de potenciais de pico de oxidação. Diferentemente de quando avaliados em solução aquosa contendo a sonda aniônica, na qual se observou uma inibição no processo de transferência eletrônica do par redox, dada pelas interações eletrostáticas entre o eletrodo modificado e as sondas redox.

Este tipo de interação eletrostática promove o transporte do complexo de rutênio para a superfície do eletrodo, resultando num aumento da corrente de pico para todos os valores de pH estudados. Isto pode ser enfatizado quando se compara o comportamento do poli(3-HFA) com o par redox ferro/ferricianeto de potássio, o qual resulta num comportamento inverso.

4.3 Espectroscopia no Ultravioleta/Visível (UV/Vis.)

A absorção molecular na região do ultravioleta e do visível depende da estrutura da molécula, por isso na prática, a espectrometria do ultravioleta se restringe a sistemas conjugados⁶⁹.

Sistemas conjugados são aqueles nos quais existem ligações covalentes duplas e simples alternadas na estrutura da molécula, por exemplo, em compostos aromáticos como o benzeno e os chamados alcadienos, que são compostos insaturados por alternância de ligações duplas e simples em sua estrutura.

As transições $n \rightarrow \pi^*$ (também chamadas Bandas R) de grupos cromóforos isolados são “proibidas” e as bandas de absorção correspondente são caracterizadas por baixa absortividade molar. Já as bandas atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ (Bandas K) aparecem no espectro de moléculas que contém estruturas conjugadas e moléculas aromáticas que possuem substituição cromofórica.

De acordo com a literatura, as bandas B (benzenóides) são características dos espectros de moléculas aromáticas e heteroaromáticas. O benzeno apresenta uma banda larga de absorção contendo picos múltiplos (estrutura fina) na região do ultravioleta: 184 nm ($E_{\text{máx.}}$ 60.000), 204 nm ($E_{\text{máx.}}$ 7.900) e 256 ($E_{\text{máx.}}$ 200). Estas bandas originam-se de transições $\pi \rightarrow \pi^*$. A banda intensa a 184 nm provém de uma transição permitida. Já as bandas mais fracas a 204 e 256 nm resultam de transições proibidas na molécula do benzeno, que apresenta intensa simetria⁶⁹.

A substituição no anel benzênico com grupos auxocrômicos (OH, NH₂, etc.) desloca as bandas do benzeno para comprimentos de onda maiores.

Quando se tem um grupo cromofórico ligado a um anel aromático, as bandas B são observadas em comprimentos de ondas maiores do que as bandas $\pi \rightarrow \pi^*$ mais intensas. Além disso, quando uma transição $n \rightarrow \pi^*$ aparece no espectro de um composto aromático que possui transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ (incluindo bandas B), a transição $n \rightarrow \pi^*$ é deslocada para comprimentos de onda maiores, e, inclusive, a estrutura fina característica das bandas B pode estar ausente no caso de compostos aromáticos substituídos⁶⁹. A Figura 4.10 mostra o espectro de absorção no UV/Vis. obtido para o 3-HFA solubilizado em soluções de diferentes valores de pH.

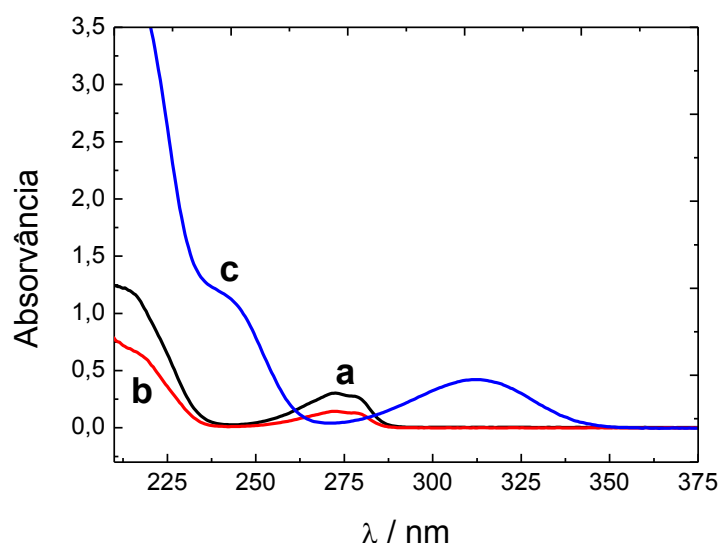


Figura 4.10: Espectro UV/Vis. do 3-HFA em solução HClO_4 $0,5 \text{ mol. L}^{-1}$ em diferentes pH's: (a) 0,0 ; (b) 6,5 e (c) 12,0.

O composto estudado apresenta em sua estrutura aromática, dois substituintes que atuam como grupamento cromofórico (aceto) e outro grupamento auxócromo (hidroxila fenólica). Esses grupamentos provocam o deslocamento das bandas características de absorção do benzeno para comprimentos de ondas maiores, o que é verificado na curva (a) da Figura 4.10.

Quando o 3-HFA perde um próton, gerando o ânion carboxilato (estrutura II, ver figura 4.1, pág.48) os elétrons não ligantes do oxigênio (ânion carboxilato) não está disponível para a interação com os elétrons π do anel aromático, portanto, a mudança para o pH 6,5 praticamente não altera o espectro de absorção em (b) quando comparado com o espectro de absorção em (a).

A conversão do ânion carboxilato (estrutura II) para o ânion fenolato correspondente (estrutura III) resulta em um deslocamento batocrômico das bandas e um aumento na $E_{\text{máx}}$, pois os elétrons não ligantes do ânion estão disponíveis para a conjugação com os elétrons π do anel.

A Tabela 3 relaciona as diferentes estruturas do 3-HFA, apresentadas na Figura 4.1, nos diferentes pH's, com os comprimentos de onda obtidos no espectro de UV/Vis. e os valores do primeiro ciclo dos potenciais de oxidação.

Tabela 3: Potencial de oxidação primeiro ciclo de oxidação do 3-HFA e comprimento de onda de absorção em função do pH do meio reacional.

Estrutura	pH	UV / λ (nm) monômero	$E_{p,a}$ / (V) monômero
I	Ácido (0,0)	274	1,05
II	Neutro (6,5)	274	0,91
III	Básico (12,0)	312	0,50

Realizou-se, adicionalmente, um estudo comparativo dos espectros de absorção no UV/Vis. do 3-HFA e do poli(3-HFA). O solvente utilizado nos ensaios foi acetonitrila P.A. A Figura 4.11 mostra os perfis de absorção de ambos compostos.

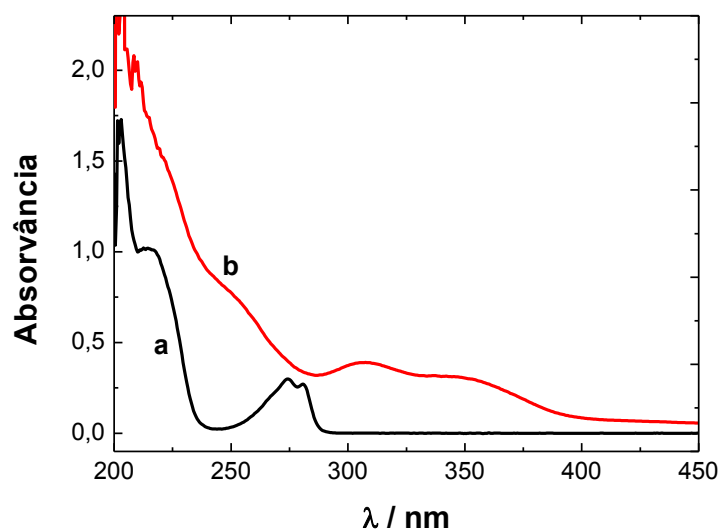


Figura 4.11: Espectro de absorção UV/Vis. obtido para: (a) 3-HFA e (b) poli(3-HFA) eletropolimerizado em pH ácido (0,0).

Como já mencionado anteriormente, a literatura descreve três bandas de absorção características para o benzeno em comprimentos de onda de 184, 204 e 246

nm, correspondentes a transições $\pi \rightarrow \pi^*$ que ocorrem nas ligações duplas alternadas do anel⁶⁹. Observando-se espectro de UV/Vis. do 3-HFA nota-se a presença de três bandas, porém, com deslocamento batocrômico. As bandas localizam-se em 202, 214 e 274 nm além do ombro em 281 nm.

Observa-se que no espectro de absorção do poli(3-HFA) ocorre um alargamento das bandas em comparação ao espectro de absorção do 3-HFA. Também é verificado um aumento na extensão de absorção do polímero da região do visível (acima de 350 nm). Este fato deve-se ao aumento da extensão de conjugação presente na estrutura do polímero eletrossintetizado. Portanto, a técnica de UV/Vis. mostrou-se eficiente para demonstrar a diferença existente entre as estruturas do 3-HFA e poli(3-HFA).

4.4 Espectroscopia de Fluorescência

Fluorescência é um processo de fotoluminescência no qual os átomos ou moléculas são excitados através da absorção de radiação eletromagnética. Com isso, as espécies excitadas retornam ao seu estado fundamental liberando seu excesso de energia na forma de fótons⁷⁰.

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 fluoróforo⁷¹. Os espectros de emissão para o 3-HFA e para o poli(3-HFA) são mostrados na Figura 4.12.

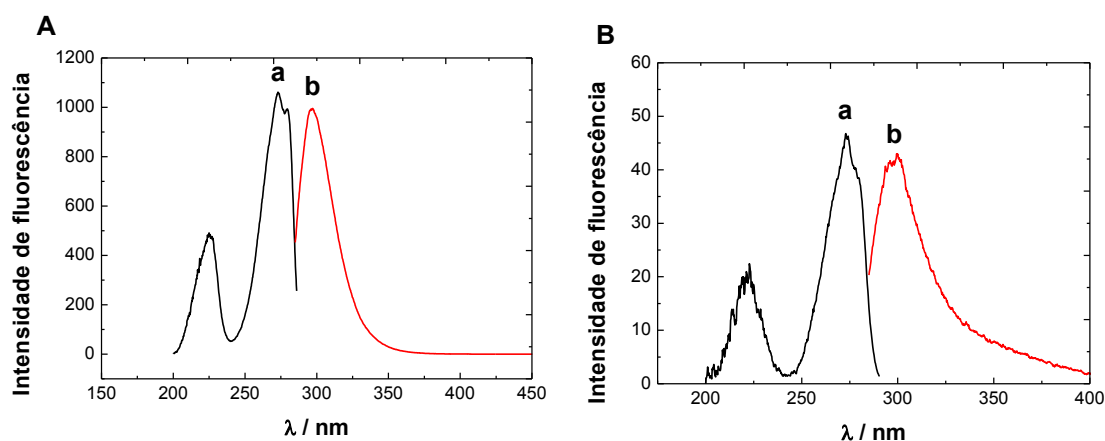


Figura 4.12: Espectros de (a) excitação e (b) emissão para: (A) 3-HFA e (B) poli(3-HFA) eletropolimerizado em pH ácido (0,0).

O espectro de emissão do 3-HFA mostra um pico em 295 nm, a excitação apresenta dois picos (225 nm e 273 nm). Para o poli(3-HFA) o pico de emissão ocorre em 300 nm e há dois picos, em 222 nm e 273 nm para o espectro de excitação.

O efeito batocrômico ocorre em aproximadamente 5 nm para o poli(3-HFA) quando ele é comparado com o máximo de emissão do 3-HFA. Este fato pode estar relacionado à presença de ligações duplas conjugadas no polímero, o que reduz a energia de transição, passando o máximo de emissão de poli(3-HFA) para comprimentos de onda maiores.

4.5 Análise Termogravimétrica (TGA)

Análise Térmica foi definida por Mackenzie⁷² um termo que abrange um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física ou química de uma substância, ou de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo ou temperatura, enquanto a temperatura da amostra, sob uma atmosfera específica, é submetida a uma programação controlada. Quando se deseja monitorar mudanças de massa devido à interação com atmosfera, vaporização e decomposição a técnica utilizada neste caso é a Termogravimetria (TG) ou Análise Termogravimétrica (TGA).

Termogravimetria é a técnica na qual a mudança da massa de uma substância é medida em função da temperatura enquanto esta é submetida a uma programação controlada.

O termo Análise Termogravimétrica (TGA) é comumente empregado, particularmente em polímeros, no lugar de TG por ser seu precedente histórico e para minimizar a confusão verbal com T_g , a abreviação da temperatura de transição vítrea. Entretanto, ambas abreviaturas são aceitas pela IUPAC. Esta técnica é amplamente utilizada para caracterização de polímeros, fármacos, alimentos, compostos orgânicos e inorgânicos.

No campo de materiais poliméricos, a TG vem sendo amplamente utilizada desde a década de 60 no desenvolvimento dos mais variados tipos de estudos para avaliação de fenômenos físicos e químicos, desde que estes estejam relacionados à variação de massa em função da temperatura ou tempo. Especificamente, entre as aplicações da TG para polímeros, estão incluídas a avaliação da estabilidade térmica, o efeito de aditivos sobre a estabilidade térmica, a determinação dos conteúdos de umidade e de aditivos, os estudos de cinética de degradação, a análise de sistemas de copolímeros, a estabilidade a oxidação e muitas outras⁷³.

Neste trabalho utilizou-se a técnica de TGA acoplada à DTA, Análise Térmica Diferencial, que é a técnica na qual a diferença de temperatura entre uma substância e um material de referência é medida em função da temperatura enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura.

Ao longo do programa de aquecimento, a temperatura da amostra e da referência se mantém iguais até que ocorra alguma alteração física ou química na amostra. Se a reação for exotérmica, a amostra irá liberar calor, ficando por um curto período de tempo com uma temperatura maior que a referência. Do mesmo modo, se a reação for endotérmica a temperatura da amostra será temporariamente menor que a referência.

Mudanças na amostra tais como fusão, solidificação e cristalização são então registradas sob a forma de picos, sendo a variação na capacidade calorífica da amostra registrada como um deslocamento da linha base. O uso principal da DTA é detectar a temperatura inicial dos processos térmicos e qualitativamente caracterizá-los como endotérmico e exotérmico, reversível ou irreversível, transição de primeira ordem ou de segunda ordem, etc.⁷². As Figuras 4.13 e 4.14 mostram os termogramas obtidos para o monômero e o polímero.

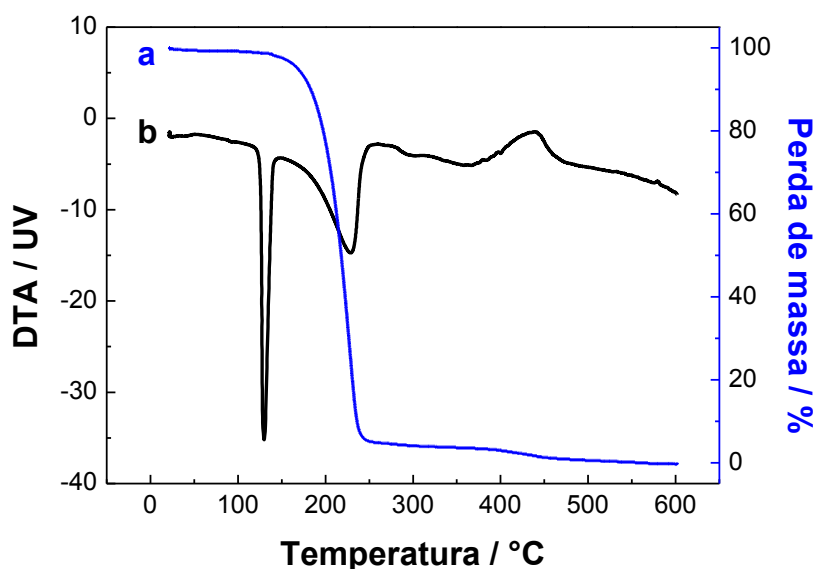


Figura 4.13: Termograma obtido para o 3-HFA onde a curva (a) representa a perda de massa do material (TG) e a curva (b) representa a variação de energia envolvida no processo (DTA).

No termograma de DTA do 3-HFA, apresentado na curva **b** da Figura 4.13, é possível observar uma endoterma em aproximadamente 128 °C, o que corresponde à fusão do material (reportado da literatura entre 128 e 131 °C ⁷⁴). No intervalo onde ocorre a endoterma, a curva **a** (TG / perda de massa) representa uma perda de aproximadamente 1 % da massa do 3-HFA, provavelmente devido à saída da água de absorção. A estabilidade térmica foi observada entre 25 e 139 °C. Esta temperatura é o início do processo de decomposição do 3-HFA, observado na curva de perda de massa. Logo após a fusão observa-se o início da decomposição em 139 °C que segue até, aproximadamente, 550 °C, representando a perda de 100 % da massa da amostra. Essa decomposição apresenta dois perfis diferentes. O primeiro encontra-se entre aproximadamente 119 °C e 251 °C, e representa uma perda de 95 % da massa da amostra. O segundo encontra-se entre aproximadamente 251 °C e 553 °C, e representa a perda dos 5 % da massa restante. A possibilidade de ocorrência de reações entre as moléculas do material, provocadas pelo aumento da temperatura, o que, conseqüentemente, leva a formação de moléculas maiores, como oligômeros, que

apresentam maior resistência térmica, podem explicar as duas decomposições térmicas distintas observadas. A Figura 4.14 mostra o termograma obtido para o poli(3-HFA).

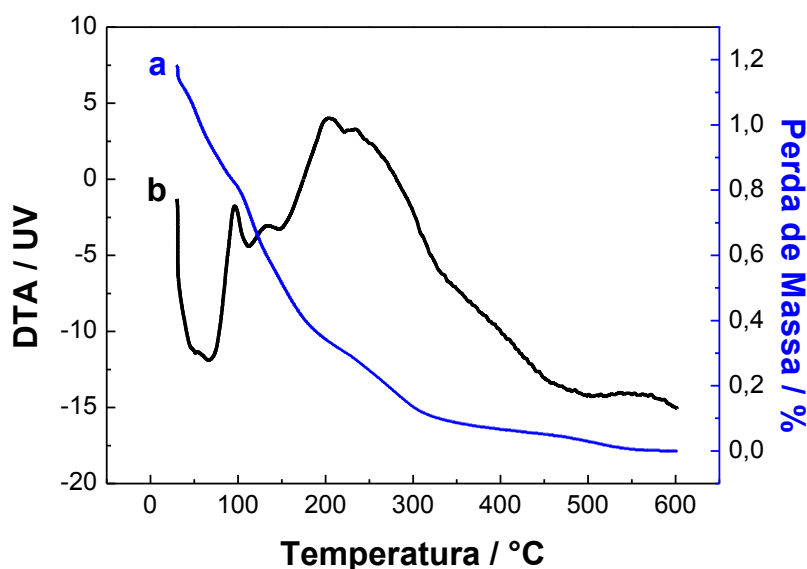


Figura 4.14: Termograma obtido para o poli(3-HFA) eletropolimerizado em pH ácido (0,0) onde a curva (a) representa a perda de massa do material (TG) e a curva (b) representa a variação de energia envolvida no processo (DTA).

No termograma obtido para o poli(3-HFA), foi possível observar perdas constantes de massa entre 28 e 493 °C, representando um total de 99,9 % da massa da amostra (curva **a**). Na curva (**b**) observa-se uma endoterma entre 34 e 95°C que pode estar relacionada à saída do solvente (acetonitrila P.E. 82°C). Comparando-se o termograma obtido o poli(3-HFA) com o termograma obtido para o 3-HFA observa-se uma sobreposição dos fenômenos de fusão e decomposição, impossibilitando a distinção entre ambos. Observa-se também uma maior complexidade para a interpretação dos dados em relação à diferenciação dos processos ocorridos. Entretanto, não é possível sugerir que o polímero formado apresenta menor ou maior estabilidade térmica quando comparado ao 3-HFA, pois as condições de análise não foram as mesmas para ambos; o material polimérico apresenta alta higroscopicidade dificultando a secagem deste material o que torna os resultados relativamente imprecisos.

4.7 Difração de Raios X (DRX)

A difratometria de raios X corresponde a uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos, encontrando aplicações em diversos campos do conhecimento, mas particularmente na engenharia e ciências de materiais, engenharia metalúrgica, química e de minas entre outros ⁷⁵.

Macromoléculas e polímeros podem formar cristais da mesma forma que compostos inorgânicos, minerais, etc. Esta técnica utiliza o espalhamento coerente da radiação X, por estruturas organizadas (cristais), permitindo realizar estudos morfológicos em materiais, determinando a sua estrutura cristalina e sua fração (percentual) cristalina⁷⁶.

Em equipamentos analíticos, tanto de fluorescência quanto de difração, a geração de raios X ocorre pelo bombardeamento de um alvo (fonte) com elétrons de alta energia. Ao incidir sobre o alvo, estes elétrons provocam a emissão de fótons de radiação X, com características (intensidade e comprimento de onda) dependentes do alvo que está sendo bombardeado. Como o feixe de elétrons que atinge o alvo emissor de raios X é de alta energia, elétrons próximos ao núcleo (camada K) são ejetados para regiões afastadas do mesmo, seguindo-se um reordenamento eletrônico a partir do espaço gerado pela ejeção daquele elétron. Assim um elétron da camada L passa a ocupar a posição anteriormente ocupada pelo elétron da camada K, e ao fazer isso libera energia na forma de um fóton de radiação X ⁷⁶. A Figura 4.15 apresenta de forma simplificada e esquemática este mecanismo.

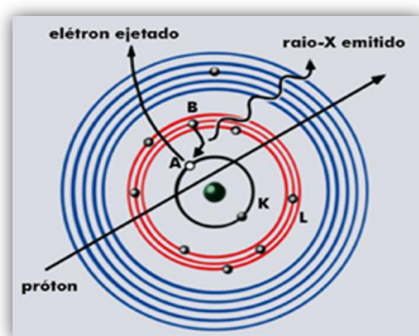


Figura 4.15: Ilustração de emissão de raios X por um átomo ao incidir sobre o mesmo um elétron de alta energia.

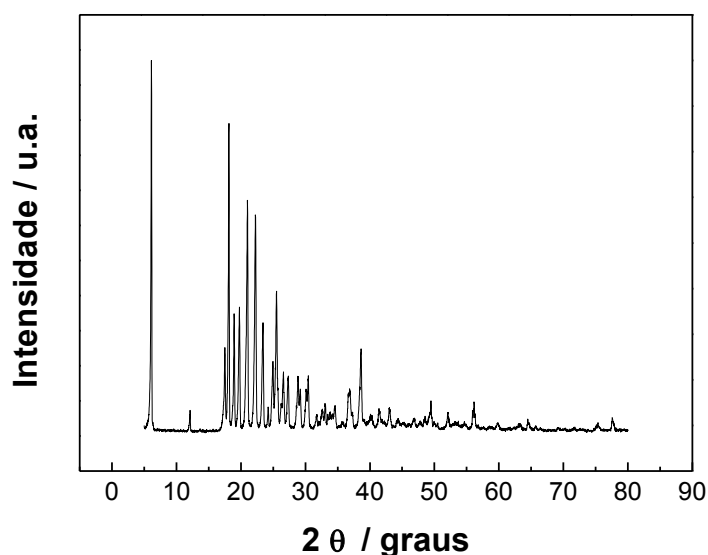
Uma vez que cada camada eletrônica possui diversos subníveis, diversas emissões são possíveis em termos de energia. Assim, um espectro de raios X apresenta uma emissão contínua de baixa intensidade, associada aos picos de maior intensidade de emissão. As fontes (alvos) geradores de raios X mais comuns são de cobre, molibdênio, cobalto, dentre outros.

A cristalinidade de um polímero é um importante parâmetro que define suas propriedades físicas e químicas, juntamente com peso molecular (massa molar) e sua distribuição. A determinação da fração cristalina (ou grau de cristalinidade) em um material polimérico pode ser realizada por diversos métodos, tais como medidas de densidade, calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raios X ⁷⁶.

A utilização de difração de raios X para determinar o grau de cristalinidade em polímeros foi intensivamente estudada durante a década de 60, principalmente através dos trabalhos de Ruland⁷⁷, Farrow⁷⁸ e Wakelin⁷⁹. Os métodos de determinação de cristalinidade desenvolvidos a partir dos trabalhos de Ruland produziram excelentes resultados.

Com o propósito de analisar as possíveis características de cristalinidade do 3-HFA e do poli(3-HFA), realizou-se medidas de difração de raios X para ambas amostras, os resultados obtidos são mostrados na Figura 4.16.

A



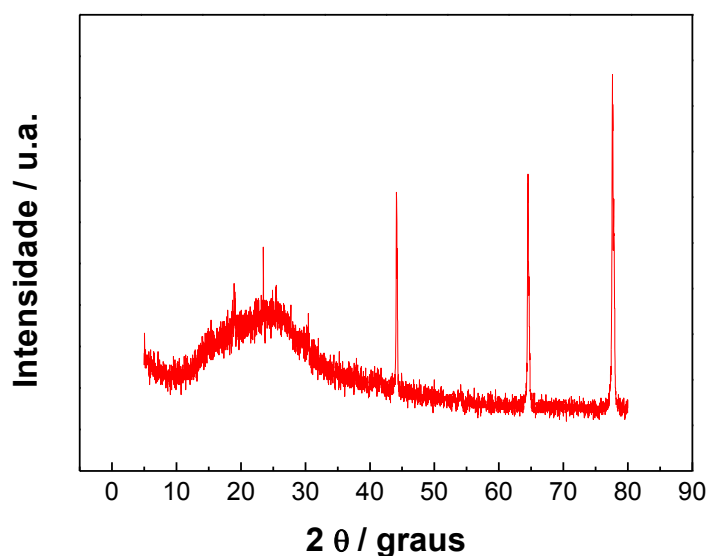
B

Figura 4.16: Difratomogramas obtidos para (A) 3-HFA e (B) poli(3-HFA) eletropolimerizado em pH ácido (0,0).

O difratograma obtido do 3-HFA (Figura 4.16 A) apresenta picos característicos e bem definidos na região de $2\theta = 6,17^\circ$ até $2\theta = 38,58^\circ$. Este perfil é bastante comum em substâncias que apresentam cristalinidade. Já o difratograma obtido para o poli(3-HFA) (Figura 4.16 B) apresentou um comportamento amorfo na região de $2\theta = 10^\circ$ até $2\theta = 35^\circ$. Comparando-se essa mesma região com o 3-HFA, observa-se que existe um “desaparecimento” dos picos no difratograma do poli(3-HFA); este fato comprova as diferenças estruturais existente entre os dois materiais. Entretanto, apesar de apresentar uma região amorfa, o poli(3-HFA) apresentou picos definidos na região de $2\theta = 44^\circ$, $2\theta = 64^\circ$ e $2\theta = 77^\circ$ revelando também um comportamento cristalino.

4.8 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

Espectroscopia de Absorção no 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)⁶⁸.

A radiação infravermelha (IR) corresponde aproximadamente à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas. A porção de maior interesse para a química orgânica está situada entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} ⁸⁰.

Embora o espectro de infravermelho seja característico da molécula como um todo, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem aproximadamente na mesma frequência, independentemente da estrutura da molécula. Portanto, a presença dessas bandas características de grupos permite a obtenção, através do exame do espectro e consulta a tabelas, de informações estruturais úteis, e assim torna-se possível fazer a identificação de estruturas de interesse.

Os estudos de Infravermelho foram realizados com objetivo de identificar os grupos funcionais predominantes no poli(3-HFA) obtido por eletropolimerização do 3-HFA e, principalmente, analisar as principais modificações ocorridas no espectro do polímero quando comparado ao do monômero. A Figura 4.17 mostra a comparação entre os espectros FTIR obtidos.

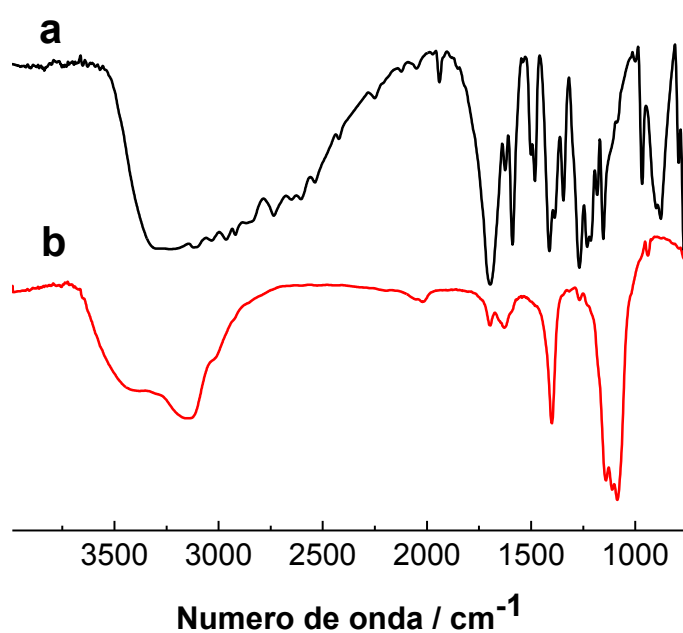


Figura 4.17: Espectros comparativos de FTIR obtidos em pastilhas de KBr para: (a) 3-HFA e (b) poli(3-HFA) eletropolimerizado em pH ácido (0,0); com 20 ciclos consecutivos em resolução de 4 cm^{-1} .

Para o espectro FTIR do 3-HFA (a), na região de 3.262 cm^{-1} , observa-se uma larga banda característica de deformação axial O-H de ácidos carboxílicos. Outra banda de relevante importância localiza-se em 1.698 cm^{-1} a qual representa uma deformação axial C=O característica de ácidos carboxílicos. Os picos conseguintes encontram-se de forma mais complexa, entretanto, na sua grande maioria, representam deformações típicas de compostos aromáticos; em 1.577 e 1.468 cm^{-1} são deformações axiais C=C aromáticos; em 1.391 cm^{-1} ocorre uma deformação angular C-O-H típica de compostos fenólicos; em 1.217 cm^{-1} também existe uma deformação axial C-O característica de compostos fenólicos, e, finalizando, 877 e 714 cm^{-1} representam deformações C-H angulares fora do plano de compostos aromáticos.

Diferentemente do espectro do 3-HFA, o espectro do poli(3-HFA) apresentou um menor número de picos representativos dos grupos funcionais, presentes em sua estrutura. Na região de 3.149 cm^{-1} ainda está presente, mas com um perfil diferente, a banda característica de deformação O-H de ácidos carboxílicos. Esta banda mostrou-se acompanhada de um ombro em 3.417 cm^{-1} . Observou-se também em 2.026 cm^{-1} a presença das deformações harmônicas 1,2,4,5 características de compostos tetrassubstituídos. Acredita-se que o aparecimento dessas bandas deve-se ao fato de o material derivado do 3-HFA, o poli(3-HFA) apresentar em sua estrutura polimérica possíveis ligações anel-anel nas posições 2 e 5. Em 1.706 e 1.627 cm^{-1} ocorrem bandas que possivelmente podem ser de C=O de ácidos carboxílicos com uma provável sobreposição com a outra banda. O perfil e a proximidade desses picos tornam este resultado relativamente impreciso, pois, esta região abrange outras possibilidades de deformações de grupos funcionais distintos. Assim como no 3-HFA, o espectro do poli(3-HFA) em 1.399 cm^{-1} apresentou deformações axiais C=C de compostos aromáticos. E, por fim, entre 1.147 e 1.086 cm^{-1} ocorreu uma deformação axial assimétrica C-O-C bastante intensa e característica de éteres.

Através da análise realizada dos espectros obtidos é possível perceber que a presença marcante da banda (C=C) característica de compostos aromáticos observada para o 3-HFA se repete no espectro do poli(3-HFA) evidenciando que o composto polimérico formado necessita apresentar em sua estrutura, ligações anel-anel para promover a extensão da conjugação das ligações duplas alternadas. Outra diferença relevante foi o aparecimento da banda característica de éteres (C-O-C) em 1.086 cm^{-1} no espectro do poli(3-HFA). Este fato permite sugerir que a polimerização está

acontecendo através da hidroxila fenólica presente no anel aromático, pois a banda O-H característica de ácidos carboxílicos se mantém preservada no espectro do polímero, descartando assim, a possibilidade da polimerização ter ocorrido através deste grupamento. A Tabela 4 mostra as principais diferenças entre os IR obtidos para o 3-HFA e o poli(3-HFA).

Tabela 4: Deformações obtidas para o espectro IR do 3-HFA e poli(3-HFA).

3-HFA			poli(3-HFA)	
Tipo de deformação	Número de onda/ cm⁻¹	Características da deformação	Número de onda / cm⁻¹	Características da deformação
O-H, axial	3.262	Intensa/ bastante característica	3.149-3.417	Larga/Característica/ Sobreposta
C=O, axial	1.698	Intensa/ característica	1.706-1627	Fraca/ discreta/ sobreposta
	1.577 e			Intensa/ bastante característica
C=C, axial	1.468	Média/Sobreposta	1.399	
C-O-H, axial	1.391	Média/Sobreposta	-	-
C-O, axial	1.217	Média/Sobreposta	-	-
C-O-C, axial assimétrica	-	-	1.147-1086	
C=C-H, angular fora do plano	877 e 714	Média/Sobreposta	-	-
Harmônicas	2.150-1.950	Dissubstituídos na posição meta	2.080-2.000	Tetrassubstituídos 1,2,4,5

As deformações harmônicas obtidas para espectros de compostos aromáticos substituídos é uma poderosa ferramenta na identificação da posição das substituições do anel aromático. Uma combinação de bandas da região das harmônicas (aproximadamente entre 2.000 – 1.600 cm⁻¹) e as bandas de deformações angulares fora

do plano, abaixo de 1.000 cm^{-1} , podem indicar qual a posição de substituição do anel. A Figura 4.18 mostra o perfil das possíveis substituições no anel aromático.

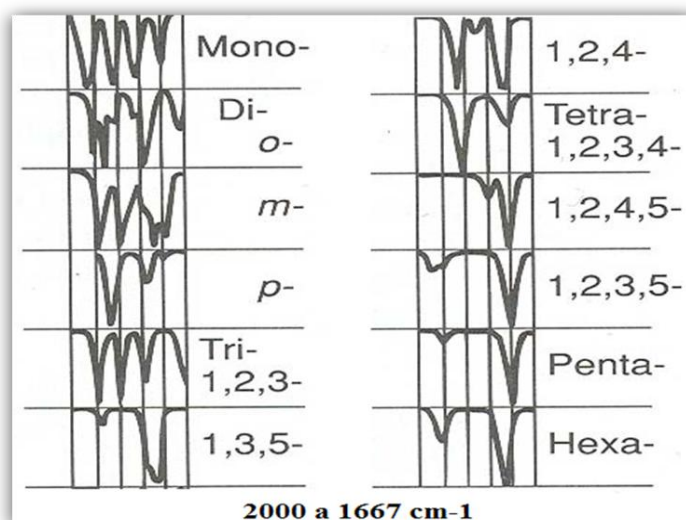


Figura 4.18: Perfil das harmônicas em anéis aromáticos substituídos.

Utilizando estas informações é possível propor uma análise mais detalhada das modificações observadas entre os espectros do monômero e do polímero. As Figuras 4.19 e 4.20 mostram de uma forma mais ampla a mudança no perfil das harmônicas do 3-HFA e do poli(3-HFA):

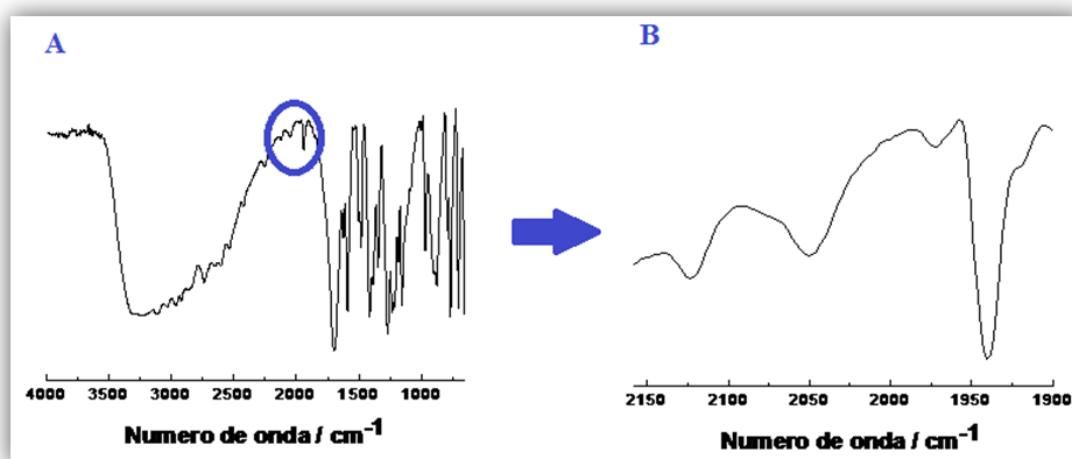


Figura 4.19: Em (A) Espectro FTIR obtido para o 3-HFA; em (B) ampliação da deformação correspondente às harmônicas.

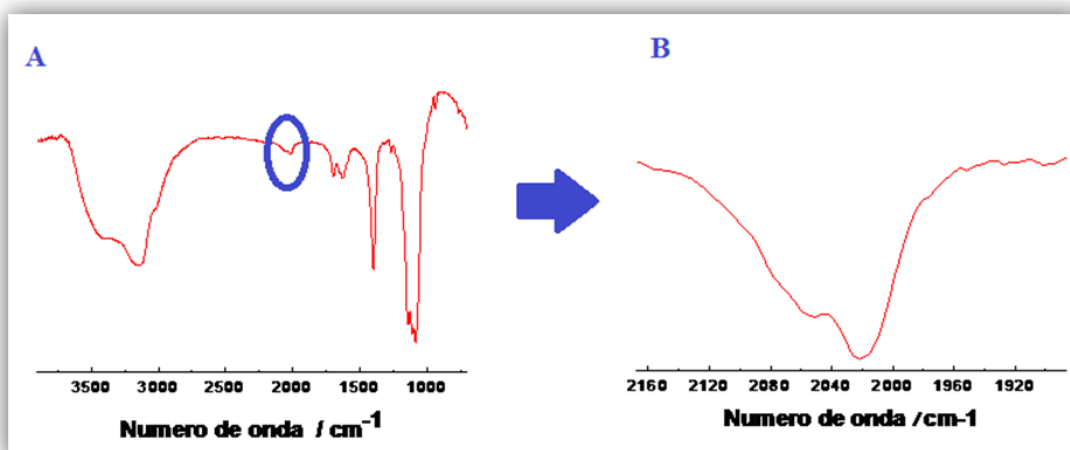


Figura 4.20: Em (A) Espectro FTIR obtido para o poli(3-HFA) eletropolimerizado em pH ácido (0,0); em (B) ampliação da deformação correspondente às harmônicas.

Observa-se que para o 3-HFA o perfil obtido para as harmônicas é característico de compostos meta substituídos (m-substituído); já para o poli(3-HFA) o resultado obtido é similar ao compostos tetrassubstituídos nas posições 1,2,4,5 evidenciando novamente uma mudança na estrutura do material de partida, o 3-HFA, quando comparado ao material obtido via eletropolimerização, o poli(3-HFA).

As análises de infravermelho foram de extrema importância para apontar, com maior especificidade, alguns grupos funcionais que estão presentes na estrutura monomérica e polimérica, tornando-se também mais uma ferramenta no processo de elucidação das diferenças existentes entre esses dois compostos.

4.9 Aplicação das plataformas de poli(3-HFA) para construção de imunossensor

Neste trabalho, a principal aplicação das plataformas de poli(3-HFA) eletropolimerizado em pH ácido (0,0) foi a utilização das mesmas na construção de um imunossensor para diagnóstico do Infarto Agudo do Miocárdio. Para isso, o anticorpo (anti-troponina T) foi imobilizado sobre a superfície dos eletrodos modificados com poli(3-HFA) eletropolimerizado em pH ácido (0,0) e realizada a detecção com o

antígeno (troponina T). Foram feitos testes com os alvos específicos (Troponina T) e um possível interferente, o alvo não-específico (anti-troponina I). Através das medidas de Voltametria Cíclica (VC) e Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) e utilizando-se o par redox cloreto de hexaaminrutênio II e ferro/ferricianeto de potássio como indicadores, demonstrou-se que o sensor apresenta boa sensibilidade e seletividade na detecção da interação da sonda com seus alvos.

4.9.1 Cloreto de hexaaminrutênio II como indicador

i) Considerações importantes sobre o Cloreto de hexaaminrutênio II

O cloreto de hexaaminrutênio II é um composto inorgânico cuja fórmula molecular é: $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2$. Segundo a literatura⁸⁰, o par redox $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}/[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ é frequentemente utilizado em estudos eletroquímicos devido ao seu comportamento redox reversível em soluções aquosas. Além disso, este par redox tem sido amplamente utilizado para comparações entre modelos teóricos e experiências em estudos de transporte de massa. Muitos trabalhos da literatura relataram o coeficiente de difusão para o $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, embora muito poucos o fizeram para $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$.

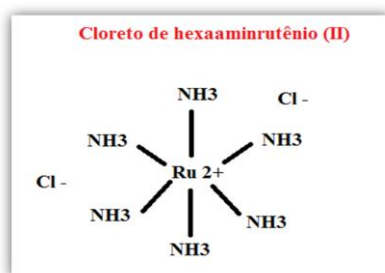


Figura 4.21: Fórmula estrutural do cloreto de hexaaminrutênio II.

Conforme apresentado anteriormente, na seção 4.2.7, os estudos das propriedades de troca iônica do poli(3-HFA) mostraram que este material polimérico (formado nos pH's: 0,0; 6,5 e 12,0) apresenta comportamento aniônico devido ao aumento observado nas correntes de pico em meio que contém o complexo catiônico $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$. Devido a este comportamento, complexos catiônicos podem atuar como

indicadores de possíveis modificações ocorridas na superfície de polímeros aniônicos. No caso de imunossensores, a imobilização de anticorpos e antígenos ou do complexo Ac-Ag gera uma nova superfície que pode apresentar maior ou menor afinidade com esses indicadores levando, portanto, a alteração da resposta eletroquímica. A Figura 4.22 mostra o esquema ilustrativo do processo de imobilização.

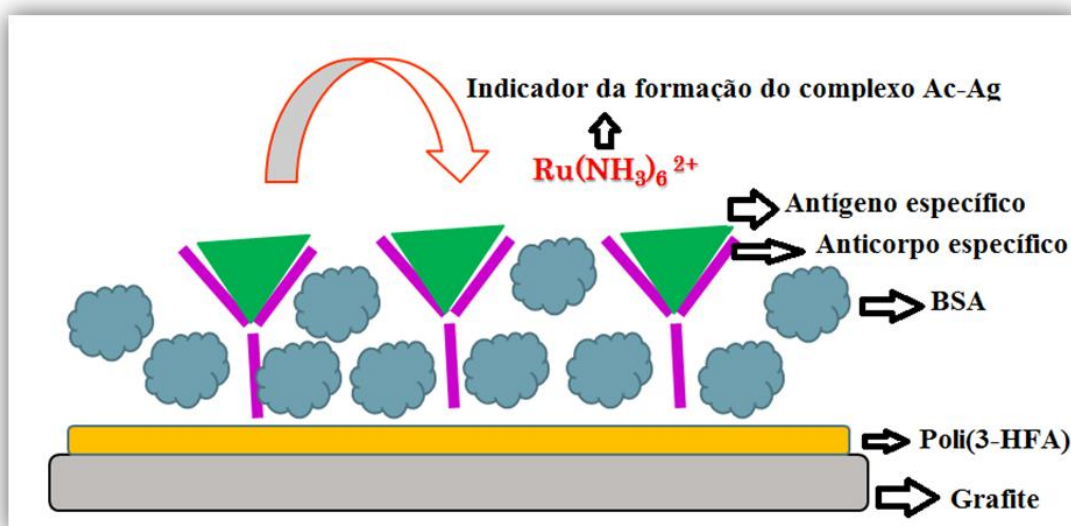


Figura 4.22: Esquema ilustrativo da imobilização e detecção da interação das biomoléculas imobilizadas na superfície do eletrodo de grafite modificado com poli(3-HFA) eletropolimerizado em pH ácido (0,0).

ii) Comportamento eletroquímico

Inicialmente, estudos prévios foram realizados com o intuito de encontrar a faixa de potencial na qual o complexo catiônico $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ apresentasse melhor resposta eletroquímica. Para tanto, foram utilizadas as técnicas de VPD e VC. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.23:

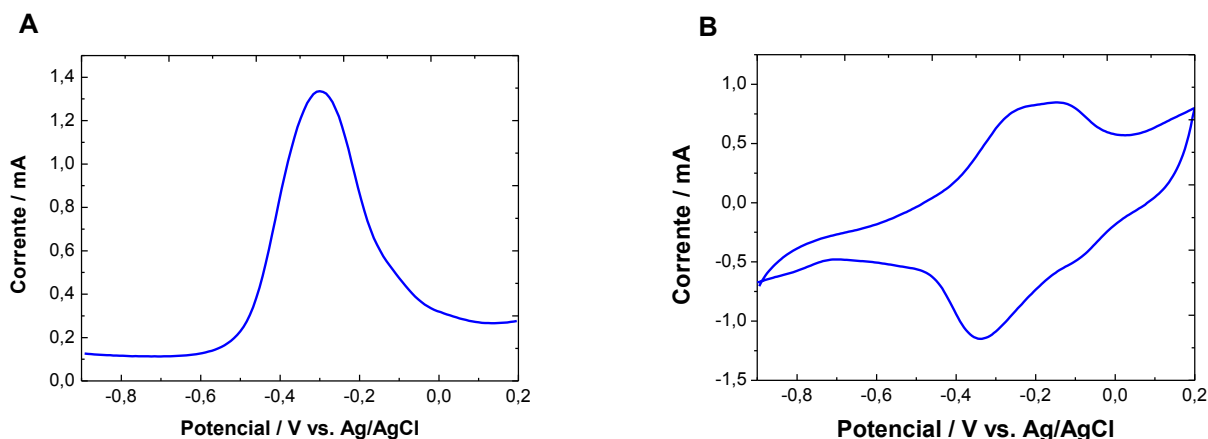


Figura 4.23: (A) VPD obtido para solução $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$ 2,5 mmol.L⁻¹ contendo KCl 0,05 mol.L⁻¹ em PBS 0,1 mol.L⁻¹; $v = 400 \text{ mV.s}^{-1}$; (B) VC obtido para solução $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$ 2,5 mmol.L⁻¹ contendo KCl 0,05 mol.L⁻¹ em PBS 0,1 mol.L⁻¹; $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$.

De acordo com a Figura 4.23 a faixa de potencial mais apropriada para se obter a resposta eletroquímica para este indicador está entre, aproximadamente, -0,6 a +0,1 V. Portanto, os experimentos de detecção, utilizando $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ como indicador, foram realizados nesta faixa de trabalho.

iii) Detecção utilizando Cloreto de Hexaaminrutênio II como indicador da formação do complexo Anticorpo-Antígeno

Após a obtenção da melhor faixa de resposta eletroquímica do $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ em PBS, realizou-se nesta mesma faixa medidas de VPD nas diferentes etapas de construção do imunossensor estudado: após imobilização do anticorpo-BSA; após a imobilização do anticorpo/BSA/antígeno+ (troponina T, alvo específico); após a imobilização do anticorpo/BSA/antígeno- (anti-troponina I, alvo não-específico). Os resultados indicaram respostas diferentes, conforme apresentado na Figura 4.24.

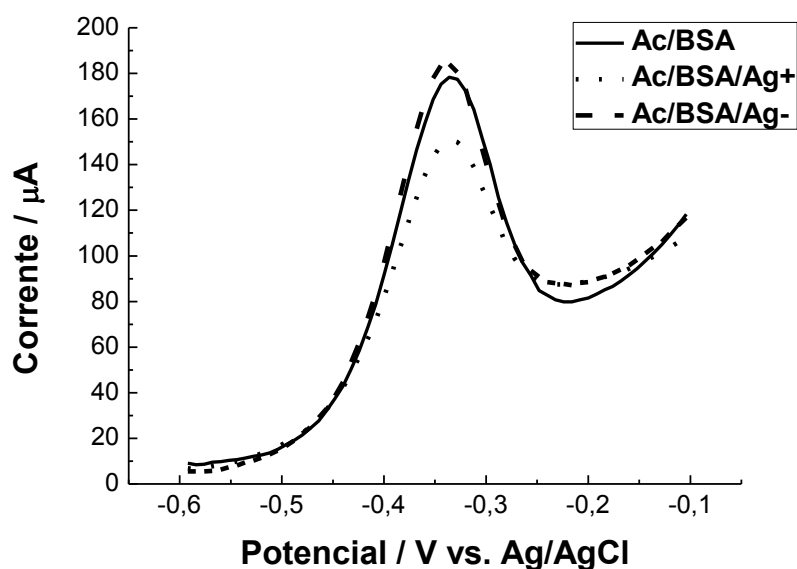


Figura 4.24: VPD obtido para solução $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$ $16,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ contendo KCl $0,32 \text{ mmol.L}^{-1}$ em PBS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$; (a) EG/3-HFA modificado com Ac/BSA; (b) EG/3-HFA modificado com Ac/BSA/Ag+ ($\text{Ag}^+ \rightarrow$ alvo específico); (c) EG/3-HFA modificado com Ac/BSA/Ag- ($\text{Ag}^- \rightarrow$ alvo não-específico); $v = 400 \text{ mV.s}^{-1}$.

De acordo com a Figura 4.23, ocorreram mudanças significativas nas respostas das diferentes etapas do biossensor estudado. O valor de I_{pa} obtido em (a) foi de aproximadamente $167 \mu\text{A}$; nesta etapa o EG/3-HFA apresentava somente Ac/BSA imobilizado em sua superfície. Já em (b), onde o EG/3-HFA apresentava Ac/BSA/Ag+ imobilizado em sua superfície, o valor de I_{pa} obtido foi de $141 \mu\text{A}$, o que representa uma queda de 15,6% do valor de I_{pa} . Esta diferença observada nos valores de corrente de pico deve-se as interações ocorridas no processo de oxidação da sonda (a) e do complexo Ac/Ag (b); portanto esta diferença permite afirmar que o sistema proposto é sensível. Além disso, também foi testada a seletividade do imunossensor frente a alvos não específicos, que neste caso, utilizou-se anti troponina I. A curva obtida em (c) onde o EG/3-HFA apresentava Ac/BSA/Ag- ($\text{Ag}^- \rightarrow$ anti troponina I) imobilizado em sua superfície, o valor de I_{pa} obtido foi de aproximadamente $175 \mu\text{A}$. Este valor representa um aumento de 19 % de I_{pa} quando comparado à resposta para o alvo específico. Portanto, o sistema proposto também é seletivo.

4.9.2 Ferro/ferricianeto de potássio como indicador

i) Considerações importantes sobre o ferro/ferricianeto de potássio

O ferrocianeto de potássio, também conhecido como prussiato amarelo de potássio ou hexacianoferrato de potássio (III), é um composto de coordenação de fórmula $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$, que forma cristais monoclinicos de cor amarelo claro à temperatura ambiente, e que se decompõe no seu ponto de ebulição. No laboratório, ferrocianeto de potássio é usado para determinar a concentração de permanganato de potássio, um composto usado frequentemente em titulações baseadas em reações redox.

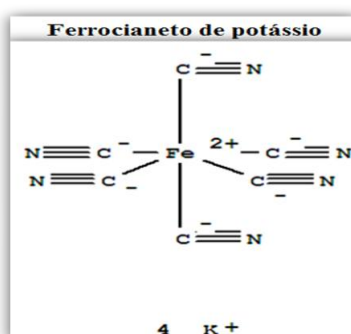


Figura 4.25: Fórmula estrutural do Ferrocianeto de potássio.

Ferricianeto de potássio é o composto químico com a fórmula de $K_3[Fe(CN)_6]$. Este sal vermelho brilhante consiste na coordenação composto $[Fe(CN)_6]^{3-}$. É solúvel em água e sua solução apresenta fluorescência verde-amarelo.

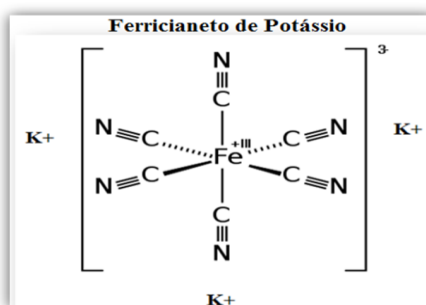


Figura 4.26: Fórmula estrutural do Ferricianeto de potássio.

Ferricianeto de potássio é usado em muitos biossensores amperométricos como agente de transferência eletrônica substituindo o agente de transferência eletrônica

natural de enzimas; da mesma forma que ocorre com o oxigênio e a enzima glicose oxidase. Ele está presente em muitos dispositivos medidores do nível de glicose no sangue disponíveis comercialmente para uso por indivíduos diabéticos.

ii) Comportamento eletroquímico do ferro/ferricianeto de potássio

De forma análoga ao indicador $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$, estudos prévios foram realizados com o intuito de encontrar a faixa de potencial na qual o complexo aniônico $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ apresentasse melhor resposta eletroquímica. Para tanto, foram utilizadas as técnicas de VPD e VC. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.27:

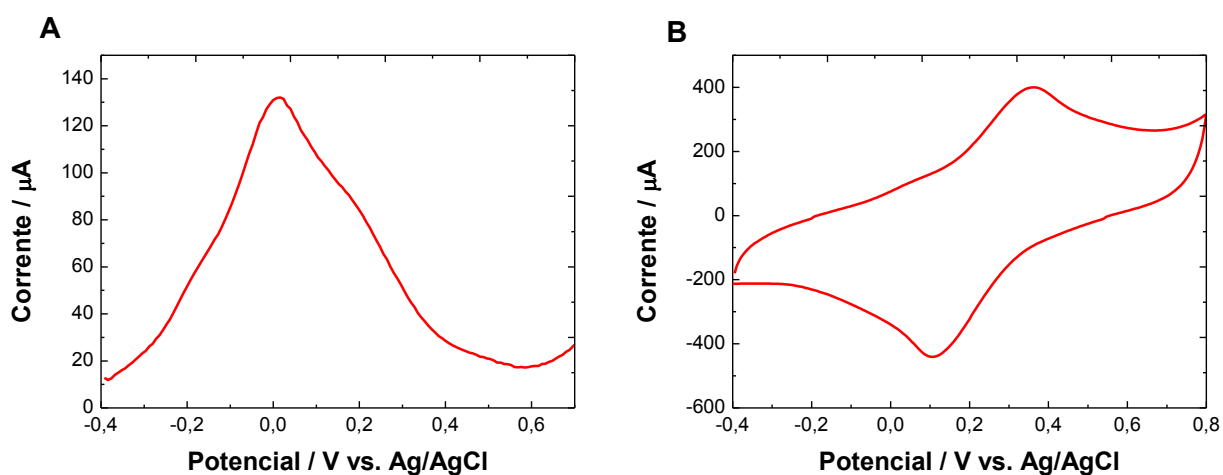


Figura 4.27: (A) VPD obtido para solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ contendo KCl $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ em PBS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 400 \text{ mV.s}^{-1}$; (B) VC obtido para solução $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ contendo KCl $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ em PBS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$; $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$.

De acordo com as medidas de VC e VPD realizadas acima, a faixa de potencial mais apropriada para se obter a resposta eletroquímica para este indicador está entre,

aproximadamente, -0,4 a +0,6 V. Portanto, os experimentos de detecção, utilizando a sonda aniônica como indicador, foram realizados nesta faixa de trabalho.

iii) Detecção utilizando Ferro/Ferricianeto de Potássio como indicador da formação do complexo Anticorpo-Antígeno

Após a obtenção da melhor faixa de resposta eletroquímica do $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ em PBS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, realizou-se nesta mesma faixa medidas de VPD nas diferentes etapas de construção do imunossensor estudado: após imobilização do anticorpo/BSA; após a imobilização do anticorpo/BSA/antígeno+ (troponina T, alvo específico); após a imobilização do anticorpo/BSA/antígeno- (anti-troponina I, alvo não-específico). Os resultados indicaram respostas diferentes, conforme apresentado na Figura 4.28.

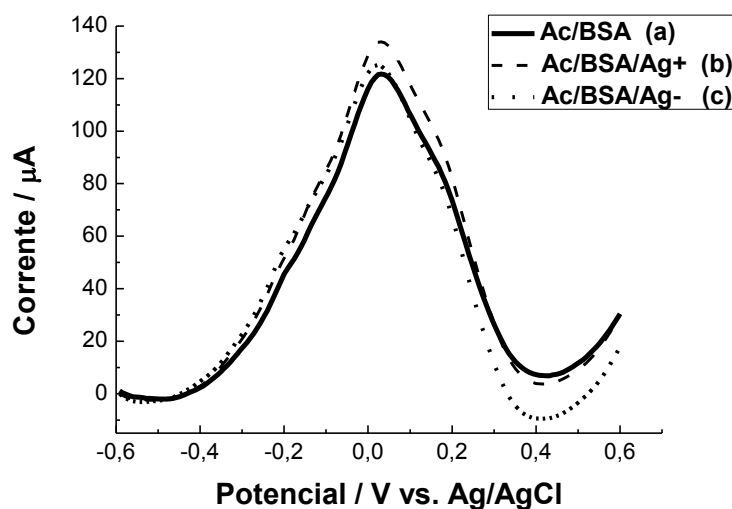


Figura 4.28: VPD obtido para solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $0,33 \text{ mmol.L}^{-1}$ contendo KCl $6,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ em PBS $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$; (a) EG/3-HFA modificado com Ac/BSA; (b) EG/3-HFA modificado com Ac/BSA/Ag+ (Ag+ $\rightarrow$ alvo específico); (c) EG/3-HFA modificado com Ac/BSA/Ag- (Ag- $\rightarrow$ alvo não-específico); $v = 400 \text{ mV.s}^{-1}$.

A Figura 4.28 mostra que, assim como ocorrido para o indicador catiônico, ocorreram mudanças nas respostas das diferentes etapas do biossensor estudado. O valor de I_{pa} obtido em (a) foi de aproximadamente 121 μA ; nesta etapa o EG/3-HFA apresentava somente Ac/BSA imobilizado em sua superfície. Já em (b), onde o EG/3-HFA apresentava Ac/BSA/Ag⁺ imobilizado em sua superfície, o valor de I_{pa} obtido foi de 134 μA , o que representa um aumento de 10 % do valor de I_{pa} quando comparado com a etapa (a). Esta diferença observada nos valores de corrente de pico deve-se as interações ocorridas no processo de oxidação da sonda (a) e do complexo Ac/Ag (b); portanto esta diferença permite afirmar que este sistema proposto também é sensível. Da mesma forma, foi testada a seletividade do imunossensor frente a alvos não-específicos, que neste caso, utilizou-se anti troponina I. A curva obtida em (c) onde o EG/3-HFA apresentava Ac-BSA-Ag- (Ag- $\rightarrow$ anti troponina I) imobilizado em sua superfície, o valor de I_{pa} obtido foi de aproximadamente 126 μA . Este valor representa uma diminuição de 6,4% de I_{pa} quando comparado à resposta para o alvo específico.

Quando se compara os resultados obtidos para o imunossensor com detecção usando indicador aniônico ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$) com os obtidos para o imunossensor com detecção usando indicador catiônico ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$) observa-se que o indicador catiônico apresentou resultados mais satisfatórios pois, obteve-se maior sensibilidade e seletividade. Além disso, o indicador catiônico apresenta uma resposta eletroquímica mais definida (ondas de oxidação) e faixas de potencial em valores mais negativos quando comparado com a sonda aniônica. A Tabela 5 mostra as principais diferenças encontradas para o indicador catiônico e aniônico.

Tabela 5: Principais diferenças entre o indicador catiônico $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2$ e o indicador aniônico $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$; onde: (a) EG/3-HFA modificado com Ac/BSA, (b) EG/3-HFA modificado com Ac/BSA/ Ag^+ ($\text{Ag}^+ \rightarrow$ alvo específico) e (c) EG/3-HFA modificado com Ac/BSA/ Ag^- ($\text{Ag}^- \rightarrow$ alvo não-específico).

	Indicador catiônico $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$			Indicador aniônico $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$		
	a	b	c	a	b	c
<i>I_{pa}</i> / μA	167	141	175	120	134	126
<i>E_{pa}</i> / V	-0,33	-0,33	-0,34	0,03	0,03	0,03
C / μC	224	222	220	559	622	643
*Sensibilidade / %	16			10		
**Seletividade / %	19			6,4		

* Diferença entre *I_{pa}* em (a) e *I_{pa}* em (b)

** Diferença entre *I_{pa}* em (b) e *I_{pa}* em (c)

Os resultados obtidos para os ensaios de imobilização e detecção da interação das biomoléculas específicas para o infarto agudo do miocárdio são preliminares e necessitam de inúmeras otimizações. Entretanto, já é possível perceber que com os estudos preliminares de caracterização do filme polimérico pode-se interpretar e prever com maior segurança o comportamento e a resposta de possíveis interações entre a matriz polimérica e alguns materiais biológicos.

5. Conclusões e Perspectivas

Foi possível realizar a eletropolimerização do 3-HFA sobre eletrodos de grafite sendo que o material adsorvido apresentou atividade eletroquímica. Esses resultados revelaram interessantes propriedades de troca catiônica e aniônica as quais foram demonstradas com os pares redox $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2$ e $\text{K}_4(\text{FeCN})_6/\text{K}_3(\text{FeCN})_6$.

Os experimentos de eletropolimerização conduzida em diferentes valores de pH mostraram a formação de filmes com comportamentos eletroquímicos distintos. A eletropolimerização foi realizada em meio ácido (pH = 0,0), neutro (pH = 6,5) e básico (pH = 12,0). Observou-se que, quando eletropolimerizado em meio ácido e neutro, o poli(3-HFA) apresentou atividade eletroquímica com pares redox eletroativos, sendo que em pH 6,5 a quantidade de material eletroativo formado foi menor. Não foi observada atividade eletroquímica significativa quando o filme foi obtido em meio básico.

Medidas de UV/Vis. mostraram a diferença do comportamento espectroscópico do monômero e polímero. O 3-HFA apresentou bandas em 202, 214 e 274 nm e quando se comparou esse perfil com o poli(3-HFA) foi observado um alargamento das bandas e um aumento na extensão de absorção do polímero da região do visível. Além disso, também se verificou a influência do pH nas bandas de absorção do 3-HFA.

Medidas de fluorescência mostraram que o poli(3-HFA) apresenta deslocamento nas suas bandas de absorção e emissão quando comparado ao 3-HFA, devido ao aumento na extensão de conjugação da cadeia polimérica.

Os resultados das análises térmicas mostraram que a estrutura do poli(3-HFA) é heterogênea e complexa. A perda de massa é gradual ao longo de uma larga faixa de temperatura, sendo a estabilização obtida a partir de 500 °C não sendo possível diferenciar os processos de fusão e decomposição. Já o monômero, sofre processo de decomposição com total perda de massa em aproximadamente 550 °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 polimerizações químicas adicionais quando submetidos a altas temperaturas.

Os difratogramas obtidos para o 3-HFA e o poli(3-HFA) mostraram que ambos compostos apresentam comportamento cristalino.

Quando se comparou os espectros de FTIR do poli(3-HFA) e o 3-HFA, verificou-se comportamentos distintos, o que leva a sugerir que houve modificações na estrutura química do monômero. A região entre 3.750 a 2.750 cm^{-1} apresenta a mudança perfil do estiramento da ligação O–H quando comparado ao espectro do monômero; também é verificado o desaparecimento de vários picos que ocorriam no espectro do 3-HFA. Mas o perfil de maior destaque foi observado em 1.147 e 1.086 cm^{-1} onde está localizada uma banda bastante intensa e definida representando uma deformação axial

assimétrica C-O-C característica de éteres, a qual não aparece no espectro do monômero. Outra banda de interesse está localizada em 2.026 cm^{-1} representando as deformações harmônicas 1,2,4,5 características de compostos tetrassubstituídos. Estes fatores corroboram com a possibilidade de sugerir a existência de ligações anel-anel na estrutura do polímero.

Os estudos de construção do imunossensor para o diagnóstico do IAM mostraram resultados satisfatórios, sendo que o indicador catiônico apresentou-se mais sensível e seletivo quando comparado ao indicador aniônico.

Como propostas futuras têm-se a utilização de outras análises de caracterização como RMN e CG-MS para esclarecimento das dúvidas geradas nas discussões sobre a estrutura do material estudado. Além disso, promover a otimização dos parâmetros do imunossensor proposto no sentido de garantir melhor desempenho do mesmo nas medidas de reconhecimento biológico.

6. Referências Bibliográficas

1. Akcelrud, L. "Fundamentos da ciência dos polímeros" Barueri-SP, Manole, **2007**, 1-5.
2. Kanatzidis, M.G.; "Polymeric Electrical Conductors". *Chemical and Engineering News*, 3:(1), **1990**, 36-54.
3. 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.
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. DOPAGEM eletrônica [2010]. Disponível em: <http://www.infoescola.com/quimica/dopagem-eletronica/> Acesso em: 10 jan. 2011.

6. 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.
7. Shirakawa, H. and Ikeda, S.; "Infrared Spectra of Poly(acetylene)". *Polymer Journal*, 2:(2), **1970**, 231-244.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. POLÍMEROS condutores. **[2010]**. Disponível em: <http://www.unicap.br/Chico/polimeros1.htm>. Acesso em 10 jan. 2011.
12. Lange, U., Roznyatovskaya, N.V. and Mirsky, V.M.; "Conducting polymers in chemical sensors and arrays". *Analytica Chimica Acta*, 614:(1), **2008**, 1-26.
13. Skotheim, T.A. *Handbook of Conducting Polymers*, (CRC, 1997).
14. Zoppi, R.A. and De Paoli, M.A.; "Aplicações Tecnológicas de Polímeros Intrinsecamente Condutores: Perspectivas Atuais ". *Química Nova* 16:(6), **1993**, 560-569.
15. 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.

16. Wan, M.; "The influence of polymerization method and temperature on the absorption spectra and morphology of polyaniline". *Synthetic Metals*, 31:(1), **1989**, 51-59.
17. Nalwa, H.S. *Handbook of Organic Conductive Molecules and Polymers*, (John Wiley & Sons, 1996).
18. Malinauskas, A.; "Chemical deposition of conducting polymers". *Polymer*, 42:(9), **2001**, 3957-3972.
19. 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.
20. 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.
21. Nalwa, H.S. *Handbook of Organic Conductive Molecules and Polymers*, (John Wiley & Sons, 1996).
22. 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.
23. Breme, 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.
24. Plueddemann, E.P. *Silane Coupling Agents*, (Plenum Press, New York, 1991).
25. Luzinov, I., Julthongpiput, 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.

26. Abruna, H.D. *Electroresponsive Molecular and Polymeric Systems*, (CRC Press, 1988).
27. 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.
28. Malinauskas, A.; "Electrocatalysis at conducting polymers". *Synthetic Metals*, 107:(2), **1999**, 75-83.
29. Adhikari, B. and Majumdar, S.; "Polymers in sensor applications". *Progress in Polymer Science*, 29:(7), **2004**, 699-766.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Silva, F., Vieira, S., Goulart, L., Boodts, J., Brito-Maduro, A., Maduro, J.M.; "Electrochemical Investigation of Oligonucleotide-DNA Hybridization on Poly(4-Methoxyphenethylamine)". *International Journal of Molecular Sciences*, 9:(7), **2008**, 1173-1187.
35. Silva, T.A.R., Ferreira, L.F., Boodts, J.F.C., Eiras, S.P., Maduro, J.M., Brito-Maduro, A.G.; "Poly(4-hydroxyphenylacetic acid): A new material for

- immobilization of biomolecules". *Polymer Engineering & Science*, 48:(10), **2008**, 1963-1970.
36. 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.
37. Silva, T.A.R., Ferreira, L.F., Souza, L.M., Goulart, 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 and Engineering: C*, 29:(2), **2009**, 539-545.
38. Brito-Madurro, A., Ferreira, L., Vieira, S., Ariza, R., Filho, L., Madurro, J.M.; "Immobilization of purine bases on a poly-4-aminophenol matrix". *Journal of Materials Science*, 42:(9), **2007**, 3238-3243.
39. 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.
40. 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 Materials of Science*, 45:, **2009**, 475-482.
41. Castro, C.M., Vieira, S.N., Gonçalves, R.A., Brito-Madurro, A.G. and Madurro, J.M.; "Electrochemical and morphological studies of nickel incorporation on graphite electrodes modified with polytyramine." *Journal Materials of Science*, 43:, **2008**, 475-482.
42. Cosnier, S.; "Biosensors based on electropolymerized films: new trends". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377:(1), **2003**, 507-520.
43. D'Orazio, P.; "Biosensors in clinical chemistry". *Clinica Chimica Acta*, 334:(1-2), **2003**, 41-69.

44. Davis, J., Huw Vaughan, D. and Cardosi, M.F.; "Elements of biosensor construction". *Enzyme and Microbial Technology*, 17:(12), **1995**, 1030-1035.
45. Lei, Y., Chen, W. and Mulchandani, A.; "Microbial biosensors". *Analytica Chimica Acta*, 568:(1-2), **2006**, 200-210.
46. 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.
47. Teles, F.R.R. and Fonseca, L.P.; "Trends in DNA biosensors". *Talanta*, 77:(2), **2008**, 606-623.
48. Gooding, J.J.; "Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends". *Analytica Chimica Acta*, 559:(2), **2006**, 137-151.
49. Riccardi, C.S.; Costa, P.I.; Yamanaka, H.; "Imunossensor Amperométrico" *Química Nova*, vol.25, nº 2, São Paulo, Abril/Maio **2002**.
50. ANTÍGENOS. [2010]. Disponível em: http://www.medicina.ufba.br/imuno/roteiros_imuno/Roteiro%20de%20ant%C3%A9genos%2002-1.pdf. Acesso em: 14 jan. 2010.
51. INFARTO do miocárdio: Você conhece as causas? [2010]. Disponível em: http://www.plantamed.com.br/DIV/Infarto_do_miocardio.htm. Acesso em: 14 jan. 2011.
52. SINTOMAS do infarto agudo do miocárdio. [2010]. Disponível em: <http://www.bancodesaude.com.br/infarto-miocardio/sintomas-infarto-agudo-miocardio>. Acesso em: 14 jan. 2011.
53. CORAÇÃO saudável. [2010]. Disponível em: http://coracaosaudavel.terra.com.br/estatisticas_integra.php?id=332. Acesso em 14 jan. 2011.

54. DIAGNÓSTICO do infarto agudo do miocárdio. [2010]. Disponível em: <http://www.bancodesaude.com.br/infarto-miocardio/diagnostico-infarto-agudo-miocardio>. Acesso em 14 jan. 2011.
55. NOVOS marcadores bioquímicos da injúria miocárdica. [2010]. Disponível em: <http://perflin.com/artigos/artigos98/markers.htm>. Acesso em: 14 jan. 2011.
56. O QUE são as troponinas cardíacas? [2010]. Disponível em: <http://www.lincx.com.br/cuidando-de-sua-saude/artigos-cientificos/cardiologia/5788-troponinas-cardiacas.html>. Acesso em 14 jan. 2011.
57. Sykes, B.D., Li, M.X., Robertson, I.M.; "Interaction of cardiac troponin with cardiotonic drugs: A structural perspective" *Biochemical and Biophysical Research Communications* (369), **2008**, 88-99.
58. RESEARCH highlights. [2010]. Disponível em: <http://www.riken.go.jp/engn/r-world/info/release/news/2003/sep/index.html>. Acesso em: 14 jan. 2011.
59. Kubota, L. T.; Dutra, R. F. "An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyl dextran-modified gold chip". *Clinica Chimica Acta*, 376, **2007**, 114–120.
60. Bard, A.J. and Faulkner, L.R. *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*, (John Willey & Sons, Canada, 1980).
61. 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.
62. 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.
63. Protsailo, L.V. and Fawcett, W.R.; "Electrochemical Impedance Spectroscopy at Alkanethiol-Coated Gold in Propylene Carbonate". *Langmuir*, 18:(23), **2002**, 8933-8941.

64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. FERREIRA, Lucas Franco. **Desenvolvimento de Plataforma Funcionalizada com poli(4-HBA) para aplicação em sensores biológicos**. Uberlândia, UFU, 190 p. Tese (Doutorado) – Programa Multiinstitucional de Doutorado em Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.
69. Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C. "Identificação espectrométrica de compostos orgânicos", Rio de Janeiro, Guanabara Dois, **1979**, 204-209.
70. Skoog, D.A., West, D. M., Holler, F.J., Crouch, S.R. "Fundamentals of Analytical Chemistry", Canada, Brooks/Cole, **2004**, 846-850.
71. Nakaema, M.K.K. and Sanches, R.; "Fluorometria no domínio da frequência". *Química Nova*, 22:(3), **1999**, 412-416.
72. Mackenzie, R.C.; "Nomenclature in thermal analysis, part IV". *Thermochimica Acta*, 28:(1), **1979**, 1-6.
73. Canevarolo, S.V. "Técnicas de caracterização de polímeros" São Paulo. Artliber. **2003**. 209-228

74. CHEMSYNTHESIS chemical database. [2010]. Disponível em: <http://www.chemsynthesis.com/base/chemical-structure-19333.html>. Acesso em: 14 jan. 2011.
75. Pellicia, D. , et.al, “Advancements in X-ray waveguides and their applications in coherent diffraction imaging”. *Radiation Physics and Chemistry*. 78, **2009**, S42–S45.
76. Canevarolo, S.V. “Técnicas de caracterização de polímeros” São Paulo. Artiber. **2003**. 41-60.
77. Keller, A. “The spherulitic structure of cristalline polymers”. Part I. Investigation with the polarizing microscope. *Journal of Polymer Science*, v. 17, p. 291, 1955.
78. Keller, A. “The morphology of crystalline polymers”. *Makromolecules Chemie*, v. 34, p. 1, 1959.
79. Flory, P.J. “On the morphology of crystalline state in polymers.” *Journal of American Chemical Society*, v.84, p. 2857, 1962.
80. Silverstein, R.M.; Webster, F.X.; Kiemle, D.J.; “Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos” Rio de Janeiro, LTC, **2007**, 70-104.
81. Wang, Y.; Limon-Petersen, J.G.; “Measurement of the diffusion coefficients of $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ and $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ in aqueous solution using microelectrode double potential step chronoamperometry”. *Journal of electroanalytical chemistry*. **2011**.