



# **Biossensores Amperométricos baseados em filmes de polímeros condutores nanoestruturados**

**Dafne Pires Pinto**

**Projeto Final de Curso**

**Orientador(es)**

**Prof. Ana Maria Rocco, Dra**  
**Prof. Robson Pacheco Pereira, Dr**

**Março de 2012**

# **Biossensores Amperométricos baseados em filmes de polímeros condutores nanoestruturados**

*Dafne Pires Pinto*

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro (a) de Bioprocessos.

Aprovado por :

Dra. Mariana de Mattos Vieira Mello Souza

Dr. Adney Luis Anjos da Silva

Msc. Felipe Augusto Moro Loureiro

Orientado por:

Ana Maria Rocco, Dra  
Robson Pacheco Pereira, Dr

Rio de Janeiro, RJ – Brasil  
Março de 2012

Pinto, Dafne Pires

Biossensores Amperométricos baseados em filmes de polímeros condutores nanoestruturados/ Dafne Pires Pinto. Rio de Janeiro : UFRJ/EQ, 2012.

x, 83 p.;il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2012.

Orientador(es): Ana Maria Rocco e Robson Pacheco Pereira.

1. Biossensores. 2. Glicose. 3. Polímeros. 4. Monografia. (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Ana Maria Rocco e Robson Pacheco Pereira. I. Biossensores Amperométricos baseados em filmes de polímeros condutores nanoestruturados.

## **AGRADECIMENTOS**

Meus agradecimentos aos colegas Felipe Augusto Moro Loureiro e Adney Luis Anjos da Silva, por todo auxílio prestado no laboratório e durante a redação deste trabalho.

À Renata Antoun Simão e Heleno Souza da Silva, pelas análises AFM.

Aos orientadores Ana Maria Rocco e Robson Pacheco Pereira, por todo auxílio no projeto e na redação deste trabalho.

Aos meus pais e meu noivo, por me darem todo o apoio necessário.

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro(a) de Bioprocessos.

## **BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS BASEADOS EM FILMES DE POLÍMEROS CONDUTORES NANOESTRUTURADOS**

Dafne Pires Pinto

Março, 2012.

Orientador(es): Prof. Ana Maria Rocco, Dra  
Prof. Robson Pacheco Pereira, Dr

A detecção e quantificação de substâncias como colesterol e glicose no organismo é de grande importância em análises clínicas, uma vez que a concentração destas substâncias, entre outras, pode ser utilizada como parâmetro de diagnóstico na prevenção e tratamento de inúmeras patologias. No presente trabalho, foram obtidos eletroquimicamente biossensores baseados em polipirrol (Ppy) e glicose oxidase (GOx) e caracterizados por técnicas eletroquímicas, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM). Os filmes Ppy/GOx obtidos foram caracterizados por cronoamperometria (CA), voltametria cíclica (VC), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM). As caracterizações dos filmes Ppy/GOx, obtidos reprodutivelmente, sugerem que os estes apresentam eletroatividade com a presença da enzima na superfície, de forma similar a outros filmes de polipirrol relatados na literatura. A caracterização dos dispositivos em solução contendo glicose e sem glicose sugere o reconhecimento do soluto (glicose) presente na solução devido à maior definição dos picos de oxidação e redução na solução contendo glicose. A caracterização por VC evidenciou que os processos eletroquímicos na superfície do filme são irreversíveis e controlados pela difusão das espécies até o eletrodo, para os quais os valores de corrente de pico apresentam uma dependência linear com  $v^{1/2}$ , enquanto os potenciais associados aos mesmos variam linearmente com  $v$ .

A sensibilidade dos dispositivos à presença de glicose foi avaliada analisando-se a resposta amperométrica dos filmes Ppy/GOx frente à adição de glicose em concentrações predeterminadas. Esta resposta foi aproximadamente linear, o que indica a perspectiva de aplicação do dispositivo como biossensor.

# Índice

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. BIOSSENSORES .....	6
2.1. Enzimas ligadas a transdutores .....	8
2.2. Biossensores baseados em Nanotecnologia.....	12
2.3. Biossensores baseados em polímeros condutores.....	14
2.3.1. Biossensores baseados em polímeros condutores nanoestruturados..	16
2.4. Perspectivas .....	16
3. POLÍMEROS CONDUTORES.....	18
3.1. História dos polímeros condutores .....	19
3.2. Polipirrol (PPy).....	21
3.2.1. Síntese e estrutura .....	21
3.2.2. Propriedades do polipirrol.....	29
3.3. Perspectivas de aplicação.....	45
4-TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO .....	46
4.1. Caracterização eletroquímica.....	46
4.1.1. Voltametria cíclica .....	46
4.1.2. Amperometria .....	47
4.2. Caracterização morfológica .....	47
4.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	47
4.4.2. Microscopia de Força Atômica (AFM).....	49
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	51
5.1- Materiais e métodos.....	51
5.1.1. Reagentes e soluções.....	51
5.1.2. Preparação da solução de tampão de fosfato.....	51
5.2. Eletrodos e Célula.....	52
5.3. Crescimento dos filmes de biossensor .....	54
5.4. Caracterização eletroquímica dos dispositivos.....	54
5.5. Caracterização Morfológica dos dispositivos .....	55
5.6. Curva de adição da glicose. ....	55
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	56
6.1. Análise dos dispositivos obtidos nas seguintes condições de síntese e caracterização: .....	56
6.2. Análise dos dispositivos obtidos nas seguintes condições de síntese e caracterização: .....	63
6.3. Análise dos brancos (filmes sem enzima): .....	68
6.4. Análise dos dispositivos obtidos nas seguintes condições de síntese e caracterização: .....	71
6.5. Curvas de adição de glicose:.....	75
7. CONCLUSÕES .....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Estrutura geral de alguns polímeros condutores na forma dopada. (Cruz, 2006).....	3
<b>Figura 2:</b> Esquema representativo do princípio de funcionamento de um biossensor eletroquímico. ....	7
<b>Figura 3:</b> Reação enzimática de oxidação da glicose. ....	9
<b>Figura 4:</b> Alan McDiarmid, Alan Heeger e Hideki Shirakawa os três descobridores da condutividade do poliacetileno (Wallace et al, 2002). ....	21
<b>Figura 5:</b> Esquema de polimerização química ou eletroquímica de monômeros heterocromáticos de 5 membros [X=N-H, no caso do polipirrol].....	22
<b>Figura 6:</b> Estrutura do pirrol e estrutura idealizada do polipirrol.....	23
<b>Figura 7:</b> Mecanismo de polimerização do pirrol formando polipirrol (Cruz, 2006). ..	25
<b>Figura 8:</b> Estrutura molecular de uma cadeia de Ppy mostrando os tipos de ligações químicas e os defeitos químicos mais comuns em sistemas obtidos por eletropolimerização .....	30
<b>Figura 9:</b> Séries de condutividade (Böyükbayram, 2005).....	35
<b>Figura 10:</b> Ciclo redox entre a forma oxidada (condutora) e reduzida (isolante) do polipirrol (Cruz, 2006).....	37
<b>Figura 11:</b> Exemplo de voltamograma cíclico. Disponível em: < <a href="http://www.mackenzie.br/7487.98.html">http://www.mackenzie.br/7487.98.html</a> >.....	37
<b>Figura 12:</b> Ciclo redox do polipirrol demonstrando a propriedade de troca de íons. ( $A^-$ é o ânion dopante, $PE^-$ é um ânion grande e $X^+$ é o cátion. (Cruz, 2006) .....	38
<b>Figura 13:</b> Estrutura de banda de materiais isolantes, semicondutores e condutores. Disponível em: < <a href="http://www.webexhibits.org/causesofcolor/10.html">http://www.webexhibits.org/causesofcolor/10.html</a> >.....	41
<b>Figura 14:</b> Esquema estrutural de formação de polarons e bipolarons pela dopagem oxidativa do PPy e as estruturas de bandas associadas (Böyükbayram, 2005). ....	43
<b>Figura 15:</b> Esquema representativo dos processos que ocorrem com a incidência de elétrons (Silva, 2006).....	47
<b>Figura 16:</b> Representação da microscopia de força atômica. Disponível em: < <a href="http://www.mtholyoke.edu/~menunez/ResearchPage/AFM.html">http://www.mtholyoke.edu/~menunez/ResearchPage/AFM.html</a> .....	50
<b>Figura 17:</b> Esquema do sistema utilizado na eletropolimerização e caracterização eletroquímica dos filmes de Ppy com Gox. (Silva, 2006).....	53
<b>Figura 18:</b> Célula eletroquímica utilizada neste trabalho. ....	53
<b>Figura 19:</b> Vista superior da célula eletroquímica, mostrando as conexões. ....	54
<b>Figura 20:</b> Evolução do potencial (E) em função do tempo durante a síntese de filmes Ppy/GOx. ....	56
<b>Figura 21:</b> Curva cronoamperométrica de filmes Ppy/GOx obtidos utilizando [Py] = 0,1 M; [KCl] = 1,0 M, [GOx] = 1 mg/mL e tampão fosfato equimolar. Potencial aplicado 0,7 V vs ECS.....	57
<b>Figura 22:</b> Voltamogramas cíclicos de filmes Ppy/GOx obtidos utilizando [Py] = 0,1 M; [KCl] = 0,5 M, tampão equimolar e [GOx] = 1 mg/mL. Potencial aplicado vs ECS. ....	58
<b>Figura 23:</b> Dependência da corrente de pico (anódico, $I_{ox}$ . e catódico, $I_{red}$ ) com a velocidade de varredura em filmes Ppy/GOx obtidos utilizando [Py] = 0,1 M; .....	60
<b>Figura 24:</b> Imagens MEV dos filmes Ppy/GOx em diferentes regiões e ampliações. ..	61
<b>Figura 25:</b> Evolução do potencial (E) em função do tempo durante a síntese de filmes Ppy/GOx a ser caracterizado em solução na ausência de glicose.....	61

<b>Figura 26:</b> Curva cronoamperométrica de filmes Ppy/GOx obtidos utilizando [Py] = 0,1 M; [KCl] = 1,0 M, [GOx] = 1 mg/mL e tampão fosfato equimolar. Potencial aplicado 0,7 V vs ECS. Solução aquosa de caracterização contendo [KCl] = 1,0 M; tampão (sem a presença de glicose). .....	62
<b>Figura 27:</b> Voltamogramas cíclicos de filmes Ppy/GOx obtidos utilizando [Py] = 0,1 M; [KCl] = 0,5 M, tampão fosfato equimolar. Potencial aplicado vs ECS. Solução de caracterização contendo [KCl] = 0,5 M, tampão.....	63
<b>Figura 28:</b> Evolução do potencial (E) em função do tempo durante a síntese de filmes Ppy/GOx. Curva E <sub>xt</sub> obtida durante a síntese de um filme Ppy/GOx utilizando [Py] = 0,1 M; [KCl] = 0,5 M, [GOx] = 2 mg/mL e tampão fosfato equimolar. A corrente aplicada foi de 0,5 mA durante 16 minutos.....	64
<b>Figura 29:</b> Voltamogramas cíclicos de filmes Ppy/GOx obtidos utilizando [Py] = 0,1 M; [KCl] = 0,5 M, tampão fosfato equimolar e [GOx] = 2 mg/mL. Potencial aplicado vs ECS. Solução de caracterização contendo glicose tamponada.....	65
<b>Figura 30:</b> Dependência da corrente de pico com a velocidade de varredura em filmes Ppy/GOx (Síntese: [Py] = 0,1 M; [KCl] = 0,5 M; [GOx] = 2 mg/mL e tampão fosfato equimolar). A partir dos VC em [glicose] = 100 mM sem KCl. ....	66
<b>Figura 31:</b> Voltamogramas cíclicos de filmes Ppy/GOx obtidos utilizando [Py] = 0,1 M; [KCl] = 0,5 M, tampão fosfato equimolar e [GOx] = 2 mg/mL. Potencial aplicado vs ECS. Solução de caracterização contendo glicose tamponada e [KCl]=0,5 M. ....	66
<b>Figura 32:</b> Dependência da corrente de pico com a velocidade de varredura em filmes Ppy/GOx (Síntese: [Py] = 0,1 M; [KCl] = 1,0 M; [GOx] = 2 mg/mL e tampão fosfato equimolar). A partir dos VC em [glicose] = 100 mM e [KCl] = 0,5 M. ....	67
<b>Figura 33:</b> Evolução do potencial (E) em função do tempo durante a síntese de filmes Ppy sem GOx, com [KCl] = 0,5 M.....	68
<b>Figura 34:</b> Voltamogramas cíclicos do filme Ppy obtidos utilizando [Py] = 0,1 M; [KCl] = 0,5 M, tampão fosfato equimolar na ausência de GOx. Potencial aplicado vs ECS.....	69
<b>Figura 35:</b> Evolução do potencial (E) em função do tempo durante a síntese de filmes Ppy sem GOx, com [KCl] = 1,0 M.....	70
<b>Figura 36:</b> Voltamogramas cíclicos do filme Ppy obtidos utilizando [Py] = 0,1 M; [KCl] = 1,0 M, tampão fosfato equimolar na ausência de GOx. Potencial aplicado vs ECS.....	70
<b>Figura 37:</b> Voltamogramas cíclicos de filmes Ppy/GOx obtidos utilizando [Py] = 0,1 M; [KCl] = 0,5 M, tampão fosfato equimolar e [GOx] = 3 mg/mL. Potencial aplicado vs ECS. Solução de caracterização contendo tampão e [KCl]=0,5M. ....	72
<b>Figura 38:</b> Voltamogramas cíclicos de filmes Ppy/GOx obtidos utilizando [Py] = 0,1 M; [KCl] = 0,5 M, tampão fosfato equimolar e [GOx] = 3 mg/mL. Potencial aplicado vs ECS. Solução de caracterização contendo glicose tamponada e [KCl]=0,5M. ....	72
<b>Figura 39:</b> Imagens obtidas por AFM dos filmes obtidos sobre ITO nas seguintes condições: [Py] = 0,1 M, [KCl]=0,5 M, [GOx] = 2 mg/ml. ....	73
<b>Figura 40:</b> Imagens AFM dos filmes obtidos sobre platina nas seguintes condições: [Py] = 0,1 M, [KCl]= 1 M, (a) e (b) [GOx] = 3 mg/ml e (c) 2 mg/ml. A imagem (b) corresponde à parte clara do filme, e a imagem (a) corresponde à parte escura. ....	74
<b>Figura 41:</b> Curvas de adição de glicose dos filmes obtidos nas seguintes condições: [Py]=0,1 M, [GOx] = 2 (a) e 3 mg/ml (b) e [KCl] = 1,0 M. Potencial aplicado vs ECS. Solução de caracterização contendo tampão de fosfato equimolar e [KCl] = 1 M, a glicose tamponada foi adicionada a partir de 300 s, de 1 em 1 minuto.....	75



**Figura 42:** Relação entre a corrente de pico e a concentração de glicose para o dispositivo Ppy/GOx (3 mg/mL). Solução de caracterização contendo tampão de fosfato equimolar e [KCl] =1 M, a glicose tamponada foi adicionada a partir de 300 s, de 1 em 1 minuto. .... 76

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Exemplos de biossensores enzimáticos (Coelho et al, 2008) .....	8
<b>Tabela 2:</b> pH em função da temperatura.....	52
<b>Tabela 3:</b> Valores de potenciais e correntes de pico anódico e catódico em função da velocidade de varredura. Condições de síntese: [Py] = 0,1 M; [GOx] = 1 mg/mL; [KCl] = 0,5 M e tampão equimolar; Solução de caracterização: [KCl] = 0,5M e glicose tamponada.....	59
<b>Tabela 4:</b> Valores de potenciais e correntes de pico anódico e catódico em função da velocidade de varredura. Condições de síntese: [Py] = 0,1 M; [GOx] = 2 mg/mL; [KCl] = 0,5 M e tampão equimolar; Solução de caracterização: Glicose tamponada 100 mM. ....	65
<b>Tabela 5:</b> Valores de potenciais e correntes de pico anódico e catódico em função da velocidade de varredura. Condições de síntese: [Py] = 0,1 M; [GOx] = 2 mg/mL; [KCl] = 0,5 M e tampão equimolar; Solução de caracterização: [KCl] = 0,5 M e glicose tamponada 100 mM. ....	67
<b>Tabela 6:</b> Parâmetros obtidos para a regressão linear dos dados de corrente em função da concentração de glicose. ....	76

# 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, biossensores têm sido muito pesquisados, sendo considerados ferramentas analíticas poderosas que fazem uso do biorreconhecimento, resultando em respostas rápidas e sensíveis, combinando a seletividade das reações bioquímicas com a simplicidade operacional (Lima e Nunes, 2007).

A utilização de biossensores tem aumentado por serem promissores para suplementar as técnicas já existentes, pelas suas características singulares como seletividade, tempo de resposta pequeno, baixo custo, portabilidade, facilidade de uso, construção e obtenção de respostas em tempo real (Louzada *et al*, 2004 e Milagres, 1996).

Os biossensores são construídos utilizando-se técnicas de imobilização de diferentes espécies biológicas, como enzimas, anticorpos, DNA entre outras. A escolha do material biológico a ser utilizado depende do analito a ser estudado, pois o primeiro deve reagir seletivamente com o segundo.

Por exemplo, um biossensor enzimático utiliza enzimas como material biológico, as quais precisam ser imobilizadas adequadamente e acopladas a um transdutor. As enzimas têm sido largamente usadas como material biológico dos biossensores devido às suas propriedades de especificidade, de catálise, alta sensibilidade e seletividade.

A reação do material biológico com o substrato de interesse irá gerar sinais químicos como mudança de concentração de prótons, liberação e absorção de gases, como amônia e oxigênio, emissão, absorção ou refletância de luz e emissão de calor que serão traduzidos pelo transdutor em respostas mensuráveis como corrente elétrica, diferença de potencial elétrico, mudança de temperatura, etc. Este sinal pode ser amplificado, processado ou armazenado para posteriores análises (Louzada *et al*, 2004).

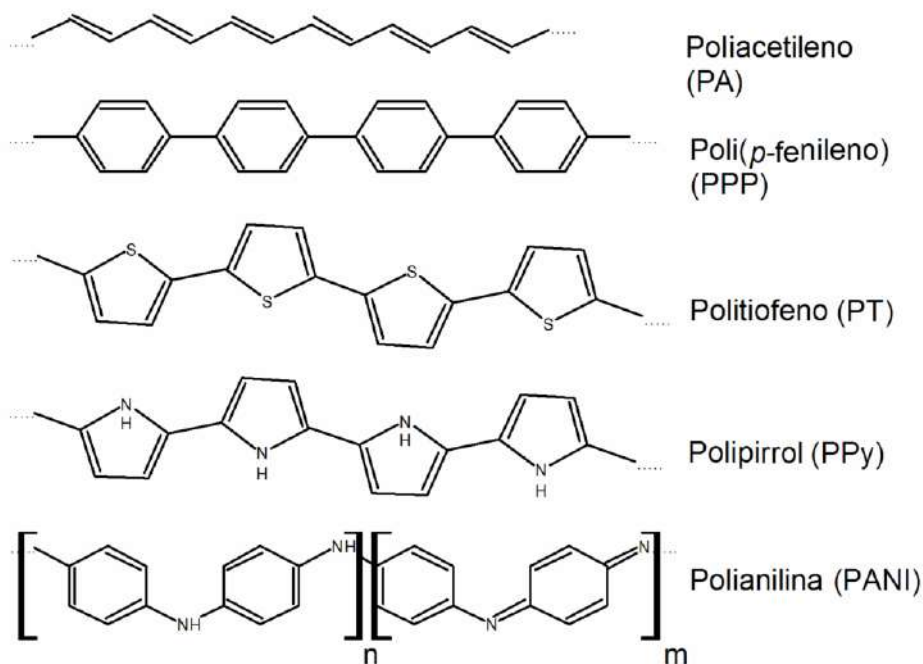
Atualmente, um grande número de pesquisas sobre biossensores estão sendo direcionadas para aplicações em química, medicina, meio ambiente, indústrias alimentícias e biotecnologia.

Por exemplo, biossensores podem ser utilizados para a detecção e a quantificação de substâncias como glicose e colesterol, que é de grande importância em análises clínicas, já que a concentração destas substâncias pode ser usada como

parâmetro de diagnóstico na prevenção e tratamento de inúmeras patologias, como diabetes de mellitus. Em comparação às técnicas frequentemente empregadas na quantificação de substâncias em fluidos biológicos, a utilização de biossensores eletroquímicos na quantificação dessas substâncias pode apresentar vantagem em relação à velocidade e ao custo de execução da determinação (Pereira, 2008).

Os polímeros condutores são uma classe de polímeros funcionais que foram descobertos na década de 70, e têm sido objeto de estudo há mais de 20 anos. Estão entre os materiais elaborados e desenvolvidos em decorrência do grande avanço tecnológico observado a partir do século XX. Os polímeros condutores apresentam em sua estrutura molecular ligações duplas conjugadas (às vezes intercaladas com heteroátomos, como nitrogênio, enxofre e oxigênio) resultando em uma deslocalização eletrônica ao longo da cadeia polimérica, a que se devem a condutividade elétrica e as propriedades eletroquímicas e eletrocromáticas desses materiais. Passam de isolantes a condutores por um processo de oxidação do sistema  $\pi$  conjugado (Luz *et al*, 2006 e Cruz, 2006).

Alguns dos polímeros mais conhecidos são o poliacetileno (PA), Poli(p-fenileno) (PPP) polipirrol (PPy), o politiofeno(PTh) e a polianilina (PANI), cujas estruturas são mostradas a seguir.



**Figura 1:** Estrutura geral de alguns polímeros condutores na forma dopada. (Cruz, 2006)

Esses polímeros são muito atraentes como materiais transdutores em vários dispositivos, devido à reversibilidade química, eletroquímica e às propriedades físicas de suas cadeias, que são controladas por um processo de dopagem e desdopagem. Uma subclasse de polímeros condutores são os polímeros condutores nanoestruturados, que além das propriedades mencionadas anteriormente, também possuem as características dos nanomateriais, como grande área superficial, efeitos quânticos, dentre outros, que reforçam os méritos desses polímeros no desenvolvimento e fabricação de sensores inovadores.

Sensores de polímeros condutores são baseados na variação de sua capacitância, propriedades óticas, propriedades redox, etc. A sensibilidade desses materiais é principalmente dada pela diferença de uma propriedade específica antes e após da exposição a uma molécula alvo. Portanto, a área superficial de polímeros condutores desempenha uma importante função na determinação da sensibilidade de um sensor. A variação da condutividade causada por processos de dopagem e desdopagem é

largamente utilizada em sensores baseados em polímeros condutores. As moléculas alvo podem aumentar ou reduzir o número e a mobilidade de portadores de carga, que resulta em uma mudança de condutividade global.

Sensores baseados em polímeros condutores, como sensores de gases, sensores de hidrogênio e sensores de ácido acético têm sido relatados. Atualmente, deseja-se a fabricação de sensores baseados em polímeros condutores nanoestruturados, com alta sensibilidade, ciclabilidade, bem como tempo de resposta rápido.

Em sensores baseados em polímeros condutores convencionais ou *bulk*, o tempo de resposta a uma molécula alvo é relativamente grande devido a baixa penetração da mesma no polímero. Entretanto, em sensores baseados em polímeros condutores nanoestruturados, espera-se um tempo de resposta significativamente menor, devido às estruturas porosas do polímero. Portanto, é previsto que polímeros condutores nanoestruturados com grandes áreas superficiais e estrutura porosa são excelentes materiais sensores (Xia *et al*, 2010).

A obtenção de polímeros condutores é feita através de síntese química ou eletroquímica, entretanto, as propriedades desses materiais são altamente dependentes de sua micro-estrutura e morfologia, sendo estes determinados pelo método de síntese, contra-íon e outras variáveis (Cruz, 2006).

Porém, a síntese de nanoestruturas de polímeros condutores ainda é uma questão limitante das suas aplicações em sensores. Nesse momento, os métodos *hard template* e *soft template*, bem como abordagens físicas (por exemplo, *tecnologia electro-spinning*), têm sido largamente empregados na síntese de micro ou nanoestruturas de polímeros condutores. Entretanto, métodos de síntese em larga escala, simples, eficientes e controlados para preparação de polímeros condutores nanoestruturados encontram-se ainda em desenvolvimento (Xia *et al*, 2010).

Dentre os polímeros condutores o polipirrol tem recebido muita atenção em função das várias possibilidades de aplicações que estão baseadas na facilidade de síntese, química ou eletroquímica, em sua mudança reversível entre estados isolantes/condutor através de processos de dopagem/desdopagem eletroquímica e em boas propriedades condutoras. Outra propriedade interessante desse polímero é o eletrocromismo, que consiste na alteração de coloração induzida por processos eletroquímicos reversíveis, que possibilita aplicações em dispositivos ópticos e

fotoeletrocromicos. Outras aplicações são propostas em sensores químicos e biológicos e também no campo da medicina para a distribuição contínua de medicamentos (Luz *et al*, 2006).

Nesse trabalho, um biossensor para a detecção de glicose foi obtido através da síntese eletroquímica galvanostática de polipirrol, com a imobilização da enzima glicose oxidase durante o processo. Foi utilizado sais de KCl como eletrólito suporte. Foram feitas voltametrias cíclicas nas velocidades de 10mV/s a 100mV/s, e cronoamperometria, para a caracterização do biossensor. Para a caracterização morfológica do biossensor, foram utilizadas as técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Força Atômica (AFM).

## 2. BIOSSENSORES

Biossensores são instrumentos analíticos que utilizam material biológico ligado a um sistema adequado de transdução que converte um sinal biológico ou bioquímico em um sinal elétrico quantificável e processável. Podem ter aplicação nas áreas de diagnose clínica, militar, controle de processos, indústrias de alimentos e bebidas, agricultura e monitoramento do meio ambiente. Dentre as áreas que mais vêm se desenvolvendo na criação e também na comercialização destes instrumentos são as áreas médica e de alimentos (Coelho *et al*, 2008).

Biossensores são promissores no campo de diagnóstico de doenças infecciosas e outras, em tempo real e possibilitam a intervenção precoce, e conseqüentemente a contenção da doença (D'Orazio, 2011, pág 1755).

Em especial, o biossensor de glicose é um dos biossensores mais bem sucedidos, utilizados para monitorar os níveis de açúcar no sangue de pessoas diabéticas (Maldovan, 2007, pág 159).

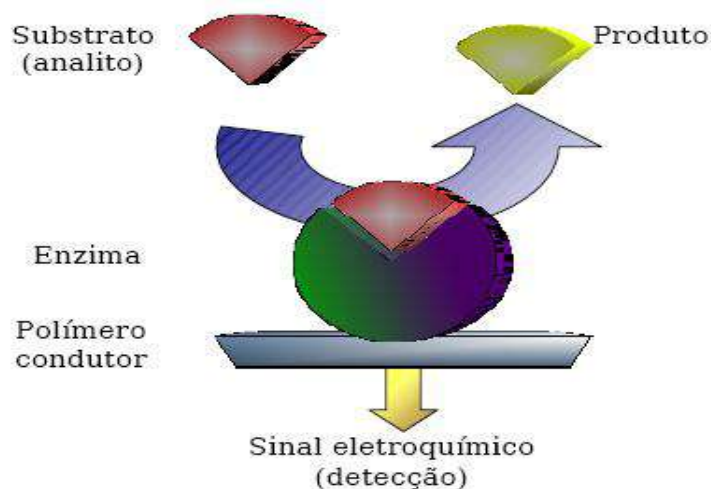
Atualmente, também têm sido propostos para a medida de biomarcadores de câncer, biomarcadores cardíacos, bem como biomarcadores para doenças autoimunes, doenças infecciosas e para a análise de DNA. Biossensores baseados em células inteiras imobilizadas tiveram novas aplicações, como detectar a presença de câncer e monitorar a resposta de células cancerosas aos agentes quimioterápicos (D'Orazio, 2011, pág 1749).

A monitoração contínua, rápida e sensível é requerida para a medição eficiente da concentração do fluido corporal, para fins de diagnóstico e avaliação do progresso de doenças. Nesse contexto, biossensores eletroquímicos são métodos analíticos promissores para a detecção sensível e seletiva de biomoléculas (Rahman *et al*, 2008, pág 126).

O funcionamento dos biossensores, de forma geral, se baseia inicialmente no reconhecimento de um substrato pelo componente biológico. Alta especificidade e sensibilidade do componente biológico com o substrato de interesse são de grande importância para o bom funcionamento do biossensor. Em seguida, como produto da interação entre a molécula biológica e o substrato, variações de um ou mais parâmetros físico-químicos são gerados e estes produzem íons, elétrons, calor, luz, massa,



fluorescência ou gases, que são convertidos em um sinal elétrico quantificável e processável pelo uso de um transdutor adequado (Coelho *et al.*, 2008).



**Figura 2:** Esquema representativo do princípio de funcionamento de um biossensor eletroquímico.

A aplicação de um biossensor permite a detecção quantitativa de uma determinada espécie, pois este responde seletiva e reversivelmente à espécie química produzindo um sinal elétrico cuja intensidade depende da concentração da dita espécie (Coelho *et al.*, 2008).

A maior parte dos biossensores desenvolvidos utiliza enzimas como componentes biológicos, geralmente imobilizadas. A vantagem do uso de enzimas é que estas são catalisadores biológicos altamente específicos e seletivos. Outras vantagens são a disponibilidade de um sítio reativo que possa reagir/interagir com o analito, estabilidade face ao meio e às condições de medição e possibilidade de modificação/imobilização sobre suportes por métodos químicos sem afetar seu desempenho (Coelho *et al.*, 2008).

Porém, as desvantagens da aplicação destes componentes biológicos devem-se a baixa estabilidade que estes apresentam; a necessidade de cofatores, em alguns casos; a sensibilidade a variações das condições ambientais e ao custo elevado. A Tabela 1 apresenta alguns exemplos de biossensores enzimáticos e suas áreas de aplicação (Coelho *et al.*, 2008).

**Tabela 1:** Exemplos de biossensores enzimáticos (Coelho *et al*, 2008)

<b>Componente medido</b>	<b>Enzima imobilizada</b>	<b>Tipo de transdutor</b>	<b>Faixa de medida</b>	<b>Áreas de aplicação</b>
Glicose Sacarose	Glicose oxidase, Invertase	Amperométrico	$10^{-6}$ - $10^{-4}$ M	Indústria de alimentos, agricultura
Etanol	Álcool desidrogenase	Amperométrico	Até 800 ppm	Análise clínica
Ácido Ascórbico	Ascorbato oxidase	Amperométrico	62,5 – 500 $\mu$ M	Indústria de Alimentos
Fenol	Rodinase	Calorimétrico	0,01M – 1,0 M	Meio Ambiente
Peróxido de hidrogênio	Peroxidase	Ótico	1-10mM	Bioprocessos, Análise clínica
Penicilina	Penicilinase	Potenciométrico	$10^{-4}$ - $10^{-2}$ M	Médica

## 2.1. Enzimas ligadas a transdutores

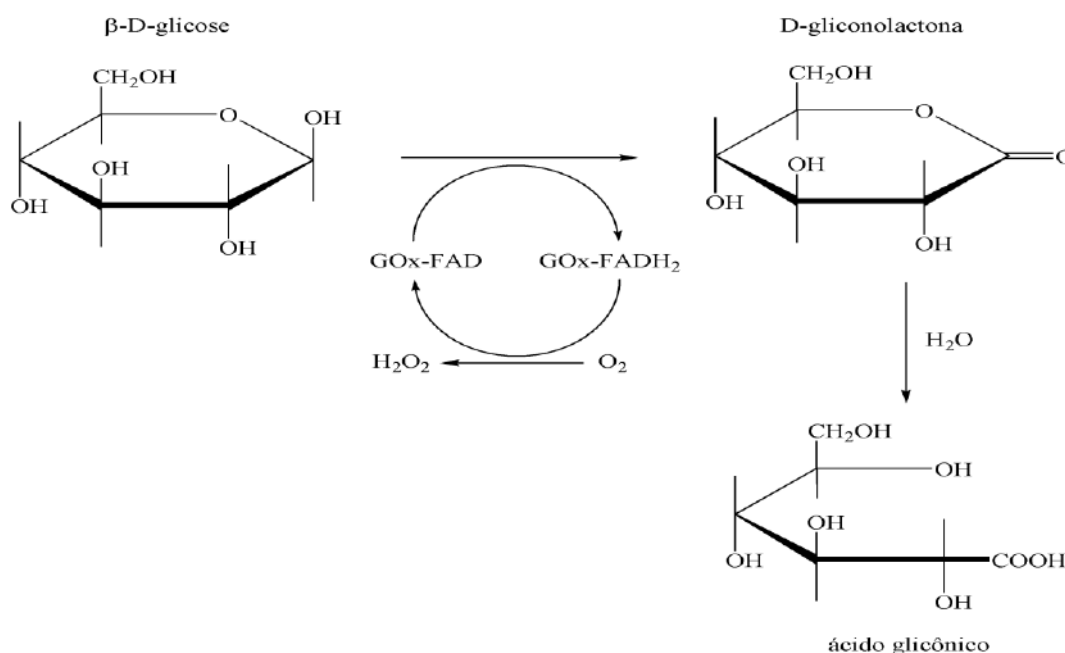
O primeiro biossensor para a determinação de glicose, conhecido como eletrodo de enzima, foi apresentado por Clark e Lyons, em 1962. E entre vários exemplos, se pode citar os biossensores enzimáticos amperométricos para colina e glutamato que foram fabricados imobilizando covalentemente as enzimas colina oxidase e glutamato oxidase em camadas de poli-5,2':5'2"-tertiofeno-3'-ácido carboxílico, poli-TTCA (Poli-CP).

A forma mais simples de um sensor enzima-transdutor é o denominado eletrodo enzimático que é uma combinação de sondas eletroquímicas (amperométrica, potenciométrica e condutométrica) com uma fina camada (10 a 200 nm) de enzima imobilizada. Nesse caso, a enzima se une a partir de um procedimento de imobilização a um eletrodo. Nesses dispositivos, a função da enzima é promover a seletividade em virtude de sua afinidade biológica por um substrato, em particular. O eletrodo, por sua

vez, irá detectar a presença do substrato ou do produto proveniente dos sinais elétricos oriundos da reação enzimática. O progresso da reação enzimática é monitorado tanto pela taxa de formação de produto ou do desaparecimento do reagente, que gera uma corrente elétrica que é detectada pelo eletrodo, e pode ser diretamente relacionada à concentração do analito (Maldovan, 2007, pág 159).

Por exemplo, no caso do biossensor de glicose, uma enzima depositada na superfície de um eletrodo age como elemento de bioreconhecimento para identificar moléculas de glicose. Quando uma enzima (ex.: Glicose Oxidase) reconhece a molécula de glicose, irá agir como catalisador para produzir ácido glucônico e peróxido de hidrogênio usando oxigênio do ar. A transferência de elétrons devido ao acoplamento hidrogênio/peróxido de hidrogênio é facilmente detectável e o fluxo de elétrons é proporcional ao número de moléculas de glicose presentes na solução.

As reações de oxidação da glicose e regeneração da enzima são representadas na Figura 3.



**Figura 3:** Reação enzimática de oxidação da glicose.

Quanto às novas matrizes de imobilização de enzimas utilizadas, estas incluem filmes compósitos, micropartículas poliméricas, quitosana e polímeros condutores, que permitem a transferência de elétrons entre biorreações e eletrodos, sem a necessidade de nanopartículas. As vantagens de performance da transferência direta de elétrons

incluem tempo de resposta mais rápido. Outras melhoras publicadas recentemente incluem vida útil de 60 dias ou mais, melhor resistência a condições ambientais durante a estocagem do sensor e melhor seletividade em relação a outras substâncias interferentes (D'Orazio, 2011, pág 1756).

Um grande número de eletrodos enzimáticos tem se baseado em eletrodo de oxigênio combinado com reações redox enzimáticas. Um exemplo é a determinação de glicose com a enzima glicose oxidase: à medida que a reação transcorre, a concentração de oxigênio cai e esta variação pode ser detectada de forma contínua pelo eletrodo. Na prática, esta resposta pode ser modificada por alguns fatores externos que afetam o tempo necessário, isto é, quando a velocidade de acesso do substrato à enzima e a velocidade de consumo são iguais. Em geral, esse ponto é alcançado entre 30 segundos e 10 minutos (Coelho *et al*, 2008).

Como se pode notar da Tabela 1, os biossensores também podem ser classificados em relação ao tipo de transdutor. Os transdutores empregados nos eletrodos são de dois tipos: potenciométricos e amperométricos.(Coelho *et al*, 2008)

### **Potenciométricos**

Os transdutores potenciométricos, por exemplo o eletrodo de pH de vidro, determinam o potencial entre um eletrodo de referência e um eletrodo do sensor. Dado que o pH afeta a cinética das enzimas é evidente que este não é um parâmetro ideal de medida. Conforme o pH muda devido à reação enzimática, também variará a atividade catalítica da enzima, causando deste modo uma resposta não-linear da sonda com a concentração. Para evitar tal interferência, modifica-se a seletividade do eletrodo frente aos íons empregando-se, por exemplo,  $\text{NH}_4^+$  ou  $\text{K}^+$  que são mais adequados para uma utilização em uma sonda enzimática. As considerações teóricas indicam que a resposta de um eletrodo enzimático será modificada com variações da temperatura externa. A resposta de um eletrodo de vidro está bem caracterizada e a maioria permite compensação de temperatura. Todavia, seus efeitos na atividade enzimática e na estabilidade devem ser considerados (Coelho *et al*, 2008).

## Amperométricos

A segunda categoria de eletrodos é do tipo amperométrico ou eletroquímico. Biossensores amperométricos são dispositivos que apresentam resposta elétrica específica para diferentes substâncias em uma amostra. Frequentemente, durante a detecção do analito, há conversão deste em outra espécie química, com liberação de elétrons que são recolhidos por um sistema, dando origem a um sinal eletroquímico (Cartwell, 1997).

O exemplo mais comum é o eletrodo de oxigênio de Clark. Está baseado em um catodo de platina ( $4\text{H}^+ + 4\text{e}^- + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$ ) e um anodo de prata ( $4\text{Ag} + 4\text{Cl}^- \rightarrow 4\text{AgCl} + 4\text{e}^-$ ) mergulhados na mesma solução de cloreto de potássio, mas separados da amostra por uma membrana. Ao se aplicar um potencial de 0,5 a 0,8 V entre os dois eletrodos, a corrente gerada é proporcional à concentração de substrato na amostra (Coelho *et al*, 2008).

No caso de transdutores potenciométricos, o potencial é medido através de um circuito de alta impedância e, portanto, não há corrente e não se consome substrato ou produto. No caso do eletrodo amperométrico de oxigênio, o substrato da reação enzimática deve ser alterado pelas reações redox que ocorrem no eletrodo (Coelho *et al*, 2008).

Os processos que podem alterar o comportamento do eletrodo são:

$[\text{S}] \rightarrow [\text{S}]_{\text{superfície do eletrodo}}$  (difusão em solução)

$[\text{S}]_{\text{superfície do eletrodo}} \rightarrow [\text{S}]_{\text{enzima}}$  (difusão interna)

Estes processos descrevem o transporte do substrato. O consumo do substrato pode ser descrito em termos da cinética enzimática e, no caso dos eletrodos amperométricos, da reação na sua superfície (Coelho *et al*, 2008).

Os efeitos de resistência à difusão podem ser considerados através da transferência de massa com reação química, de uma forma semelhante a que ocorre nos reatores com enzima imobilizada. Na prática, os fatores que afetam a aplicabilidade da sonda são:

- Tempo de resposta - reflexo do tempo necessário ao balanceamento da transferência de massa por eliminação catalítica;
- Tempo de lavagem – é o tempo necessário para que a resposta da sonda volte a seu nível basal em uma solução livre de substrato;
- Faixa de linearidade - é dada pelo  $K_m$  da enzima. A concentrações significativamente menores que o  $K_m$ , a resposta da sonda será de primeira ordem e, portanto, linear. À medida que se incrementa a concentração e a enzima se satura, a cinética passa a ser de ordem zero e surge a não-linearidade.

Como a resistência à transferência de massa é importante, então a concentração de substrato na superfície da enzima imobilizada será mais baixa que em solução e a faixa de linearidade efetiva aumentará. Não obstante, ainda que os efeitos da transferência de massa possam ampliar esta faixa, a vantagem obtida pode ser anulada pelo aumento do tempo de resposta e de lavagem necessários, que limitará a velocidade de determinação das amostras (Coelho *et al*, 2008).

Outro tipo de biossensor é o biossensor colorimétrico. O princípio deste é a alteração das propriedades ópticas de determinadas substâncias por reações enzimáticas ou microbiológicas, sendo que a luz emitida por estes componentes biológicos ou sua resposta sob iluminação pode ser convenientemente monitorada via elemento fotossensor (Coelho *et al*, 2008).

## **2.2. Biossensores baseados em Nanotecnologia**

Nanotecnologia é definida como o estudo de síntese, propriedades e aplicação de estruturas e materiais tendo ao menos uma dimensão crítica entre 1 e 100nm. Em relação aos biossensores, a dimensão crítica está diretamente relacionada à função de medida do biossensor, tal como a dimensão que controla a área disponível para a imobilização do elemento de bioreconhecimento, ou a dimensão que controla a magnitude do sinal, tal como a área superficial do eletrodo no caso de biossensores eletroquímicos, ou área disponível para a detecção de formação de complexos entre elementos de reconhecimento e analitos alvo no caso de biossensores baseados em transdutores mecânicos. A grande razão área superficial/volume superficial presente em nanoestruturas para imobilização de elementos de bioreconhecimento oferece potencial

para alta amplificação de sinal e melhora a medida de sensibilidade (D’Orazio, 2011, pág 1750).

A nanotecnologia tem sido aplicada a biossensores para melhorar a performance dos mesmos utilizando modos de transdução eletroquímicos, ópticos, mecânicos e físicos, e permitir que as matrizes de biossensores sejam construídas para a detecção em paralelo (D’Orazio, 2011, pág 1749). Talvez esta tenha sido a tendência mais notável na pesquisa de biossensores desde a década passada. Além de algumas vantagens de performance mencionadas acima, a nanotecnologia oferece aos biossensores a possibilidade de construção de arranjos de biossensores para medidas paralelas de alto rendimento e a possibilidade para integração dos biossensores com microfluidos para a construção de dispositivos *lab-on-a-chip*. Foi proposto a utilização da nanotecnologia para aumentar a biocompatibilidade dos biossensores e uma solução possível ao problema de rejeição dos biossensores implantáveis – um problema que tem dificultado o progresso na área do sensoreamento *in vivo* por vários anos (D’Orazio, 2011, pág 1750).

Várias pesquisas recentes realçaram o uso de biossensores com nanotecnologia para alcançar a detecção sensível de biomarcadores cardíacos para diagnóstico precoce do infarto agudo do miocárdio (D’Orazio, 2011, pág 1755).

Outro exemplo é um novo tipo de biossensor de glicose baseado em nanotubos de carbono simples (SWCNT) montados em um microeletrodo. O gás hidrogênio gerado é absorvido pelos nanotubos de carbono, que modificam as suas condutividades, devido a uma mudança na estrutura das bandas. Esse tipo de dispositivo seria minimamente invasivo ou, até mesmo, não invasivo, requerendo apenas uma pequena amostra de sangue ou outro fluido corporal. Também poderia ser altamente sensível, muito rápido e imune a falsos positivos e não precisaria de calibração. Foi demonstrado que um sinal de leitura é proporcional aos níveis de glicose dentro de um intervalo clinicamente significativo (Maldovan, 2007, pág 159).

Atualmente, polímeros condutores nanoestruturados funcionalizados têm recebido grande atenção em nanociência e nanotecnologia em função de suas grandes áreas superficiais. Têm tido aplicações em materiais para sensores, entre tantas outras.

### 2.3. Biossensores baseados em polímeros condutores

Durante as últimas três décadas, polímeros condutores emergiram como um dos materiais mais interessantes para a fabricação de sensores eletroquímicos. A modificação de sensores eletroquímicos com materiais poliméricos condutores tem sido utilizada para transmitir sensibilidade e seletividade para os analitos de interesse clínico.

Polímeros condutores são materiais versáteis para biossensores, porque eles podem ser produzidos de forma rápida, com controle de espessura e porosidade e também podem ser seletivamente imobilizados por eletropolimerização em áreas bem pequenas em diversas superfícies, provendo então, uma rota fácil para a funcionalização de microeletrodos (Xia *et al*, 2010, pág 7).

Os filmes de polímeros condutores que melhoram a performance de sensoreamento dos biossensores podem ser divididos em três aspectos: a espessura do filme em nanoescala, a porosidade e a morfologia (Xia *et al*, 2010, pág 7).

A boa performance de nanofilmes de polímeros condutores é devida à grande parte disponível da superfície externa que pode interagir com os analitos. Em filmes de polímeros condutores com rugosidade em nanoescala, a boa performance é devido a maior quantidade de sítios de ligação disponíveis para os analitos, em decorrência da maior área superficial. Já em filmes de polímero condutor nanoporosos, a sensibilidade é independente da espessura do filme, devido à estrutura porosa, que por sua vez garante a boa performance por facilitar a interação do analito em todas as áreas expostas, dentro e fora do filme. Será dado destaque ao aspecto da espessura do filme em nanoescala, que corresponde ao aspecto do filme que foi sintetizado nesse trabalho.

As vantagens em se utilizar polímeros condutores em sensores, em relação aos materiais convencionais são as seguintes: a) a disponibilidade de diversos tipos de monômeros e análogos sintéticos; b) preparação química que permite a produção de massa e miniaturização dos sensores; c) a facilidade com que biomateriais como enzimas, anticorpos e células inteiras podem ser incorporados; d) a habilidade de mudança do estado de oxidação do polímero após a deposição, moldando assim as características sensórias do filme; e e) a habilidade de se obter respostas reversíveis à temperatura ambiente (Moldovan, 2007, pág 154).



E a grande vantagem é o potencial de exibir respostas de propriedades melhoradas e a sensibilidade a perturbações muito pequenas (Rahman *et al*, 2008, pág 118).

É conhecida a compatibilidade dos polímeros condutores com moléculas biológicas em soluções neutras. E esses polímeros também podem ser modificados para ligar biomoléculas a um biossensor (Rahman *et al*, 2008, pág 118).

Trabalhos sobre o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos utilizando polímeros condutores são descritos na literatura envolvendo a síntese química ou eletroquímica do polímero com a imobilização de enzimas específicas durante este processo. Diferentes métodos de imobilização são descritos na literatura, envolvendo a modificação química de superfícies de filmes poliméricos (Fiorito *et al*, 2006), o encapsulamento de enzimas com revestimento de polímero condutor (Ramanavičius *et al*, 2005), dentre outros.

Outra vantagem dos polímeros condutores é que a síntese eletroquímica permite a deposição direta do filme no eletrodo seguido pela imobilização das enzimas. Assim, as propriedades únicas dos polímeros condutores juntamente com a possibilidade de imobilizar enzimas durante a síntese eletroquímica tem sido explorada para a fabricação de biossensores amperométricos (Rahman *et al*, 2008, pág 126).

Alguns dispositivos têm limite de detecção da ordem de  $10^{-8}$  mol.L<sup>-1</sup> e, em geral, a especificidade da detecção permite a utilização do biossensor diretamente em fluídos e amostras reais. Outro aspecto de importância a ser considerado é a possibilidade de obtenção de relações lineares entre o sinal eletroquímico e a concentração do analito, na maior faixa de concentrações acessíveis experimentalmente. Esta característica deve garantir a aplicação direta do método em amostras com diferentes concentrações (Darain *et al*, 2007).

Nos anos recentes, estudos de sensores baseados em polímeros condutores mostraram uma tendência ao desenvolvimento de sensores baseados em polímeros condutores nanoestruturados, devido a possibilidade de moldar tamanhos e estruturas, e portanto, as propriedades desses materiais. Por exemplo, nanoestruturas de polímeros condutores, tais como nanotubos e nanopartículas oferecem novas oportunidades como plataformas de sensoriamento para as áreas biológicas e ambientais (Xia *et al*, 2010, pág 7).

### 2.3.1. Biossensores baseados em polímeros condutores nanoestruturados

A sensibilidade e o tempo de resposta de um biossensor de polímero condutor são altamente dependentes da espessura do filme. Dessa forma, um analito pode adsorver e se difundir em um filme mais fino de forma mais fácil do que em um filme espesso. E ainda, filmes mais finos apresentam maior área superficial para a interação com o analito. Consequentemente, maior sensibilidade e tempos de resposta mais rápidos são esperados à medida que o filme se torna mais fino (Xia *et al*, 2010, pág 7).

De acordo com Xia *et al* (2010) filmes nanoestruturados de polímeros condutores podem ser produzidos através das técnicas de polimerização eletroquímica, *spin-coating* e camada por camada (LBL), nas quais as moléculas bioativas podem ser incorporadas. Por exemplo, um processo simples de eletropolimerização foi empregado para a fabricação de um filme ultra-fino de PPy-glicose oxidase (~55nm), para o sensoriamento potenciométrico de glicose. O uso de densidade de corrente mais baixa por um período mais longo para alcançar a mesma quantidade de carga transportada, permitiu a formação de um filme ultra-fino mais homogêneo e permeável, dando consequentemente melhor sensibilidade à glicose.

## 2.4. Perspectivas

Muitos dos relatos de biossensores encontrados na literatura se referem à detecção de um ou poucos analitos, contudo, os biossensores com promessas comerciais devem ser baseados em tecnologias de sensoriamento versáteis para suportar elementos de reconhecimento intercambiáveis, e na possibilidade de miniaturização para possibilitar o sensoriamento paralelo. Seriam de boa promessa comercial ainda biossensores baseados em tecnologias que apresentam vantagens de desempenho sobre os métodos existentes ou ainda sensibilidade ou especificidade melhorada.

O número de pesquisas que descrevem novos biossensores para analitos de interesse clínico continua a crescer, porém o movimento dos biossensores das pesquisas laboratoriais para laboratórios clínicos tem sido lento.

O grande impacto dos biossensores será sentido em ensaios locais *point-of-care*, sem o suporte do laboratório. O desenvolvimento de dispositivos portáteis em

localizações remotas poderiam ser úteis, especialmente em países em desenvolvimento onde o acesso a locais de saúde com suporte laboratorial é limitado. A integração dos biossensores em uma instrumentação confiável e fácil de usar será necessária para garantir o sucesso do biossensor baseado em sistemas *point-of-care* (D'Orazio, 2011, pág 1749, 1750 e 1755).

### 3. POLÍMEROS CONDUTORES

Os polímeros condutores têm atraído considerável atenção nas últimas três décadas devido às suas propriedades elétricas distintas. Às vezes são chamados de metais sintéticos por apresentarem propriedades elétricas, eletrônicas, magnéticas e ópticas que são inerentes aos metais e semicondutores. Exibem propriedades condutoras de metais, propriedades mecânicas atrativas e vantagens de processamento de polímeros. (Böyükbayram, 2005, pág 1)

Por exemplo, polímeros condutores eletroativos como polipirrol (PPy), politiofeno, e polianilinas são estruturas complexas e dinâmicas que cativam a imaginação dos que estão envolvidos na pesquisa de materiais inteligentes.(Wallace *et al*, 2002)

Muitas definições são empregadas por vários autores, para o conceito de materiais inteligentes. Segundo Wallace *et al* (2002), um material inteligente é capaz de reconhecer estímulos ambientais apropriados, processando a informação proveniente de um estímulo e respondendo ao mesmo de maneira apropriada num certo período. Uma outra característica desejável é que o material deveria ser idealmente auto-alimentado, tendo funções de conversão e armazenamento de energia.

É possível criar polímeros condutores com diversas propriedades. Por exemplo, a manipulação das propriedades químicas pode gerar materiais capazes de capturar ânions simples ou bioativos. Propriedades elétricas podem ser manipuladas com a finalidade de produzir materiais com diferentes condutividades e propriedades redox. As propriedades redox podem ainda ser manipuladas através de processos redox. A aplicação de corrente elétrica pode resultar em mudanças drásticas nas propriedades químicas, elétricas e mecânicas dos polímeros condutores. Essas propriedades complexas podem ser controladas apenas se entendemos, em primeiro lugar, a natureza do processo que as regula durante a síntese, e em segundo lugar, o quanto essas propriedades podem ser modificadas devido à aplicação de um estímulo elétrico. É a habilidade de controlar as propriedades dinâmicas dos polímeros condutores em diversos ambientes operacionais que poderia levar ao desenvolvimento de materiais inteligentes (Wallace *et al*, 2002).

É possível controlar as propriedades químicas e elétricas durante a síntese, pois essas propriedades variam em função da aplicação de estímulo externo (Wallace *et al*, 2002).

A organização molecular requerida para alcançar as propriedades químicas e elétricas desejadas irá determinar as propriedades mecânicas do material. Cada uma das três propriedades (química, elétrica e mecânica) estão ligadas (Wallace *et al*, 2002).

Uma grande variedade de métodos de síntese e processamento existentes na literatura podem ser utilizados para produzir materiais na forma que possam ser integrados em estruturas verdadeiramente inteligentes (Wallace *et al*, 2002).

Polímeros condutores emergiram como um dos principais assuntos na pesquisa de materiais inteligentes. Devem ter todas as propriedades desejáveis:

- São passíveis de modelagem em nível molecular para reconhecer um estímulo específico;
- Por serem condutores, facilitam o transporte de informação elétrica;
- São capazes de processamento localizado, bem como atuar em mecanismo de resposta;

Polímeros condutores têm ainda mais vantagens especiais e práticas. O fato de conduzirem eletricidade significa que nós podemos conectá-los a ferramentas eletrônicas, como computadores e interfaces (Wallace *et al*, 2002).

Informações sobre o comportamento desses sistemas podem ser recuperadas em tempo real em ambientes *in situ* usando técnicas de caracterização que serão descritas adiante (Wallace *et al*, 2002).

### **3.1. História dos polímeros condutores**

Segundo Moldovan, até pouco mais de 30 anos, polímeros baseados em carbono eram restritamente considerados materiais isolantes, e a ideia de polímeros que conduziam eletricidade era absurda. No entanto, de acordo com a tese de Büyükbayram, as propriedades condutoras de alguns polímeros já eram conhecidas bem antes disso. Foi observado em 1916 que o Pirrol formava um “pirrol preto” condutor via polimerização espontânea na exposição ao ar em um dos lados de *containers* de pirrol, tendo sido sua polimerização estudada em detalhes.

Desde 1957, estudos de oxidação eletroquímica de monômeros aromáticos foram reportados em várias descrições, como preparações eletro-orgânicas e eletro-oxidações.

Em 1967, polímeros condutores de pirrol, tiofeno e furano foram caracterizados e a condutividade de anilinas foi percebida.

Em 1968, dall 'Ollio descreveu a eletropolimerização do pirrol.

Poli(sulfeto de p-fenileno), PPS, tem sido produzido comercialmente para aplicações termoplásticas desde o início da década de 70.

E uma síntese bem definida de poliacetileno tem sido reportada desde 1971.

Uma descoberta importante no desenvolvimento de polímeros condutores foi feita em 1973, a qual revelou que polímeros inorgânicos de nitreto de enxofre  $(\text{SN})_x$  exibiam propriedades metálicas. A condutividade à temperatura ambiente do  $(\text{SN})_x$  é da ordem de  $10^3 \text{ S/cm}$ , podendo ser comparada com cobre  $10^6 \text{ S/cm}$  e com polietileno  $10^{-14} \text{ S/cm}$ . Porém, a sua natureza explosiva impediu que se tornasse comercialmente importante. Apesar disso,  $(\text{SN})_x$  induziu o interesse nesse campo que levou à descoberta de uma classe totalmente nova de polímeros condutores.

O impacto na ciência em geral foi reconhecido em 2000 pela concessão do Prêmio Nobel de Química a três descobridores da condutividade do poliacetileno: Alan McDiarmid, Alan Heeger e Hideki Shirakawa. Estes descobriram, em 1977, que esse polímero conjugado mais simples mostrou condutividade alta e bem caracterizada para um material orgânico, quando na síntese, foi adicionado um excesso de catalisador Ziegler-Natta, com subsequente oxidação parcial por iodo ou vapores de bromo. Assim, os conceitos de condutividade e eletroatividade de polímeros conjugados foram rapidamente ampliados do poliacetileno para incluir um número de hidrocarbonetos conjugados e/ou polímeros heterocíclicos aromáticos como poli(p-fenileno), polipirrol e politiofeno. O resultado disso foi que o campo de pesquisa de polímeros condutores tem se desenvolvido e expandido em passos rápidos desde a década de 70, e tem sido uma área de pesquisa forte para várias instituições acadêmicas. Essa pesquisa tem apoiado o desenvolvimento industrial de produtos oriundos de polímeros condutores e fornecido um entendimento fundamental desses materiais dentro da química, da física e da ciência dos materiais.

O número de publicações sobre o assunto aumentou rapidamente nos anos 80. Os dados na literatura sugerem um pico no número de patentes no final dos anos 80,

enquanto a taxa de publicações científicas aumentou consideravelmente no final dos anos 90.



**Figura 4:** Alan McDiarmid, Alan Heeger e Hideki Shirakawa os três descobridores da condutividade do poliacetileno (Wallace *et al*, 2002).

Atualmente, são conhecidos um grande número de polímeros condutores, e se pode citar os seguintes: poliacetileno (PAC), polipirrol (PPy), Politiofeno (PTh), Polianilina (PAn), Poli(para-fenileno) (PPV), Poli (tienileno-vinileno) (PTV), Poli(furileno-vinileno) (PFV), Poli(fenilenosulfeto) (PPS), Poli(fenileno etinileno) (PPE), Poliseleneofeno (X=Se), Polifurano (X=O), Poli (N-anilina), Poli(N-pirrol), Poli (difetilamina), Poli(indol), Poli(tieno[3,2-b]pirrol), Poli(floureno) e Polipiridina (Wallace *et al*, 2002).

Tem sido investigada uma ampla variedade de aplicações dos polímeros condutores, como baterias recarregáveis e dispositivos eletrocromicos.

Neste trabalho será dado destaque ao polipirrol, que é o material utilizado na construção dos biossensores.

## **3.2. Polipirrol (PPy)**

### **3.2.1. Síntese e estrutura**

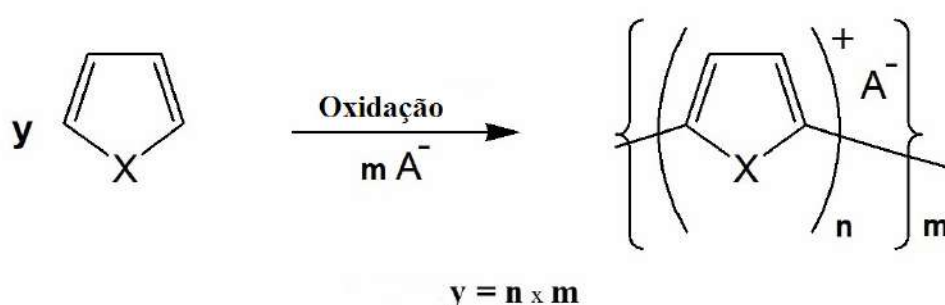
O polipirrol (PPy) tem excelentes propriedades elétricas, térmicas e mecânicas e pode ser sintetizado de forma relativamente simples, através da oxidação do pirrol ou monômeros substituídos de pirrol. Na maioria dos casos, as oxidações são feitas por meio de (1) eletropolimerização em um substrato condutor (eletrodo), através da aplicação de um potencial externo (síntese potenciostática) ou corrente elétrica (síntese

galvanostática), ou (2) polimerização química em solução pelo uso de um oxidante químico. Rotas de polimerização catalisadas por enzimas e iniciadas fotoquimicamente também já foram descritas, mas encontram-se ainda em estágio de desenvolvimento. Essas diferentes técnicas produzem materiais de polipirrol com diferentes formas - oxidações químicas geralmente produzem pós, enquanto a síntese eletroquímica produz filmes depositados em um eletrodo de trabalho e a polimerização enzimática gera dispersões aquosas. O método mais comum para a deposição do PPy é a polimerização eletroquímica, que será descrita a seguir, juntamente com os parâmetros que influenciam o processo de polimerização e as propriedades dos polímeros.

### 3.2.1.1. Polimerização eletroquímica

A eletropolimerização é um método eficiente para se preparar polímeros condutores, como filmes finos em substratos condutores. Fornece total controle sobre a taxa de polimerização resultando em maior reprodutibilidade do material obtido, e ainda, torna possível a inserção de grande quantidade de contra-íons dopantes presentes na mistura que podem ser incorporados no polímero para manter a eletroneutralidade. (Cruz, 2006, pág 3)

Polipirrol pode ser formado pela oxidação do pirrol em um anodo adequado. Devido à aplicação de um potencial positivo ou corrente elétrica, um material polimérico condutor insolúvel é depositado no anodo. A reação pode ser representada da seguinte forma:



**Figura 5:** Esquema de polimerização química ou eletroquímica de monômeros heterocromáticos de 5 membros [X=N-H, no caso do polipirrol].

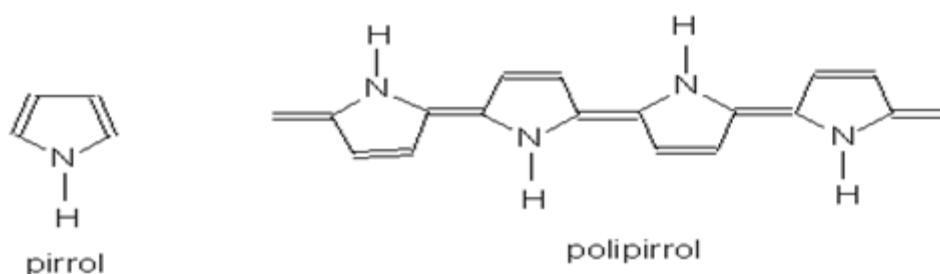
Devido à natureza oxidativa da eletropolimerização, o polímero depositado está tipicamente no seu estado oxidado, então é necessária a presença de um contra-íon para



balancear as cargas na estrutura do polímero. A eficiência da polimerização é dada pela facilidade com que elétrons podem ser removidos do monômero, e pela estabilidade do radical cátion resultante através da estabilização por ressonância.

A quantidade de contra-íons deve ser alta (pode ser maior que 50%p/p), e geralmente é incorporado entre os planos do polipirrol, que são predominantemente ligações  $\alpha$ - $\alpha$ . Em uma cadeia de polipirrol ideal assume-se que os anéis de pirrol estão alternados e que a geometria é tal que o contra-íon é intercalado entre as cadeias planares do polímero. Em materiais reais, esta estrutura idealizada é distorcida pois materiais altamente reticulados e insolúveis são formados.

A primeira etapa (oxidação do monômero) é lenta; o acoplamento radical-radical, desprotonação e subsequente oxidação são rápidos. Acredita-se que a polimerização procede via mecanismo do acoplamento radical-radical, assumindo que a repulsão natural dos radicais é anulada pela presença de outras espécies, tal como solvente, contra-íon e até mesmo monômero. O crescimento da cadeia continua até a carga na cadeia ser tal que um contra-íon é incorporado. Eventualmente, à medida em que a cadeia do polímero em crescimento atinge um tamanho crítico, o limite de solubilidade é excedido e o polímero precipita na superfície do eletrodo.



**Figura 6:** Estrutura do pirrol e estrutura idealizada do polipirrol.

Um maior entendimento do processo de polimerização levou ao desenvolvimento de técnicas inovadoras nos últimos anos.

O maior ponto de contenção é onde o acoplamento radical-radical ocorre e se o crescimento continuado está em solução ou na superfície do eletrodo. Alguma polimerização ocorre em solução, mas depende das condições experimentais empregadas. O polímero interage com o eletrodo sem cobertura ou com polímero previamente depositado à medida que a reação procede para produzir a estrutura final.

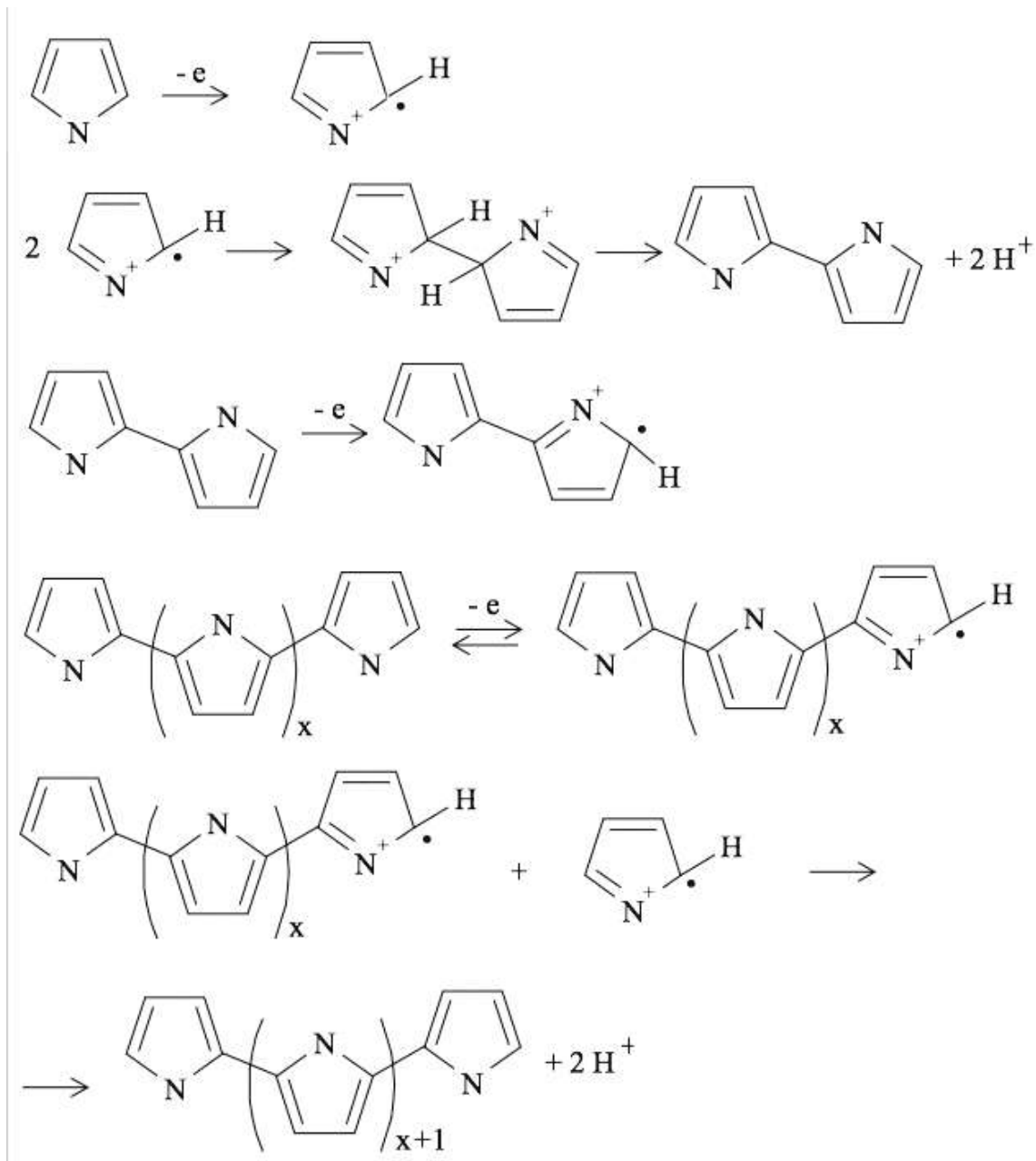
Uma vez que a camada inicial de polipirrol é depositada, se torna um reagente que determina o curso do processo de polimerização remanescente. A polimerização ocorre mais prontamente (em baixos potenciais) no polipirrol já depositado, ao invés da superfície anódica. Esse processo continua até que a reação para. Uma investigação mais detalhada do processo de polimerização revela as complexidades envolvidas na produção dessas estruturas dinâmicas sofisticadas. Portanto, o processo pode ser dividido em uma série de etapas discretas, como é mostrado a seguir:

**Etapas 1.** Oxidação do monômero

**Etapas 2.** Acoplamento radical-radical

**Etapas 3.** Desprotonação/Re-Aromatização

**Etapas 4.** Propagação da cadeia



**Figura 7:** Mecanismo de polimerização do pirrol formando polipirrol (Cruz, 2006).

As condições eletroquímicas, o material do eletrodo, o solvente, o contra-íon e o monômero influenciam a natureza do processo. Por exemplo, se o potencial aplicado é muito baixo (abaixo de certas condições), a taxa de polimerização será tal que não haverá nenhum precipitado; se o material do eletrodo é extremamente polar, no potencial requerido para a polimerização, a deposição pode ser desencorajada; se o solvente é nucleofílico (ou contém oxigênio dissolvido), este irá reagir com os radicais livres intermediários; a alta concentração de contra-íon empregada pode influenciar a condutividade da solução, as propriedades, estrutura e morfologia do polímero, a taxa

de polimerização e as interações polímero-solvente; foi demonstrado que monômeros de pirrol N-substituídos diminuem a condutividade eletrônica do material resultante e, geralmente, resultam na deterioração das propriedades mecânicas do polímero. No entanto, pirróis substituídos na posição 3 e 4 ( $\beta$ ), com substituintes não eletrofílicos e nem demasiadamente volumosos, são facilmente oxidados e geram polímeros com boa condutividade. Alguns grupos funcionais substituintes têm um efeito influente no processo de polimerização por fornecerem monômeros auto-dopantes, eliminando ou minimizando a necessidade de um eletrólito suporte. Enfim, solvente, monômero, contra-íon e interações com substrato são todos importantes já que eles influenciam o tamanho crítico e conseqüentemente, a solubilidade e/ou deposição do polímero resultante (Wallace *et al*, 2002).

Outra questão proveniente do exame mais profundo do mecanismo é a questão do que realmente controla a taxa de polimerização e, conseqüentemente, a estrutura do polímero. Todos os parâmetros mencionados acima desempenham uma função que varia dependendo do estágio de polimerização. Por exemplo, no estágio inicial de polimerização o substrato desempenha uma função crítica que diminui uma vez que a reação é iniciada. Por outro lado, se o monômero estiver em excesso quando a reação é iniciada pode se tornar, devido à depleção, o fator determinante da taxa à medida em que a reação procede (Wallace *et al*, 2002).

Com respeito à etapa de determinação da taxa, as reações eletroquímicas que ocorrem no catodo não podem ser ignoradas. Particularmente, em uma célula com dois eletrodos, esta etapa pode se tornar o fator determinante da taxa. Esse é o caso, por exemplo, quando a redução da água é a redução catódica. É geralmente assumido que reações que ocorrem no eletrodo auxiliar (o catodo) envolvem a redução do cátion eletrólito suporte, oxigênio dissolvido ou o solvente em si, se um reagente auxiliar como um íon de metal eletroativo ou ferrocianeto é acrescentado. A reação do eletrodo auxiliar irá, então, consumir esse aditivo (Wallace *et al*, 2002).

A hidrodinâmica do sistema eletroquímico e a temperatura também são importantes porque controlam a taxa de transporte de reagentes e produtos para a zona de reação eletroquímica. Isto, por sua vez, determina a eficiência de polimerização. A hidrodinâmica também é importante para determinar a forma de PPy produzido. Por exemplo, usando célula de fluxo contínuo e ambientes químicos apropriados, dispersões coloidais estáveis ao invés de filmes insolúveis podem ser produzidas (Wallace *et al*, 2002).

A polimerização eletroquímica apresenta vantagens como crescimento rápido de um filme de polímero de cerca de 100 nm de espessura em poucos segundos, comparado com as várias horas requeridas por métodos químicos, e simplicidade. Porém, uma limitação é gerar materiais insolúveis, o que impede a análise da estrutura primária por técnicas analíticas tradicionais (Wallace *et al*, 2002).

### 3.2.1.2. Condições eletroquímicas

O modo mais simples de induzir o processo de polimerização é aplicar um potencial constante positivo, ou seja, a síntese potenciostática. O potencial escolhido influenciará a taxa de oxidação e, portanto, a polimerização. Se a taxa de polimerização é muito lenta, a oxidação do monômero de pirrol pode ocorrer sem deposição porque o comprimento de cadeia crítico pode não ser alcançado, e então, a solubilidade não é excedida antes dos produtos deixarem a zona de reação próxima à superfície do eletrodo. Contudo, o valor máximo do potencial é limitado por um processo que resulta em superoxidação do polímero. Isso resulta em um polímero menos condutor e mais poroso, com propriedades mecânicas inferiores. O potencial de crescimento é sensível aos efeitos de queda do potencial ( $E$ ). À medida em que o polímero é depositado, a resistência do eletrodo ( $R$ ) aumenta e o potencial efetivo cai, alterando assim as características de crescimento do polímero (Wallace *et al*, 2002).

Uma alternativa é aplicar uma corrente constante para dirigir a reação, o que caracteriza uma síntese galvanostática. Isso geralmente resulta em um maior crescimento do filme, porém variações locais na densidade de corrente produzirão um filme heterogêneo. A taxa de polimerização é ditada pela densidade de corrente aplicada. De novo, se a taxa é muito lenta, oxidação sem deposição pode ocorrer. Porém se a taxa é muito alta, o potencial pode ficar na região onde a superoxidação do polímero pode ocorrer (Wallace *et al*, 2002).

Finalmente, potencial transiente ou corrente em forma de onda podem ser usados para a polimerização. O crescimento com voltametria cíclica tem sido muito usado para a realização de estudos mecanísticos. O uso de formas de onda transientes acrescenta outra dimensão ao crescimento por eletropolimerização, porque a oxidação/redução do polímero irá ocorrer durante o crescimento do filme e o efeito disso no processo de polimerização deve ser considerado (Wallace *et al*, 2002).

De fato, é este processo de oxidação/redução que resulta em estruturas mais ordenadas, e a deposição seria regulada pelo processo de oxidação/redução. (Mitchell *et al*, 1992).

### **3.2.1.3. A busca pela funcionalidade extra**

Foi provado ser possível adicionar uma ampla variedade de funcionalidades à estrutura do polipirrol, abrindo um leque de aplicações interessantes desses materiais. Duas abordagens distintas têm sido empregadas com sucesso para alcançar essas funcionalidades:

1. Ligação covalente de grupos específicos à estrutura do PPy (pré ou pós polimerização);
2. Incorporação de ânions dopantes específicos.

A ligação de substituintes simples como grupos alquila ou metóxi à estrutura do PPy é bem conhecida pelo aumento notável da solubilidade do polímero em solvente orgânico e conseqüentemente sua processabilidade. Já a ligação de substituintes mais complexos pode fornecer uma ampla variedade de outros atributos. Alguns exemplos serão dados a seguir, com ênfase particular na síntese de derivados de PPys com capacidades de sensoriamento.

Uma das técnicas consiste em sintetizar um monômero ou dímero contendo o grupo de reconhecimento apropriado; este é subsequentemente oxidado para produzir o polímero condutor. A desvantagem dessa abordagem é que a síntese do monômero substituído inicial pode ser complexa e consumir tempo. E ainda, a oxidação subsequente do monômero pode ser difícil devido ao impedimento estérico pelo grupo funcional ou efeitos eletrônicos que podem deslocar o potencial de oxidação do monômero. Um desenvolvimento significativo é uma rota que envolve a modificação fácil dos polipirróis pré-formados contendo grupos de saída como N-hidroxisucinamida. Usando essa abordagem, éteres e grupos eletroativos como ferroceno, bem como nucleotídeos, são covalentemente ligados aos anéis de pirrol. Essa técnica genérica pode ser estendida a politiofenos e polianilinas análogos. Outro desenvolvimento significativo foi a síntese de polipirróis quirais, por meio da eletropolimerização de monômeros de N- pirrol com substituintes quirais, feito pela primeira vez por Baughman *et al* (1985).

Um exemplo de incorporação de ânions específicos é a incorporação direta de dopantes biológicos em polímeros condutores, que está abrindo novas oportunidades em áreas como biossensores, biorreatores e superfícies inovadoras para cultivo celular.

### **3.2.2. Propriedades do polipirrol**

As condições de polimerização utilizadas para produzir PPy não apenas determinam a composição do polímero, mas também influenciam a estrutura do polímero do nível molecular ao microscópico. Nesta seção será revista a estrutura de filmes de PPy, partículas e dispersões coloidais. Esses estudos promovem a base para o entendimento das propriedades do PPy.

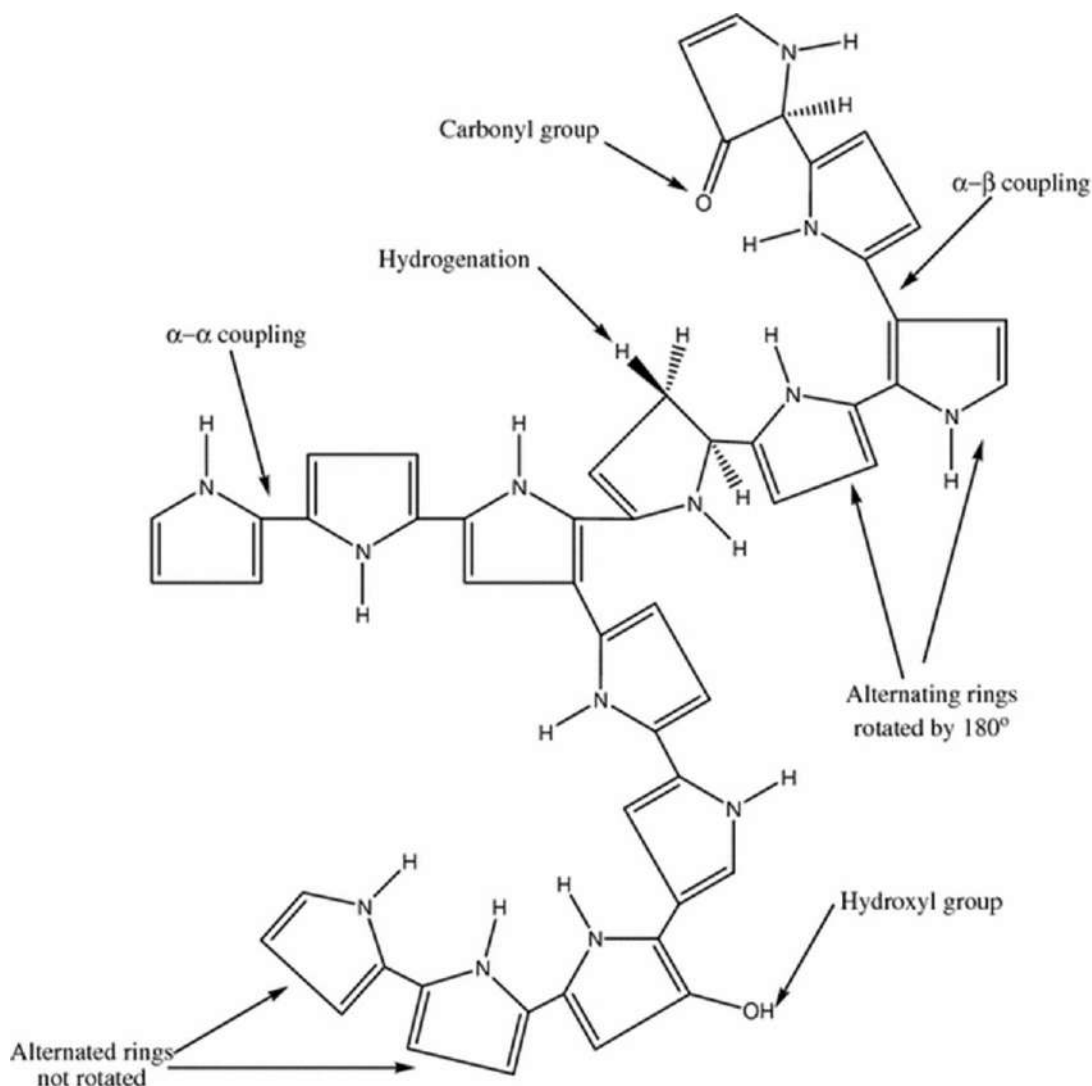
#### ***Peso molecular, ramificação e reticulação***

Um parâmetro estrutural chave para todos os polímeros termoplásticos é o peso molecular. O peso molecular tem um profundo efeito em propriedades físicas como resistência e dureza mecânica, viscosidade de soluções poliméricas e fusão do polímero. Como polímeros sintéticos contêm uma distribuição de pesos moleculares, é mais informativo medir a distribuição total usando técnicas como cromatografia de permeação em gel (GPC) e obter um peso molecular médio dessas distribuições (Wallace *et al*, 2002).

Infelizmente, a natureza insolúvel do polipirrol tornou as determinações de peso molecular virtualmente impossíveis. Métodos como GPC e outras técnicas incluindo espalhamento de luz, medições de viscosidade e pressão de vapor de osmose requerem que o polímero esteja dissolvido completamente. Como o polipirrol preparado por métodos convencionais não dissolve, essas análises não são possíveis (Wallace *et al*, 2002).

A natureza insolúvel do polipirrol é uma forte indicação que o polímero é substancialmente reticulado. No caso de polímeros reticulados, o peso molecular se torna sem sentido, e é a densidade de reticulação que é relacionada com as propriedades físicas como resistência, dureza e permeabilidade ao solvente. A evidência direta da reticulação química no PPy é rara, mas estudos de RMN mostraram evidências de ligações  $\alpha$ - $\alpha$  e  $\alpha$ - $\beta$ . Em alguns estudos, métodos teóricos foram utilizados para estimar a probabilidade de estruturas ramificadas formadas durante a polimerização do pirrol.

Essas simulações deram um grau de ramificação de 20% para a polimerização à temperatura ambiente, e mostraram uma leve dependência da ramificação em relação à temperatura de polimerização (aumentando com o aumento de temperatura). Estudos de XPS mostram um grau de polimerização de 33% e 22% para PPy/PF<sub>6</sub> e PPy/DBSA, respectivamente, concordando com os estudos anteriores (Wallace *et al*, 2002). As estruturas ramificadas e reticuladas, juntamente com os defeitos químicos mais comuns estão representados na Figura 8.



**Figura 2:** Estrutura molecular de uma cadeia de Ppy mostrando os tipos de ligações químicas e os defeitos químicos mais comuns em sistemas obtidos por eletropolimerização



### ***Cristalinidade e ordem molecular***

Vários estudos investigaram a maneira em que as cadeias de polímero são arranjadas em estado sólido para o PPy. A principal ferramenta utilizada nesses estudos é a difração de raios-X, onde o espalhamento do mesmo ocorre em ângulos específicos relacionados ao espaço entre camadas moleculares em estruturas cristalinas ordenadas. Os primeiros estudos realizados por Mitchell e Geri (1987) revelaram uma anisotropia molecular em filmes de PPy/pTS (para-tolueno-sulfonado) sintetizados eletroquimicamente. A anisotropia foi interpretada como devida às cadeias de PPy trans acopladas em planos paralelos à superfície do eletrodo, mas randomicamente orientadas na direção perpendicular ao eletrodo. Outros estudos revelaram que a anisotropia foi principalmente observada quando dopantes planares foram utilizados. Em tais casos, o dopante planar é considerado um modelo para ordenar as cadeias do polímero. Em contraste, dopantes não-planares, como  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{BF}_4^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ , produzem filmes que mostraram isotropia em estudos de difração de raio-X. Foi demonstrado que o grau de anisotropia aumenta quanto menor for a temperatura de polimerização, maior o potencial anódico de polimerização, altas razões molares dopante/monômero no eletrólito de polimerização e alto estiramento mecânico. Em todos os casos, as condições que favorecem o aumento na anisotropia também favorecem o aumento em condutividade elétrica, sugerindo que a anisotropia é devida à orientação molecular favorecendo um aumento no comprimento de conjugação.

Estudos mais detalhados da estrutura molecular do PPy/ $\text{PF}_6^-$  (hexafluorofosfato) foram publicados no início da década de 2000 (Wallace et al, 2002). Foram reportados picos de espalhamento devidos à ordem a curta distância que é independente da orientação do filme (Nogami et al, 1994). Esta descoberta é consistente com aquelas reportadas acima, pois o contra-íon  $\text{PF}_6^-$  é simétrico e não induz a uma orientação.

Sugere-se uma estrutura parcialmente cristalina com a cadeia do polímero alinhada à direção b e empilhada na direção c em um arranjo monocíclico (Yoon *et al*, 1999). As condições de polimerização que favorecem a condutividade mais alta (temperaturas e densidades de corrente baixas) também produzem um grau mais alto de cristalinidade (acima de 37%) e um maior comprimento de domínio de cristalito (acima de 2,6 nm ou ~8 anéis de pirrol). (Wallace et al, 2002)

Embora a maior parte da literatura descreva o arranjo trans planar para PPys sintetizados eletroquimicamente, foi encontrada uma clara evidência de uma estrutura helicoidal produzida do acoplamento cis de todos os anéis de pirrol. Há toda uma

literatura sobre difração de raio-X do PPy consistente com a estrutura helicoidal (Davidson *et al*, 1996).

Embora a anisotropia tenha sido notada em vários filmes de PPy, o grau de cristalinidade é muito baixo nesses materiais. Há evidências da formação do cristal em filmes finos de PPy, mas o crescimento do mesmo não é mantido à medida em que o filme aumenta a espessura. Assim, o polímero inicialmente formado na superfície do eletrodo pode ter um alto grau de ordem, mas esta não se estende para os filmes espessos (Davidson *et al*, 1996).

### ***Morfologia da superfície e densidade do filme***

A estrutura de PPys produzidos por síntese química e eletroquímica normalmente observada é a morfologia de nódulos, que variam de tamanho até centenas de microns e consistem em agregados de partículas menores. A estrutura foi referida como superfície de couve-flor (Wallace *et al*, 2002).

Muitos estudos identificaram vários fatores que influenciam o tipo de estrutura formada. Por exemplo, o tipo de dopante utilizado durante a eletropolimerização, a evolução do gás até a superfície do eletrodo de trabalho. Portanto, a formação simultânea de gás O<sub>2</sub> na superfície do eletrodo e de polímero produziria uma superfície rugosa. A reação que ocorre é a seguinte:



Estudos de microscopia de Força Atômica (AFM) foram realizados para determinar a morfologia da superfície e a rugosidade dos filmes de PPy sintetizados eletroquimicamente. Foi demonstrado que a superfície nodular surge bem no início do processo de eletropolimerização onde microilhas se formam na superfície de um eletrodo de ouro. Com tempos de polimerização mais longos, a espessura do filme aumenta e a superfície do filme consiste de nódulos de grãos empacotados de diâmetros submicrométricos (Li *et al*, 1995). Foi encontrada uma forte correlação entre o potencial de superfície dos filmes de PPy e a morfologia de superfície nodular (Barisci *et al*, 2000). Conclui-se que os nódulos são regiões ricas em dopantes com alta condutividade, onde núcleos foram inicialmente formados e os polímeros cresceram

subsequentemente e preferencialmente (Barisci *et al*, 2000). Esse conceito de crescimento foi previamente descrito por Yang *et al* (1990) e Jeon *et al* (1991).

O tipo de dopante influencia na morfologia da superfície. Para filmes finos, (<1µm) os filmes de PPy preparados com quatro dopantes diferentes (Cl<sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> e dodecil sulfato) foram indistinguíveis, todos consistindo de glóbulos de 100 e 300 nm em diâmetro e 10 a 30 nm em altura. Com filmes mais espessos, contudo, (>5 µm) diferenças claras foram observadas: os filmes dopados com sulfato e dodecil sulfato mantiveram aproximadamente a mesma estrutura de superfície em filmes espessos e filmes mais finos. Porém, filmes dopados com Cl<sup>-</sup> e ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> geraram grandes estruturas tipo couve-flor consistindo de saliências de ~2 µm em diâmetro e de 0,5 a 1 µm em altura. Essas saliências mostraram uma subestrutura de glóbulos menores vistas em filmes mais finos. Para todos os tipos de dopantes, o diâmetro de glóbulos aumentou linearmente com a raiz quadrada da espessura dos filmes, sugerindo um mecanismo de crescimento. Estruturas similares e dependências similares do diâmetro de glóbulo e espessura do filme também foram reportados para filmes de anilina, sugerindo que a formação e o crescimento glóbulos é comum aos dois polímeros formados eletroquimicamente (Silk *et al*, 1998).

Foi observado que o material do eletrodo também tem influência na morfologia de superfície de filmes de PPy sintetizados eletroquimicamente. Wallace *et al* (2002) utilizaram em seu trabalho microscopia eletrônica de transmissão (MET) para investigar a estrutura transversal de filmes de PPy preparados em diferentes substratos. Em todos os casos, glóbulos de grande superfície foram observados como sendo estruturas em forma de cone que se estendiam pela superfície do eletrodo do filme de PPy. Curiosamente, Yoon *et al* (1999) mostraram que a morfologia de superfície do tipo couve-flor poderia ser virtualmente eliminada pelo polimento cuidadoso da superfície do eletrodo.

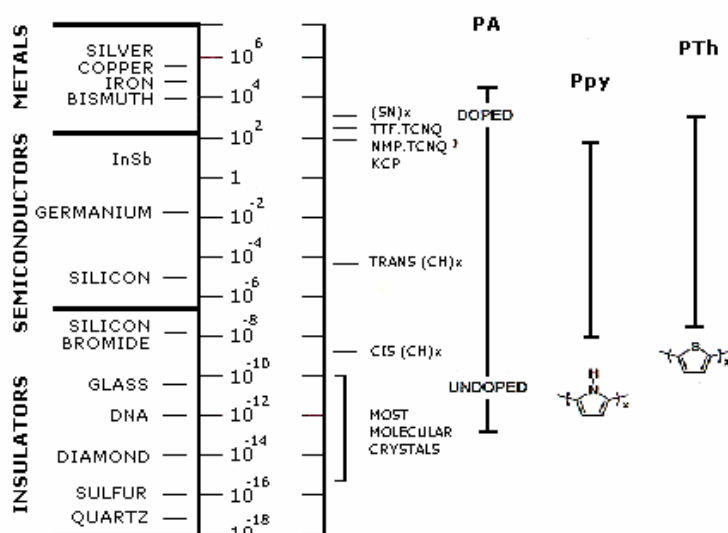
Foi demonstrado que as densidades do filme de PPy são altamente dependentes do dopante e condições de preparação. Por exemplo, a baixa temperatura de polimerização (-40°C) de PPy com o contraíon PF<sub>6</sub><sup>-</sup> produz filmes com densidade de 1,4g/cm<sup>3</sup>. Em contraste, os mesmos filmes preparados à temperatura ambiente possuem densidades muito menores de 0,6 a 0,8 g/cm<sup>3</sup> (Wallace *et al*, 2002).

### 3.2.2.1 Propriedades elétricas

A condutividade elétrica, em geral, é devido ao transporte de portadores de carga como elétrons, buracos, polarons, solitons, através de um meio, sob a influência de um campo elétrico. Portanto, a condutividade de qualquer meio é caracterizada pelo número de portadores de carga disponíveis e suas habilidades de se mover através do meio.

Os polímeros condutores são materiais que consistem de moléculas poliméricas com policonjugação, ou seja, possuem estrutura composta de ligações carbono-carbono simples e duplas. As ligações simples, ou  $\sigma$ , são feitas pela sobreposição dos orbitais  $sp^3$  e as ligações duplas, ou  $\pi$ , são feitas pela sobreposição dos orbitais  $sp^2$ . Os orbitais  $p_z$  remanescentes também se sobrepõem, formando uma densidade de elétrons acima e abaixo da cadeia principal do polímero. É essa densidade que contém os elétrons deslocalizados, que originam transporte de carga, quando um campo externo é aplicado (Wilson e Bowen, 2007).

A condução elétrica depende da deficiência ou excesso de elétrons  $\pi$  existentes na cadeia policonjugada. Isso pode ser obtido através da dopagem, que pode ser do tipo p ou n, referente à inserção de buracos ou elétrons, respectivamente. Dopantes são geralmente introduzidos, como contra-íons, durante o processo de polimerização química e eletroquímica. A condutividade pode ser aumentada acima de 10 ordens de grandeza em um mesmo material. A remoção ou inserção de elétrons em polímeros conjugados como resultado do processo de dopagem pode ser explicada pela teoria de bandas, que será revista posteriormente. A Figura 9 mostra a condutividade de vários materiais condutores.



**Figura 9:** Séries de condutividade (Böyükbayram, 2005).

Assim, a condutividade elétrica do polipirrol envolve o movimento de cargas positivas ou elétrons ao longo das cadeias poliméricas. Dados de difração de elétrons e raios-X sugerem que as cadeias poliméricas em PPy sintetizado eletroquimicamente são paralelas à superfície do eletrodo-substrato, o que se reflete na natureza anisotrópica da condutividade do PPy. Sabe-se que a resistência ao longo da superfície do filme é menor que a resistência através do filme. Contudo, a anisotropia é perdida em filmes mais espessos (Wallace *et al*, 2002).

Conforme mencionado anteriormente, parâmetros experimentais da síntese, como condições eletroquímicas, solvente, monômero e contra-íon, têm um efeito na condutividade do polímero. Esses materiais apresentam condutividade iônica devido ao solvente/eletrólito incorporado durante a síntese. As condições eletroquímicas durante a síntese podem ser manipuladas para variar a concentração de elétrons removidos por unidade de tempo. Isso, por sua vez, terá um efeito considerável no polímero resultante. O polímero deve crescer em potenciais anódicos o suficiente para iniciar a polimerização, porém, deve-se tomar o cuidado para que não haja a superoxidação, pois isso resulta em um material menos condutor. Autores prévios estudaram o efeito da densidade de corrente aumentada na condutividade do PPy/DS. Entre 2,0-8,8 mA/cm<sup>2</sup>, há indicativos que, inicialmente, um aumento na condutividade foi observado, porém em altas densidades de corrente houve uma queda (Wallace *et al*, 2002). A densidade de corrente ótima depende do sistema contra-íon/solvente investigado. Eles mostraram que a qualidade dos filmes deteriorou com a presença de nucleófilos durante a polimerização. A água pode agir como nucleófilo, atacando o anel de pirrol e formando grupos carboxila que quebram a cadeia do polímero, causando decréscimo da condutividade e de propriedades mecânicas. A magnitude desse efeito é dependente do eletrólito, porque sabe-se que surfactantes estabilizam o radical pirrol, mesmo em solventes nucleofílicos (Diaz e Lacroix, 1988). Apesar dessa maior estabilidade, outros trabalhos mostraram que PPy/DS tem maior condutividade quando crescido em CH<sub>3</sub>CN, do que na água.

Foi demonstrado que uma estrutura isolada em forma de couve-flor foi observada em polímeros crescidos em água, devido aos efeitos hidrofóbicos. Tal desigualdade na morfologia diminui a condutividade. Foi demonstrado também que a presença de pouca quantidade de água afeta a taxa de crescimento e a condutividade do polímero (Wallace *et al*, 2002).

A variável mais estudada é o contra-íon. Vários estudos mostraram que o contra-íon incorporado além de afetar a condutividade tem uma função importante no balanço de cargas do polímero, influenciando a distribuição de cargas positivas na sua estrutura. Para um dado contra-íon, a concentração empregada também afeta a condutividade do polímero resultante. A condutividade diminui à medida que a afinidade eletrônica do contra-íon aumenta. Foi reportado que o grau de oxidação do polímero não varia consideravelmente à medida que o contra-íon varia. A tendência à condutividade está relacionada à nucleofilicidade do contra-íon; isso pode ser devido a algum tipo de localização ânion-induzida do radical cátion no polímero (Wallace *et al*, 2002).

A adição de grupos funcionais ao pirrol influencia as propriedades eletrônicas do polímero resultante. Efeitos estéricos introduzidos por grupos funcionais volumosos, por exemplo, diminuem a condutividade, particularmente quando presente como N-substituintes. A presença de substituintes na posição 3 do anel de pirrol tem um efeito menor, mas ainda resulta em um decréscimo de condutividade (Wallace *et al*, 2002).

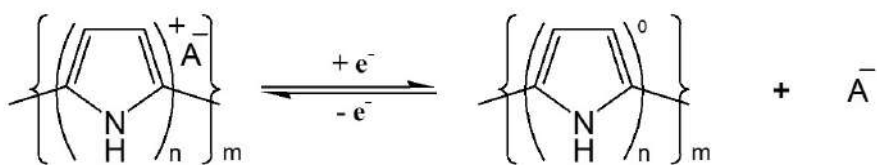
Outros estudos mostraram que a condutividade pode ser melhorada através do alongamento do polímero depois do crescimento. O aumento da condutividade ocorre na direção do alongamento e é causado pelo alinhamento das unidades poliméricas (Wallace *et al*, 2002).

### **3.2.2.2. Propriedades de comutação**

O fato desses materiais poliméricos conduzirem eletricidade é fascinante, mas a habilidade de comutar essas propriedades *in situ* utilizando simples estímulos elétricos é intrigante.

Cargas podem ser adicionadas ou removidas reversivelmente através da passagem cíclica por estados oxidados e reduzidos. Quando ocorre uma mudança de um estado oxidado para um estado reduzido, há um decréscimo concomitante na condutividade. (Wallace *et al*, 2002)

O processo para o PPy é descrito de forma simples, como indicado abaixo:

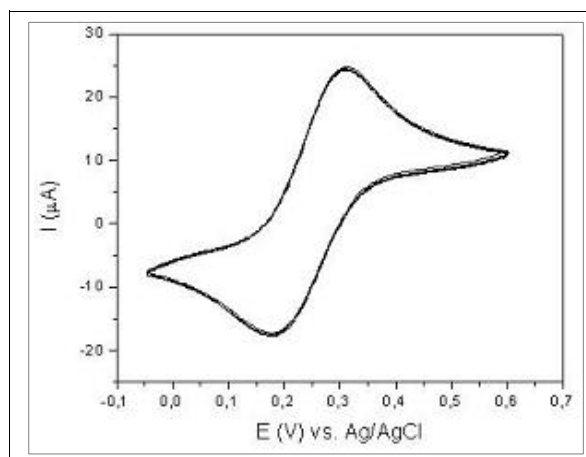


**Figura 10:** Ciclo redox entre a forma oxidada (condutora) e reduzida (isolante) do polipirrol (Cruz, 2006).

A comutação envolve processo de transferência de carga e massa no filme e transferência de carga no ponto do contato elétrico (geralmente um eletrodo-substrato inerte) (Wallace *et al*, 2002).

Em nível molecular, prevê-se que a corrente de redução percole através do material polimérico, limitado (em casos simples) pela difusão de íons a partir do material polimérico. A composição do filme não é uniforme, mas varia com o tempo durante o processo de conversão. Após a reoxidação, íons devem ser reinseridos no polímero, geralmente um processo mais lento. A reoxidação é menos eficiente em energia, porque o polímero reduzido é menos condutor. (Wallace *et al*, 2002)

Esses processos podem ser estudados detalhadamente usando diferentes técnicas, entre elas a Voltametria Cíclica.



**Figura 11:** Exemplo de voltamograma cíclico. Disponível em: <http://www.mackenzie.br/7487.98.html>

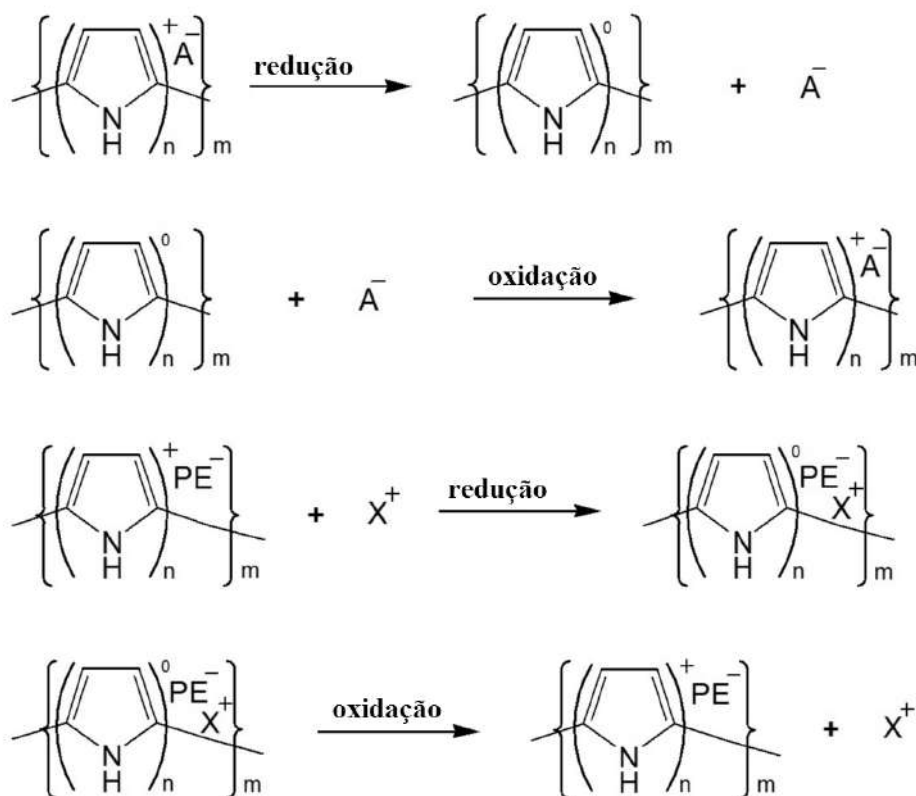
A Figura 11 mostra um exemplo de voltamograma cíclico genérico. O pico máximo corresponde ao processo de oxidação, enquanto o pico mínimo corresponde ao processo de redução. A transferência de massa observada durante essa medida, pode ser atribuída ao movimento do ânion à medida que o polímero é oxidado e reduzido. No

caso de o ânion ser muito grande, o movimento de cátions predomina no processo de oxi-redução do polímero. A Figura 12 ilustra esse processo.

Vários parâmetros influenciam o processo de comutação eletroquímica. Os mais importantes são: os ânions ou cátions incorporados durante a síntese e o sistema solvente/eletrólito utilizado (Wallace *et al*, 2002).

Esses ciclos podem ser repetidos, pois a série de potencial é restrita. Se o potencial aplicado é muito positivo, a superoxidação do filme ocorre. Então, este material polimérico tem propriedades elétricas e mecânicas inferiores. Se o potencial aplicado é muito negativo, ocorre evolução do hidrogênio e subsequente degradação do filme (Wallace *et al*, 2002).

Embora o papel do solvente durante a síntese pode ser importante na determinação de propriedades eletrodinâmicas. Foi visto que a água solvata polímeros como PPy, e isto influencia a condutividade e, conseqüentemente a comutatividade. Outros trabalhos mostraram também que há um movimento substancial de solvente para dentro e para fora do polímero durante o processo de oxi-redução (Wallace *et al*, 2002).



**Figura 12:** Ciclo redox do polipirrol demonstrando a propriedade de troca de íons. ( $A^-$  é o ânion dopante,  $PE^-$  é um ânion grande e  $X^+$  é o cátion. (Cruz, 2006)



Mesmo mudanças sutis no contra-íon desempenham uma função direta na influência de características de comutação. Por exemplo, foi mostrado que o contraíon incorporado durante a síntese afeta as séries de seletividade de troca iônica, que então influencia as características de comutação (Wallace *et al*, 2002).

A mobilidade/afinidade do contra-íon em relação ao polímero é extremamente importante. A natureza do contra-íon é importante apenas quando ele está desidratado. Foram observadas grandes diferenças em acetonitrila com diferentes contra-íons, mas em água nenhuma grande diferença significativa foi encontrada (Visy *et al*, 1899). Outros trabalhos mostraram que o contra-íon incorporado durante a síntese afeta a taxa dos processos de comutação.

A natureza do monômero é importante na determinação do potencial de comutação. Especificamente, é mais difícil oxidar/reduzir poli(N-metil-pirrol) em relação ao PPy e potenciais intermediários são requeridos para comutar os copolímeros desses dois pirróis ( Salmon *et al*, 1983). Adicionalmente, a introdução de vários aminoácidos à estrutura do polímero poderia ser usada para modificar as características de comutatividade (Delabouglisse e Garnier, 1992).

### **3.2.2.3. Propriedades químicas e bioquímicas**

As propriedades químicas da estrutura resultante determinam a habilidade de reconhecimento de um estímulo particular. Essas propriedades determinam como um polímero condutor interage com outros materiais na construção de materiais compósitos inteligentes (Wallace *et al*, 2002).

A maioria dos polímeros pode, de fato, interagir com outras moléculas. Tais moléculas podem ser parte de outras estruturas moleculares maiores (importante na área de materiais compatíveis), ou podem ser moléculas de solvente (tal interação pode influenciar muitos processos incluindo a dissolução) ou moléculas específicas em um solvente ou meio gasoso (Wallace *et al*, 2002).

Tais interações entre polímero e molécula podem ser divididas em modos definíveis de interações moleculares, como iônica, íon-dipolo, íon-dipolo induzido, dipolo- dipolo induzido e dispersão de London. Organizadas em domínios temporais e espaciais adequados, essas interações se combinam para dar origem a fenômenos de reconhecimento químico como complexação e interações com enzimas e anticorpos/antígenos. Em geral, a forma como essas interações são influenciadas por

estímulos ambientais determina o comportamento do sistema polimérico. (Wallace *et al*, 2002)

Um impacto forte nas propriedades químicas é percebido com a escolha do contra-íon. O fato de o pirrol poder ser polimerizado em soluções aquosas possibilita que uma grande série de contra-íons sejam incorporados em sua estrutura. Nos casos em que um contra-íon com uma atividade específica é incorporado, o polímero pode atuar não mais como um carreador ou meio de comunicação eletrônica. Numerosos exemplos onde anticorpos e enzimas são incorporados foram relatados na literatura. Em alguns casos, aditivos ou carreadores moleculares foram utilizados para facilitar a incorporação de moléculas grandes e com baixa densidade de carga. Por exemplo, a interação de surfactantes aniônicos com proteínas para produzir moléculas altamente carregadas podem ser utilizadas para possibilitar a incorporação. Outra abordagem para facilitar a incorporação de proteínas envolve a ligação ao ouro coloidal antes da eletropolimerização. Usando técnicas de montagem apropriadas, a bioatividade de tais componentes pode ser mantida mesmo após a imobilização no polímero condutor. (Wallace *et al*, 2002)

A natureza dinâmica dessas propriedades químicas é importante. Por exemplo, Wallace *et al* mostraram que a afinidade por moléculas de anticorpos particulares pode ser alterada pela aplicação de um estímulo elétrico, e como propriedades de troca iônica e características hidrofóbicas podem ser ajustados. O comportamento estímulo/propriedade química é dependente do contra-íon incorporado durante a síntese, com já foi mencionado anteriormente. As propriedades de interação química (troca catiônica e aniônica e hidrofobicidade) e o modo como elas variam em função do potencial, é marcadamente dependente do contra-íon incorporado durante a síntese.

E ainda, a atividade de moléculas funcionais incorporadas como proteínas pode ser alterada pela aplicação de estímulo elétrico apropriado. Talvez a aplicação do potencial mude a conformação da proteína devido a mudanças na hidrofobicidade na superfície do polímero.

#### **3.2.2.4. Propriedades óticas do PPy**

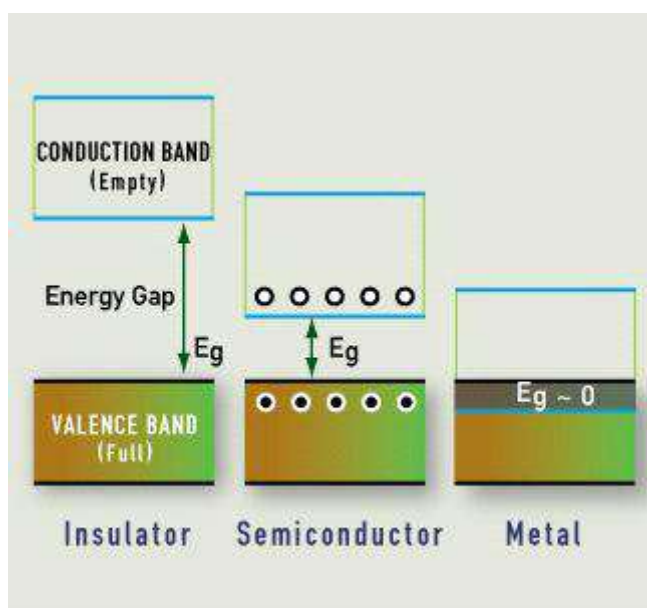
##### *1. Estrutura de banda eletrônica e carreadores de cargas.*

De acordo com a teoria de bandas, orbitais atômicos se combinam para formar uma banda de energia deslocalizada, estendida espacialmente, e a condutividade

depende, então, da população relativa de cada banda e da diferença de energia entre as bandas. O transporte de cargas pode ocorrer apenas em bandas ocupadas parcialmente. A Figura 13 mostra bandas de energia genéricas para isolantes, semicondutores e metais.

O que diferencia esses três materiais é o intervalo entre a banda de valência (BV) e a banda de condução (BC), melhor definido como gap de energia ou banda proibida ( $E_g$ ).

Para materiais isolantes  $E_g > 3\text{eV}$ , sendo estes os maiores *gaps* de energia, o que resulta em baixa condutividade.



**Figura 13:** Estrutura de banda de materiais isolantes, semicondutores e condutores. Disponível em: <<http://www.webexhibits.org/causesofcolor/10.html>>

Materiais semi-condutores apresentam  $E_g < 3\text{ eV}$ , o que resulta em maior probabilidade de condução. Há uma banda de valência preenchida e uma banda de condução vazia separadas pela  $E_g$ , e a inserção de dopantes aumenta a condutividade pela produção de estados próximos à BC ou à BV. A BC pode ser preenchida a partir da BV pela excitação de elétrons através da banda de energia, tanto termicamente quanto fotoquimicamente. O aumento da condutividade depende do tipo de dopante utilizado (p ou n).

Os materiais condutores (metais) são caracterizados por um  $E_g = 0$ , originado por bandas parcialmente preenchidas, onde o movimento de cargas pode ocorrer livremente, ocorrendo a condução. Mesmo em baixas temperaturas, mostram alta condutividade.

A estrutura eletrônica dos polímeros conjugados neutros é similar a dos semicondutores inorgânicos e, conseqüentemente, a teoria de bandas pode ser utilizada para descrever seus níveis eletrônicos. Podemos considerar duas bandas de energia para os polímeros condutores, a BV, também conhecida como o orbital molecular mais alto e ocupado (HOMO), e a BC, que corresponde ao orbital molecular mais baixo e desocupado (LUMO). A diferença de energia entre HOMO e LUMO diminui à medida em que aumenta o comprimento de conjugação, juntamente com o aumento dos níveis de energia. Quando se refere a moléculas simples conjugadas  $\pi$ , a energia entre HOMO e LUMO é uma transição de  $\pi$  para  $\pi^*$  observada no espectro UV-visível. A energia de banda de um polímero refere-se à transição de  $\pi$  para  $\pi^*$ . Polímeros conjugados, semicondutores em sua forma neutra, mostram transições interbandas entre a BV e a BC, reduzindo a banda de energia efetiva devido a oxidação ou redução. Isso resulta na formação de carreadores de carga ao longo da estrutura do polímero.

Os portadores de carga são defeitos na estrutura do polímero resultantes da dopagem, podendo ser radicais, ânions, cátions ou uma combinação destes. São conhecidos como solitons ou polarons. A condutividade pelo efeito desses portadores é explicada pelo movimento intra e inter-cadeias. Embora o modelo intra-cadeia seja sugerido em baixos níveis de dopagem, o movimento inter-cadeia acontece à medida em que aumenta o nível de dopagem.

Todos os polímeros condutores, além do PA (cujo mecanismo de condução pode ser explicado com base em solitons) possuem estados não-degenerados e há uma proposta diferente para explicar a condução de polímeros condutores aromáticos. A oxidação de poli(heterociclos) cria um radical denominado polaron. Polaron é um cátion-radical conjugado que tem um número de spin de 1/2. Em seguida, uma segunda oxidação pode ocorrer diretamente no polaron formando o bipolaron dicatiônico sem spin, ou pode ocorrer na cadeia polimérica neutra em outra localidade, e os dois polarons podem se difundir, combinando os spins para formar uma ligação bipolarônica. (Cruz, 2006, pág 13)

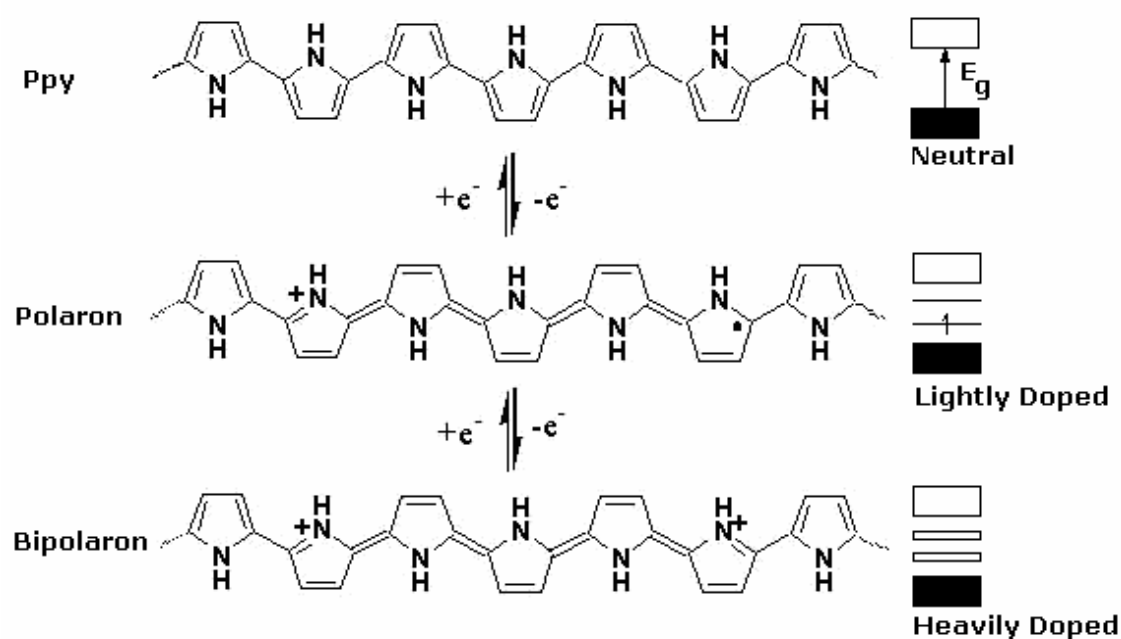
Ao contrário dos solitons no poliacetileno, as duas cargas positivas dos bipolarons estão associadas e agem como um único portador de carga disperso em muitos anéis. E o número dessas cargas contidas em um material e sua mobilidade relativa controlam a magnitude da condutividade elétrica. (Cruz, 2006, pág 13).

É aceito que o comprimento de uma unidade de bipolaron consiste de 5 a 8 anéis, porém, esse é um número arbitrário que pode variar dependendo do sistema

polimérico específico. Esse mecanismo está de acordo com os resultados experimentais provenientes da técnica de Espectroscopia de Ressonância Paramagnética (EPR).

Alguns polímeros podem apresentar eletrocromismo que é a diferença de cor entre estados dopados e não-dopados. O eletrocromismo foi observado em alguns polímeros condutores conjugados como politiofeno (PTh), polipirrol (PPy) e polianilina (PANI) (Wilson e Bowen, 2007). Por exemplo, o polipirrol varia da coloração amarelo-pálido na forma reduzida a preto para a forma oxidada (Cruz, 2006, pág 11).

A Figura 14 mostra a estrutura de bandas para o PPy e a formação de polarons e bipolarons durante um processo de oxidação.



**Figura 14:** Esquema estrutural de formação de polarons e bipolarons pela dopagem oxidativa do PPy e as estruturas de bandas associadas (Böyükbayram , 2005).

Em seu estado neutro, é previsto que o PPy tenha um intervalo de banda  $\pi-\pi^*$  (valência  $\rightarrow$  condução) de 3,2 eV. Quando um elétron é removido de um polaron (cátion radical), dois níveis polarônicos aparecem no intervalo de banda. O nível mais baixo desses polarons é parcialmente preenchido em PPys parcialmente dopados (com uma carga positiva para 4 a 6 unidades monoméricas), como confirmado por sinal de EPR para um elétron desemparelhado. Mais remoção de elétron resulta em formação de um bipolaron nos níveis de energia mostrados na figura anterior. Esses estados eletrônicos se aglutinam em bandas bipolaron. Também é previsto que o intervalo de banda  $\pi-\pi^*$  aumente para 3,6 eV.

## 2. Espectro UV-visível-NIR: dependência do nível de dopagem e conformação de cadeia.

O espectro UV-visível dos PPys e suas mudanças com a variação dos níveis de dopagem, tem sido, em inúmeros casos, correlacionado com as previsões acima, conforme discutido por Bredas *et al* (1985). Por exemplo, a mudança de cor do PPy neutro do amarelo pálido para o preto-cinza, à medida em que é eletroquimicamente oxidado para o PPy.CIO<sub>4</sub>, é acompanhada por mudanças progressivas no espectro UV-visível-NIR consistente com a aparência inicial dos polarons e sua subsequente substituição por bipolarons. Em geral, PPys altamente dopados exibem duas bandas bipolaron características a 1,0 e 2,6 eV (1240 e 475 nm) e a banda  $\pi$ - $\pi^*$  em 350nm.

No entanto, a posição e a forma das bandas bipolaron/polaron mostraram ser muito dependentes de fatores ambientais como a superfície de deposição ou o solvente. Acredita-se que essas mudanças no espectro UV-visível-NIR surjam de mudanças conformacionais nas cadeias do PPy.

Outras propriedades interessantes são a rigidez da cadeia principal (o que faz com que este material não seja processável em seu estado condutor, que seja normalmente insolúvel em água e solventes orgânicos comuns) e as propriedades térmicas (por exemplo, o PPy não funde com aplicação de calor, ao contrário decompõe-se, devido às ligações cruzadas iônicas e covalentes existentes na matriz polimérica). Ainda existem dentro do PPy interações entre cadeias, normalmente fortes, que tendem a causar agregações de modo a formar partículas não-uniformes. (Cruz, 2006, pág 11)

### 3.3. Perspectivas de aplicação

A pesquisa de polímeros condutores é promissora, tendo aplicações nos mais diversos campos, como *spin-offs*, armazenagem e conversão de energia, baterias recarregáveis, polímeros fotovoltaicos, tecnologias de *display* eletrocromáticos, tecnologias de separação, comunicação celular, dispositivos de liberação controlada, revestimentos anti-corrosivos, ferramentas de comunicação e caracterização, materiais eletrostáticos, dispositivos LEDs, transistores, aplicações aeroespaciais, materiais têxteis, sensores químicos, físicos e biológicos. Neste trabalho será enfatizada a aplicação dos polímeros condutores em sensores biológicos, ou biossensores.

## **4-TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO**

### **4.1. Caracterização eletroquímica**

#### **4.1.1. Voltametria cíclica**

A voltametria é um dos métodos eletroquímicos muito utilizados pelos físico-químicos para realizar estudos sobre processos de redução e oxidação em vários meios, bem como para estudar os processos de adsorção em superfícies, determinar espécies e mecanismos envolvidos em processos de transferência de elétrons em superfícies de eletrodos quimicamente modificados. Em voltametria cíclica, a resposta da corrente de um eletrodo estacionário em uma solução sem agitação é resultado de um potencial de onda triangular. A forma do voltamograma é dada pelo comportamento da corrente com relação à variação do potencial e é dependente da reversibilidade do sistema estudado. Inicialmente, nenhuma corrente passa até que se aplique um potencial suficiente para indução da transferência de elétrons. Após a aplicação deste potencial, é possível observar o surgimento de ondas no voltamograma que correspondem ao processo de redução ou oxidação do material. Através desta técnica pode-se obter informações sobre a eletroatividade dos polímeros condutores estudados (Silva, 2006, pág 67 e 68).

O uso de três eletrodos (eletrodo de trabalho, eletrodo auxiliar e eletrodo de referência), juntamente com o potenciostato permite aplicação acurada do potencial e medida da corrente resultante. O potencial do eletrodo é variado linearmente para um potencial mais negativo e então reversamente variado para a tensão de partida. A velocidade de varredura produz um pico de corrente para quaisquer analitos que podem ser reduzidos através da série de velocidades do potencial. A corrente aumentará à medida que o potencial alcança o potencial de redução do analito, e em seguida, declina à medida em que a concentração do analito próximo à superfície do eletrodo diminui. Quando o potencial aplicado é revertido, é alcançado um potencial que re-oxida o produto formado na primeira reação de redução, e produz uma corrente de polaridade reversa. O pico de oxidação geralmente tem uma forma similar ao pico de redução. A diferença de potencial entre os picos de oxidação e redução é teoricamente de 59 mV para uma reação reversível. Na prática essa diferença é de 70-100mV. Grandes diferenças ou picos de redução e oxidação assimétricos são uma indicação de reação não reversível. (Rahman et al, 2008, pág 122)



### 4.1.2. Amperometria

Nessa técnica, um potencial uniforme é aplicado e a mudança na corrente é monitorada em função do tempo. A determinação da concentração de um material em uma amostra é feita através da medida da corrente que passa através da célula contendo a solução. Durante um ensaio amperométrico, o potencial do eletrodo auxiliar ou de referência é ajustado ao valor do pico da onda voltamétrica. A corrente que flui entre os eletrodos na solução é medida e relacionada à concentração do analito. (Rahman et al, 2008, pág 122)

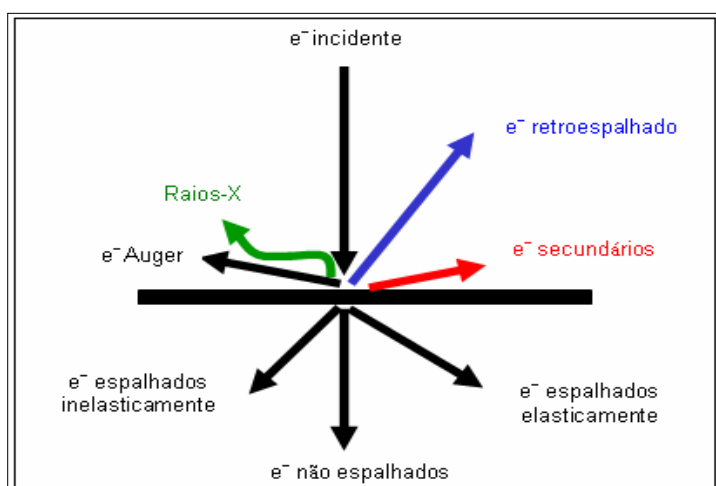
Neste trabalho, a cronoamperometria foi utilizada para caracterização dos filmes, e obtenção da curva de adição de glicose.

## 4.2. Caracterização morfológica

### 4.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma técnica bastante utilizada durante a fase de crescimento dos filmes e para a análise de materiais, pois a análise da microestrutura é extremamente importante para o entendimento das correlações entre microestrutura, defeitos e propriedades e para prever as propriedades quando estas correlações são estabelecidas (Silva, 2006, pág 71).

No MEV, um fino feixe de elétrons varre e penetra na superfície da amostra, interage com os átomos da mesma, e produz diferentes sinais, provenientes de uma série de processos de emissão como: elétrons secundários, elétrons retroespalhados, raios X, elétrons Auger, e luz visível, os quais podem ser capturados por detectores apropriados.



**Figura 15:** Esquema representativo dos processos que ocorrem com a incidência de elétrons (Silva, 2006).

Esses sinais, se captados corretamente, fornecem informações características sobre o material. Os elétrons secundários, que são elétrons de baixa energia (menor que 50 eV), geralmente fracamente ligados aos átomos da amostra, são ejetados a partir da colisão com elétrons incidentes, marcando a posição do feixe e fornecendo informações topográficas precisas e de boa resolução. Portanto, são utilizados para formação da imagem da superfície das amostras.

Elétrons retroespalhados são elétrons de alta energia (acima de 50 eV), e fornecem tanto informações relacionadas com a topografia quanto com a composição do material analisado. Alguns dos elétrons do feixe incidente interagem com os núcleos dos átomos, mas se isso ocorre em um determinado ângulo (próximo a um ângulo reto), os elétrons, ao invés de serem capturados pela atração eletrostática dos núcleos, retornam em linha reta praticamente sem diminuir suas velocidades. Um detector é colocado no caminho desses elétrons, o que permite formar uma imagem com os mesmos. Quanto maior o núcleo, maior o número de elétrons retroespalhados. Como o tamanho do núcleo depende do número atômico, e cada elemento químico tem um distinto número atômico, pode-se mostrar os diferentes elementos presentes na amostra. Então, elementos de maior número atômico geram maior número desse tipo de elétrons e aparecem mais brilhantes que os de baixo número atômico (Durán *et al*, 2006).

Elétrons do tipo Auger são elétrons de baixa energia, formados após a produção de elétrons secundários, que carregam informação sobre a natureza química da amostra. Por exemplo, se um elétron secundário foi emitido da camada K, um elétron de maior energia, da camada L, se desloca para a camada K com a finalidade de preencher essa camada. A energia resultante desse processo poderia retirar um elétron de uma camada de mais alta energia, por exemplo da camada M, que é o chamado Auger. A espectroscopia de Auger envolve a coleta e análise desses elétrons para a obtenção da composição dos elementos da superfície da amostra. É, sem dúvida, uma ferramenta muito importante nas ciências de materiais (Durán *et al*, 2006).

As energias produzidas durante a formação dos elétrons secundários e liberadas juntamente com o elétron Auger, geralmente são sinais de raios-X, que têm energia característica dependendo do elemento do qual foi originado. Podem ser detectados utilizando analisadores de raios-X (Durán *et al*, 2006).

#### 4.4.2. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A AFM é a técnica de microscopia de varredura por sonda (SPM) mais simples e também a mais extensamente empregada, que produz imagens de uma superfície posicionando um sensor de força de alta resolução próximo à superfície da amostra. Esta ferramenta pode ser utilizada para a obtenção de imagens topográficas, para o mapeamento de propriedades adesivas e elásticas de uma superfície, para medir a força de interação entre pares individuais de moléculas (método denominado espectroscopia de força de molécula única, SMFS) e manipular amostras em uma escala molecular.

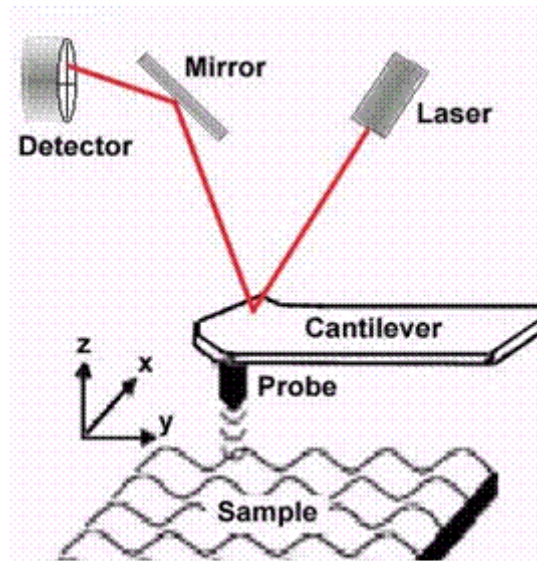
A AFM utiliza um braço nanorrobótico, que é um conjunto haste-agulha, para sondar forças ou para varrer superfícies e também como um bisturi nanométrico, por exemplo, para a extração de DNA de uma região específica de um cromossomo (Durán *et al*, 2006).

Conforme a amostra é deslocada em relação à agulha (ponteira), variações na topografia da superfície resultam em deflexões na haste (cantilever), que são detectadas por um feixe de laser incidente em sua porção superior (espelhada), e é refletido através de outro espelho, em direção a um detector (Figura 16). A variação no sinal do laser refletido, para cima ou para baixo modifica o potencial produzido nos fotodetectores. A diferença de potencial elétrico no detector é transmitida para um computador permitindo que toda área de varredura seja mapeada. Como o detector reproduz quaisquer modificações de curvatura ocorridas na haste, se tem as variações topográficas mapeadas (Durán *et al*, 2006).

A intensidade da força que atua no conjunto haste-agulha é registrada, enquanto a ponta de prova é aproximada ou afastada da superfície da amostra em um ponto específico. Durante a aproximação pode-se medir a elasticidade da superfície analisando a indentação provocada pela ponta da agulha. Definindo a deflexão da haste como positiva durante a aproximação, se houver adesão entre a ponta da agulha e a amostra, tem-se uma deflexão negativa durante a retração. A deflexão é proporcional à força de adesão e, como a região de contato da ponta da agulha situa-se em escala nanométrica, é possível detectar forças que surgem pelo reconhecimento de uma única molécula (Durán *et al*, 2006).

A técnica de AFM tem causado grande impacto na ciência de materiais, no estudo das propriedades de superfície de metais, cerâmicas, polímeros e produtos naturais. Em sistemas biológicos, a microscopia de varredura por sonda tem sido utilizada para estudar estruturas celulares e propriedades físicas e químicas de

biomoléculas aderidas em superfícies inertes ou em superfícies biológicas (Durán *et al*, 2006).



**Figura 16:** Representação da microscopia de força atômica. Disponível em: <http://www.mtholyoke.edu/~menunez/ResearchPage/AFM.html>

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo, serão descritas as metodologias utilizadas na síntese e caracterização dos filmes de polipirrol (PPy) com glicose oxidase (Gox), através de técnicas eletroquímicas, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM), além de descritos os materiais empregados.

### 5.1- Materiais e métodos

#### 5.1.1. Reagentes e soluções

- Pirrol (Aldrich) destilado sob pressão reduzida antes da utilização;
- Glicose oxidase (Sigma-Aldrich, tipo X-S);
- Tampão de fosfato de potássio, 0,1M;
- Glicose tamponada, 100mM;
- Solução de KCl;

Para o crescimento dos filmes de biossensores (dispositivos) foi empregado um potenciostato AutoLab PGSTAT30/FRA.

#### 5.1.2. Preparação da solução de tampão de fosfato

Tampão fosfato (equimolar), pH = 7

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , m = 3,44 g (0,025 mol)

$\text{K}_2\text{HPO}_4$ , m = 4,35 g (0,025 mol)

Os sais foram secos a 100 – 110 °C em estufa por 1 h e resfriados em dessecador antes de iniciar o preparo da solução. Procedeu-se à dissolução dos sais em água deionizada, transferindo-os quantitativamente para um balão volumétrico (1 L) e completando-se o volume também com água deionizada. As soluções foram estocadas em frasco de vidro. Segue a Tabela 2 listando o pH da solução tampão em função da temperatura.

**Tabela 2:** pH em função da temperatura.

T (°C)	pH
15	6,90
20	6,88
25	6,86
30	6,85

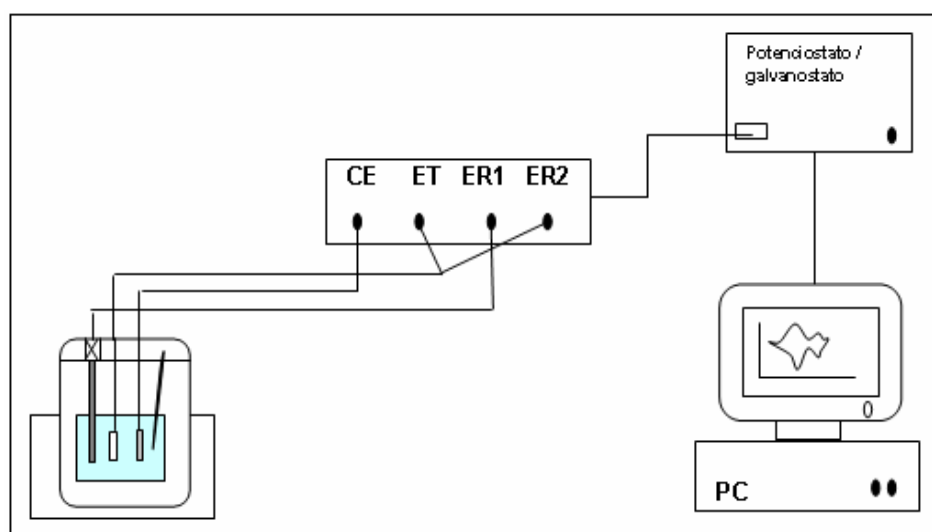
## 5.2. Eletrodos e Célula

- Célula de vidro (10ml);
- Eletrodo de referência (ER): Eletrodo de Calomelano Saturado (ECS) (Analion R 682);
- Eletrodos de trabalho (ET): platina polida ou ITO (óxido de índio e estanho) ( $R \gg 15\Omega$ ) ( $1,0 \text{ cm}^2$ );
- Contra eletrodo: platina polida (2,5cm x 1,0 cm);

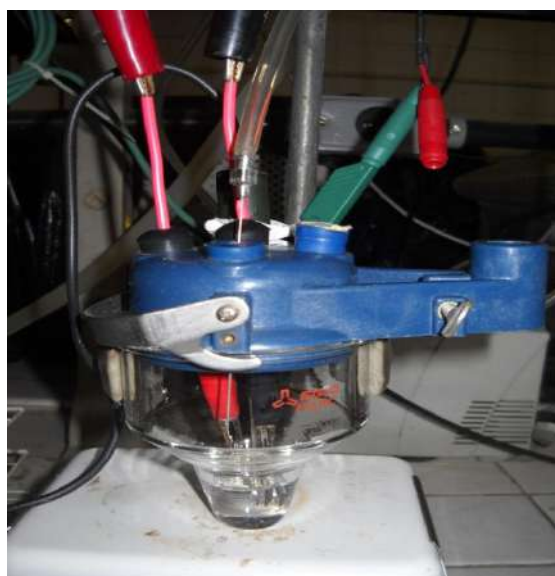
Os filmes foram obtidos por síntese galvanostática e caracterizados eletroquimicamente em célula de vidro com um volume de solução de 10 ml. O ET foi mantido paralelo a uma distância fixa, bem próxima, do CE. O ER foi fixado o mais próximo possível do ET.

As soluções eletrolíticas utilizadas nas sínteses e caracterizações eletroquímicas foram deaeradas com argônio antes da realização dos experimentos e durante o processo o ambiente foi mantido inerte para que não houvesse participação do oxigênio nos processos de oxidação e redução (Silva, 2006).

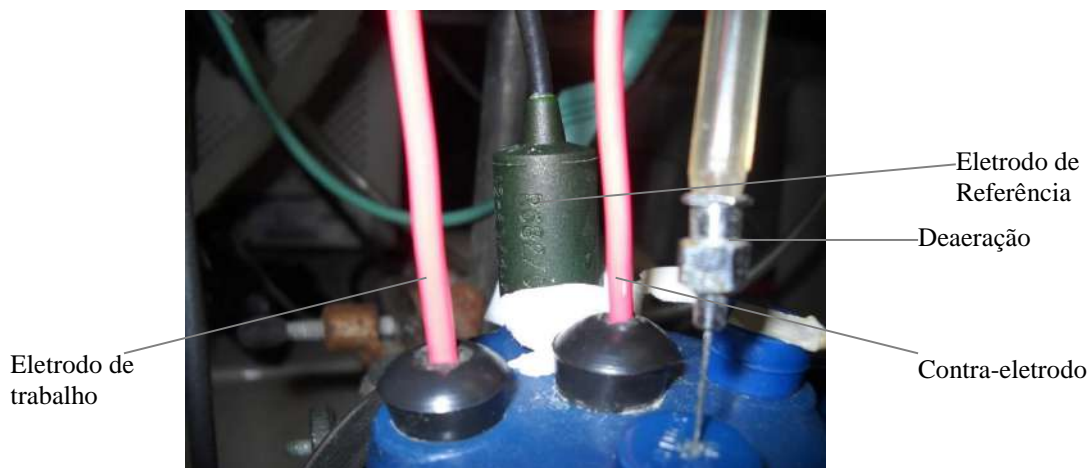
O esquema do sistema utilizado para a síntese eletroquímica e caracterizações eletroquímicas está demonstrado nas Figuras de 17 a 19.



**Figura 3:** Esquema do sistema utilizado na eletropolimerização e caracterização eletroquímica dos filmes de Ppy com Gox. (Silva, 2006)



**Figura 4:** Célula eletroquímica utilizada neste trabalho.



**Figura 19:** Vista superior da célula eletroquímica, mostrando as conexões.

### 5.3. Crescimento dos filmes de biossensor

Os filmes de Ppy/GOx foram obtidos por síntese galvanostática, empregando um potenciostato AutoLab PGSTAT30/FRA. Foram utilizados 10 ml da solução tampão, com  $[Py]=0,1$  M,  $[KCl]=0,5, 1,0$  e  $1,5$  M e  $[GOx]=1, 2$  e  $3$  mg/ml.

A solução foi submetida à polimerização galvanostática, utilizando placas de Pt (como eletrodo de trabalho e contra-eleto), e como referência um eletrodo de calomelano saturado (ECS). A solução foi deaerada com argônio ou nitrogênio e o ambiente foi mantido sob atmosfera inerte, à temperatura ambiente durante o crescimento do filme. Foi imposta uma corrente de  $0,5$  mA durante 16 minutos e o potencial eletroquímico na célula foi registrado, de modo a testar as condições ótimas de síntese.

Foi realizado também, um experimento em branco, utilizando as mesmas condições de síntese, na ausência de GOx, utilizando como solução de caracterização, água deionizada e  $[KCl]=0,5$  e  $1$  M.

### 5.4. Caracterização eletroquímica dos dispositivos.

Os dispositivos obtidos foram caracterizados por cronopotenciometria, durante a síntese e por voltametria cíclica e cronoamperometria após a síntese. Para a cronoamperometria foi utilizada solução de glicose ( $100$  mM) em tampão de fosfato equimolar contendo KCl ( $0,5, 0,1$  e  $1,5$  M). Foram utilizadas velocidades de varredura entre  $10$  e  $100$  mV/s para a voltametria cíclica e, para a cronoamperometria, foi imposto



um potencial de 0,7 V durante 5 minutos. O dispositivo que apresentou melhores respostas eletroquímicas foi testado quanto a sua reprodutibilidade de obtenção e também caracterizado em meio sem glicose.

Foram testadas as diferentes condições: solução de glicose (100 mM) em tampão de fosfato equimolar com KCl, solução-tampão de fosfato equimolar com KCl e solução aquosa de KCl. Os voltamogramas cíclicos obtidos foram analisados e comparados, de forma a identificar os picos relacionados a cada processo.

Empregou-se nessas análises a mesma célula eletroquímica com os eletrodos e o potenciostato AutoLab PGSTAT30/FRA.

### **5.5. Caracterização Morfológica dos dispositivos**

As análises morfológicas dos filmes foram feitas por MEV, em um microscópio HITACHI TM - 1000, visando a caracterização superficial das amostras para a avaliação de sua homogeneidade e, por Microscopia de Força Atômica (AFM), em um microscópio MOD – 1M plus, para a caracterização da sua topografia.

### **5.6. Curva de adição da glicose.**

O filme sintetizado foi imerso em solução de KCl, na célula eletroquímica com agitação por meio de um bastão magnético. Foi aplicado um potencial de 0,7 V durante 12 minutos com adição de 1 ml de glicose tamponada, por um minuto. Registrou-se a corrente elétrica gerada durante o processo.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, são mostrados os resultados correspondentes aos dispositivos que apresentaram melhor resposta eletroquímica.

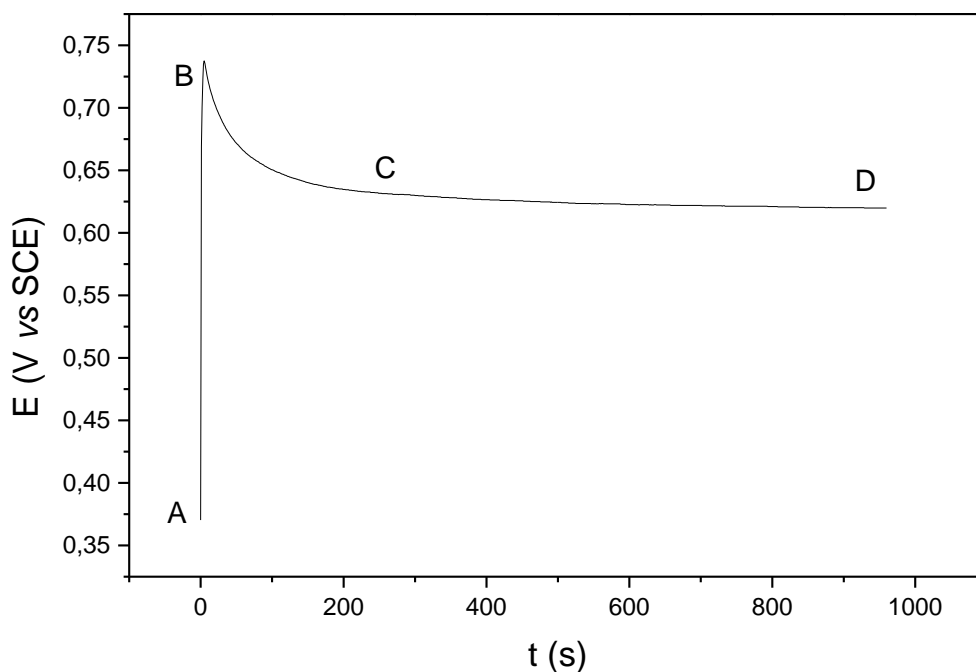
### 6.1. Análise dos dispositivos obtidos nas seguintes condições de síntese e caracterização:

Solução de síntese:  $[Py] = 0,1 \text{ M}$ ;  $[GOx] = 1 \text{ mg/mL}$ ;  $[KCl] = 0,5 \text{ M}$ ; tampão equimolar.

Solução de caracterização:  $[KCl] = 0,5 \text{ M}$  e glicose tamponada.

$[KCl] = 0,5 \text{ M}$  e tampão equimolar.

A Figura 20 mostra a curva de evolução do potencial ao longo do tempo ( $E \times t$ ) obtida durante a síntese de um filme de Ppy/GOx utilizando  $[Py] = 0,1 \text{ M}$ ;  $[KCl] = 0,5 \text{ M}$ ,  $[GOx] = 1 \text{ mg/mL}$  e tampão fosfato equimolar. A corrente aplicada foi de  $0,5 \text{ mA}$  durante 16 minutos.

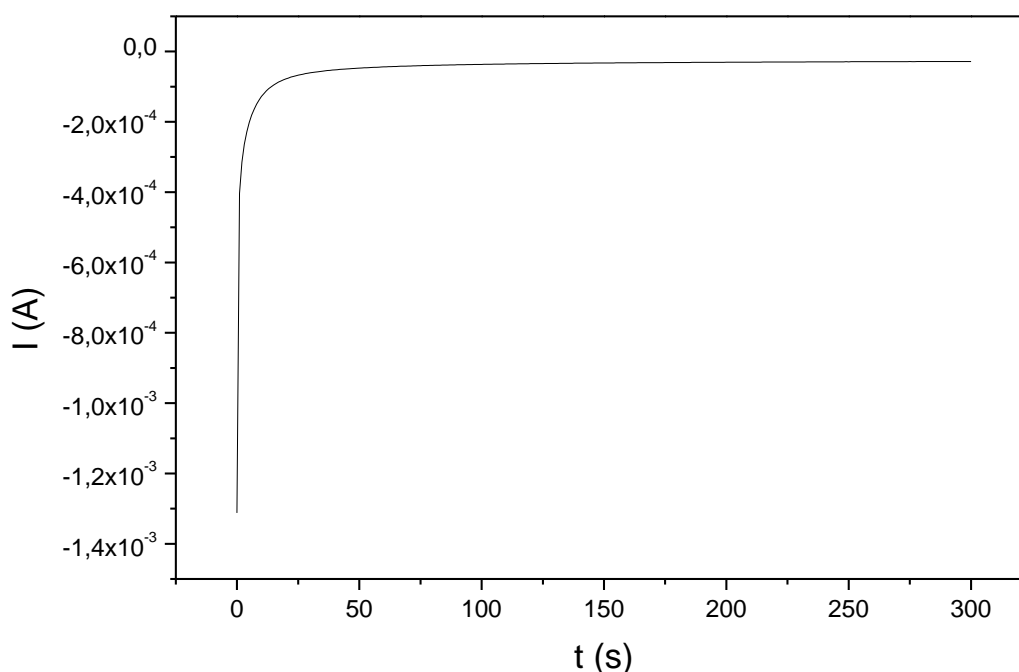


**Figura 20:** Evolução do potencial ( $E$ ) em função do tempo durante a síntese de filmes Ppy/GOx.

A Figura 20 evidencia a deposição de material eletroativo na superfície do eletrodo de trabalho. Pode-se observar diferentes etapas de formação do filme polimérico, como descritas a seguir.

Entre A e B ocorre a oxidação dos monômeros em solução, próximos à superfície do eletrodo, em um processo controlado pela difusão dos mesmos, e o início da formação de oligômeros. Entre B e C, ocorre o início da nucleação destes oligômeros e sua deposição na superfície do eletrodo, em um processo controlado pela difusão dos oligômeros. A partir de C até D, ocorre o crescimento destas estruturas recém nucleadas, dando origem a um filme contínuo na superfície do eletrodo. Esse tipo de deposição foi observado para filmes de polipirrol obtidos anteriormente empregando ânions complexos contra íons (Cruz *et al.*, 2007).

A Figura 21 mostra uma curva cronopotenciométrica para um filme Ppy/GOx obtido nas condições referidas. O potencial aplicado foi de 0,7 V durante 300 segundos.



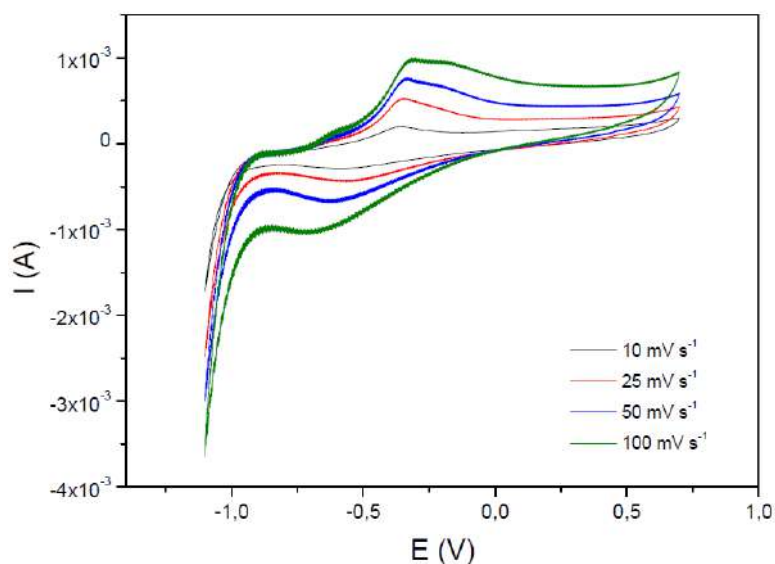
**Figura 21:** Curva cronoamperométrica de filmes Ppy/GOx obtidos utilizando  $[Py] = 0,1$  M;  $[KCl] = 1,0$  M,  $[GOx] = 1$  mg/mL e tampão fosfato equimolar. Potencial aplicado 0,7 V vs ECS.

Pela análise da Figura 21, observa-se que o sistema atinge o equilíbrio de polarização de superfície rapidamente alcançando valores de corrente residual próximos

a zero em aproximadamente 58 segundos. Isso indica uma cinética difusional rápida, a qual não limita o fluxo de espécies eletroativas até o eletrodo. Este comportamento pode indicar que a resposta do dispositivo final deve ser rápida, sem as limitações de difusão de espécies moleculares, como a glicose.

Na Figura 22 são mostrados os voltamogramas cíclicos obtidos para os dispositivos nas velocidades de varredura de 10, 25, 50 e 100 mV/s, utilizando glicose tamponada com [KCl] = 0,5 M como solução de caracterização. Foram observados um processo anódico e um catódico, associados à oxidação e à redução, respectivamente. As ondas catódicas e anódicas são uma soma dos processos naturais de oxi-redução do polímero com o reconhecimento da glicose pela GOx immobilizada no filme, já que os processos característicos do Ppy ocorrem na mesma faixa de potencial dos processos de oxi-redução da glicose.

Os voltamogramas cíclicos mostram a presença de um par redox com potenciais entre -0,3608 e -0,3217 V (oxidação) e -0,6882 e -0,5834 V (redução). Este par redox, dado os seus valores de potencial, constitui um sistema irreversível (o que é coerente com a formação de produtos oxidados a partir da glicose, os quais apresentam um comportamento redox distinto).



**Figura 22:** Voltamogramas cíclicos de filmes Ppy/GOx obtidos utilizando [Py] = 0,1 M; [KCl] = 0,5 M, tampão equimolar e [GOx] = 1 mg/mL. Potencial aplicado vs ECS.

Observando os voltamogramas percebe-se que há um aumento no valor de  $I_{ox}$  (oxidação, anódico) e de  $\Delta E_{p,ox}$  com a velocidade de varredura, o que indica que os

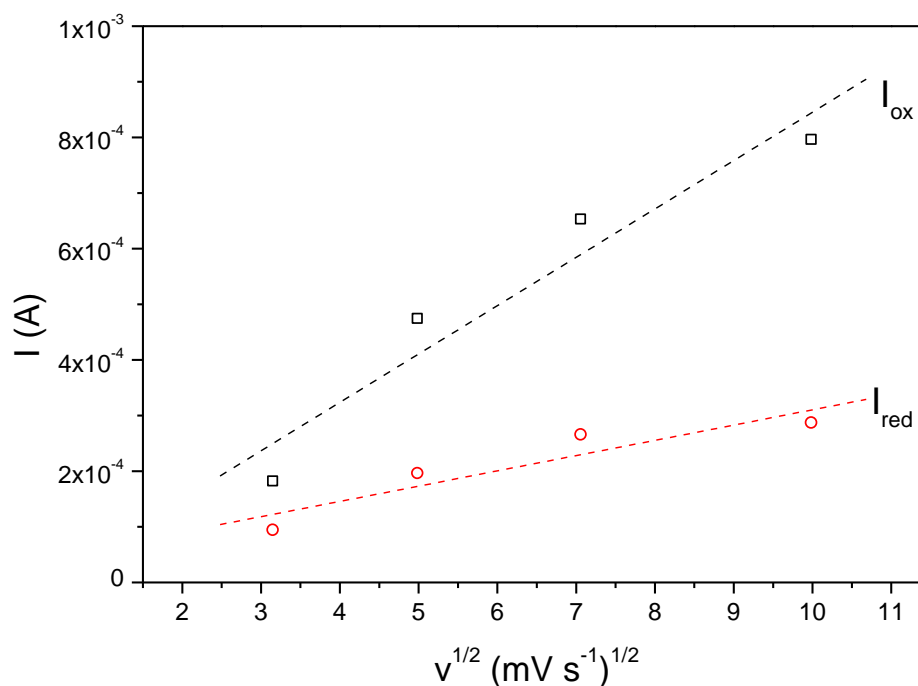
processos são dependentes de um controle difusional, associado, no presente estudo, à difusão da glicose até a superfície do filme.

Os valores de potenciais e correntes do pico anódico ( $I_{ox}$ ) e do pico catódico ( $I_{red}$ , redução) da voltametria em função da velocidade de varredura são apresentados na Tabela 3.

A partir dos valores da Tabela 3 constrói-se o gráfico que relaciona a corrente de pico da oxidação e a corrente do pico de redução das voltametrias cíclicas à raiz quadrada da velocidade de varredura empregada nas voltametrias cíclicas, que é mostrado na Figura 23.

**Tabela 3:** Valores de potenciais e correntes de pico anódico e catódico em função da velocidade de varredura. Condições de síntese: [Py] = 0,1 M; [GOx] = 1 mg/mL; [KCl] = 0,5 M e tampão equimolar; Solução de caracterização: [KCl] = 0,5M e glicose tamponada.

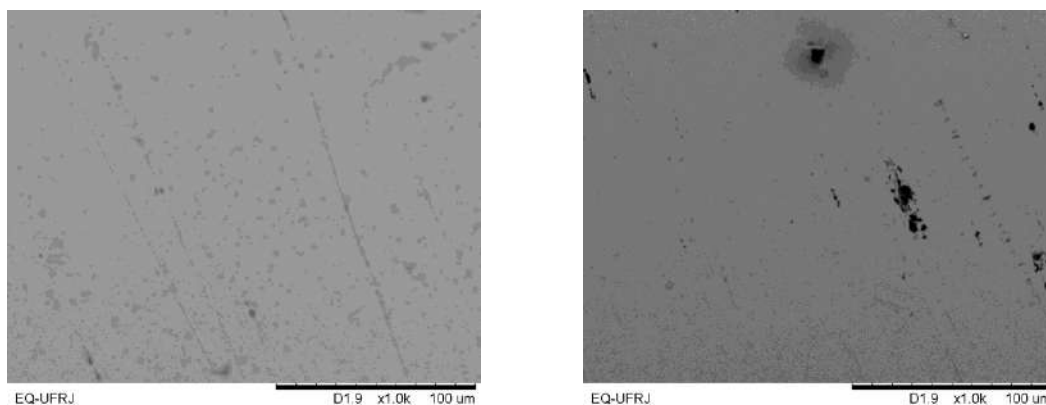
Velocidade ( $mV.s^{-1}$ )	$E_{p,ox}$ (V)	$I_{ox}$ (A)	$E_{p,red}$ (V)	$I_{red}$ (A)	$\Delta E_p$ (V) ( $ E_{p,ox}-E_{p,red} $ )
<b>10</b>	-0,3608	$1,8005 \cdot 10^{-4}$	-0,5834	$0,9259 \cdot 10^{-4}$	0,2226
<b>25</b>	-0,3462	$4,7222 \cdot 10^{-4}$	-0,5511	$1,9444 \cdot 10^{-4}$	0,2049
<b>50</b>	-0,3381	$6,5092 \cdot 10^{-4}$	-0,6267	$2,6389 \cdot 10^{-4}$	0,2886
<b>100</b>	-0,3217	$7,9444 \cdot 10^{-4}$	-0,6882	$2,8518 \cdot 10^{-4}$	0,3665



**Figura 23:** Dependência da corrente de pico (anódico,  $I_{ox}$ , e catódico,  $I_{red}$ ) com a velocidade de varredura em filmes Ppy/GOx obtidos utilizando  $[Py] = 0,1 \text{ M}$ ;

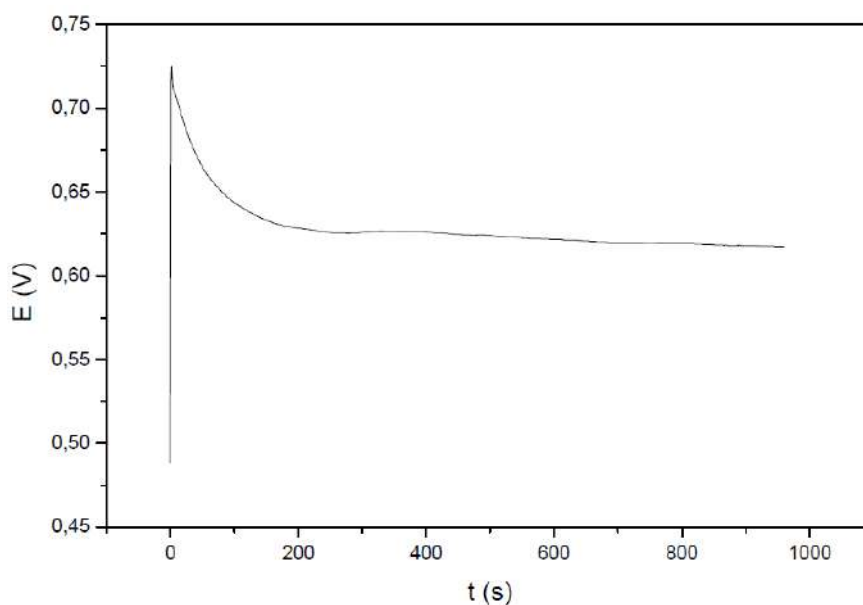
Da Figura 23 observa-se a relação linear entre a corrente de pico (tanto anódico quanto catódico) e a raiz quadrada da velocidade de varredura, o que sugere a existência de um controle difusional na superfície do eletrodo. Este controle encontra-se associado, em princípio, com o processo de dopagem do polímero, com a entrada e a saída do ânion presente em solução ( $Cl^-$ ). Esse comportamento é similar ao encontrado para outros filmes de polipirrol nos quais não são empregadas enzimas, o que indica o mesmo comportamento eletroativo para o filme condutor polimérico, independentemente da imobilização de uma enzima na superfície.

As imagens resultantes da caracterização morfológica dos filmes por Microscopia Eletrônica de Varredura, MEV, são mostradas na Figura 24.



**Figura 24:** Imagens MEV dos filmes Ppy/GOx em diferentes regiões e ampliações.

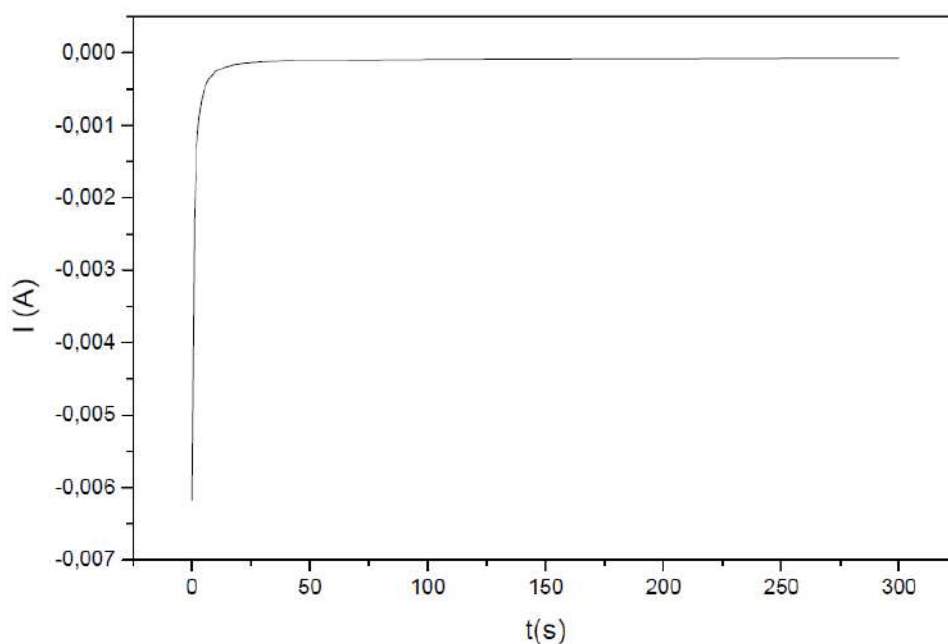
A análise das imagens MEV evidenciou homogeneidade na escala micrométrica. Foi realizado um outro teste com as mesmas condições de síntese, porém a solução de caracterização utilizada foi de tampão com  $[KCl] = 0,5\text{ M}$  (solução na ausência de glicose). Na Figura 25 mostra-se a curva de crescimento do biossensor a ser caracterizado na solução sem glicose.



**Figura 25:** Evolução do potencial (E) em função do tempo durante a síntese de filmes Ppy/GOx a ser caracterizado em solução na ausência de glicose.

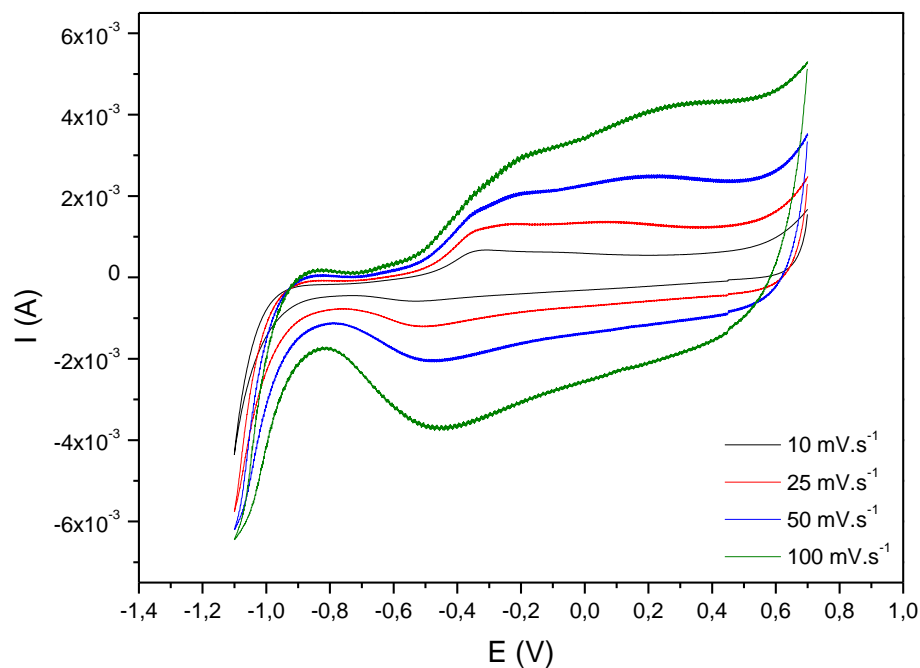
Na Figura 26 mostra-se a curva cronopotenciométrica de filmes Ppy/GOx obtidos nas mesmas condições anteriores, porém, empregando-se solução de caracterização sem glicose. O comportamento é praticamente o mesmo que o da caracterização em meio com glicose.

Na Figura 27 são mostradas as voltametrias cíclicas obtidas para o dispositivo em meio sem glicose, nas mesmas velocidades de varredura empregadas anteriormente. Observa-se o mesmo comportamento para as voltametrias que o observado na Figura 22 quanto ao aumento no valor de  $I_{p,ox}$  com a velocidade de varredura, o que indica que os processos também são dependentes de um controle difusional. Entretanto, nesta sequência de voltamogramas cíclicos, na faixa de potencial responsável pelos processos de oxi-redução do polipirrol, os picos são menos definidos ocorrendo em um  $\Delta E$  maior que o observado para a caracterização em solução contendo glicose. Observa-se, adicionalmente, uma contribuição capacitiva na corrente (Figura 27), indicando que o comportamento redox é concomitante uma onda capacitiva, similar ao comportamento observado para polímeros dopados com contra íons complexos (Cruz et al, 2008). Comparando-se as duas séries de voltamogramas em soluções com e sem glicose, pode-se inferir um comportamento de reconhecimento do soluto (glicose) pelo dispositivo contendo a enzima, devido à maior definição dos picos de oxidação e redução na caracterização com a solução contendo glicose.



**Figura 26:** Curva cronoamperométrica de filmes Ppy/GOx obtidos utilizando  $[Py] = 0,1 \text{ M}$ ;  $[KCl] = 1,0 \text{ M}$ ,  $[GOx] = 1 \text{ mg/mL}$  e tampão fosfato equimolar. Potencial aplicado  $0,7 \text{ V vs ECS}$ . Solução aquosa de caracterização contendo  $[KCl] = 1,0 \text{ M}$ ; tampão (sem a presença de glicose).





**Figura 27:** Voltamogramas cíclicos de filmes Ppy/GOx obtidos utilizando  $[Py] = 0,1$  M;  $[KCl] = 0,5$  M, tampão fosfato equimolar. Potencial aplicado vs ECS. Solução de caracterização contendo  $[KCl] = 0,5$  M, tampão.

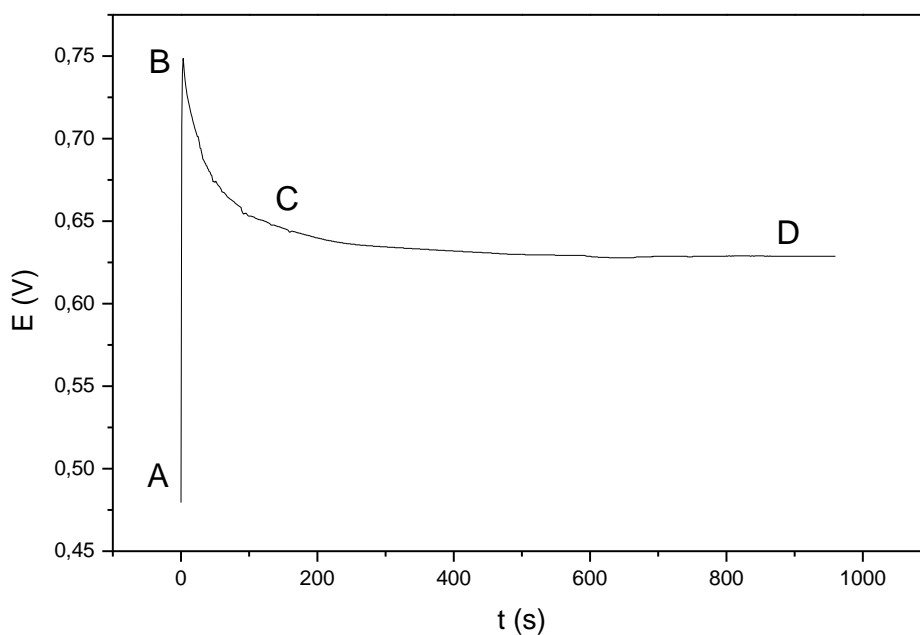
## 6.2. Análise dos dispositivos obtidos nas seguintes condições de síntese e caracterização:

Síntese:  $[Py] = 0,1$  M;  $[KCl] = 0,5$  M,  $[GOx] = 2\text{mg/mL}$  e tampão fosfato equimolar.

Solução de caracterização: Glicose tamponada.

$[KCl] = 0,5$  M e glicose tamponada

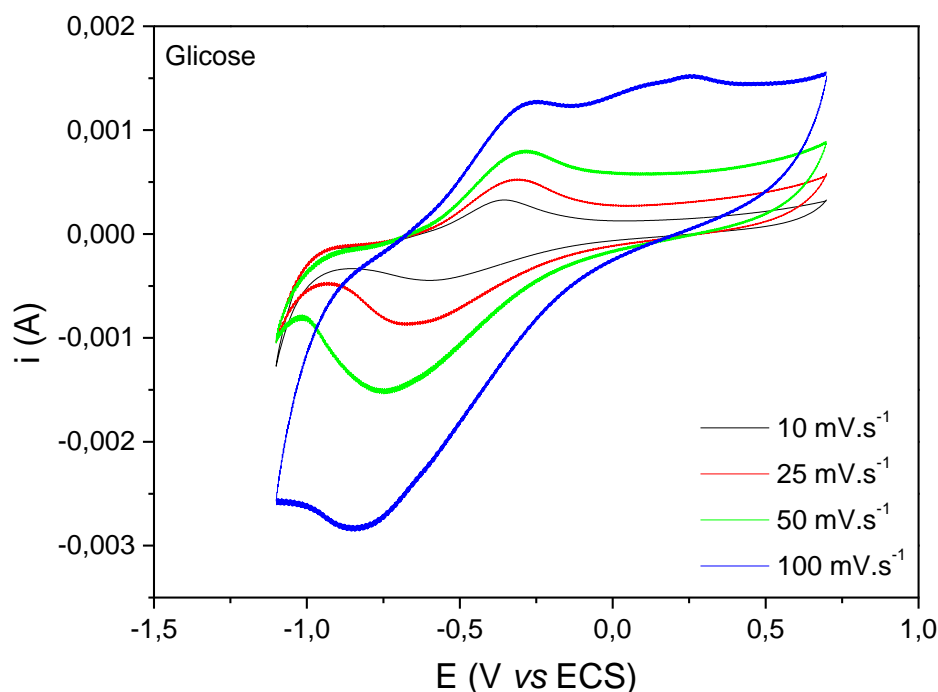
A Figura 28 mostra a curva de crescimento do biossensor nas condições referidas acima. Observa-se que o comportamento da curva é praticamente o mesmo de testes anteriores.



**Figura 28:** Evolução do potencial (E) em função do tempo durante a síntese de filmes Ppy/GOx. Curva E×t obtida durante a síntese de um filme Ppy/GOx utilizando [Py] = 0,1 M; [KCl] = 0,5 M, [GOx] = 2 mg/mL e tampão fosfato equimolar. A corrente aplicada foi de 0,5 mA durante 16 minutos.

A Figura 29 mostra os voltamogramas obtidos com glicose tamponada 100 mM. São observados dois picos de oxidação e um pico de redução na velocidade de 100 mV/s; um pico de oxidação e um pico de redução nas outras velocidades empregadas. À medida que aumenta a velocidade de varredura, os picos de oxidação são deslocados para valores mais positivos de potencial e, os picos de redução são deslocados para valores mais negativos.

A Tabela 4 mostra a dependência das correntes de pico com a velocidade de varredura.



**Figura 29:** Voltamogramas cíclicos de filmes Ppy/GOx obtidos utilizando [Py] = 0,1 M; [KCl] = 0,5 M, tampão fosfato equimolar e [GOx] = 2 mg/mL. Potencial aplicado vs ECS. Solução de caracterização contendo glicose tamponada.

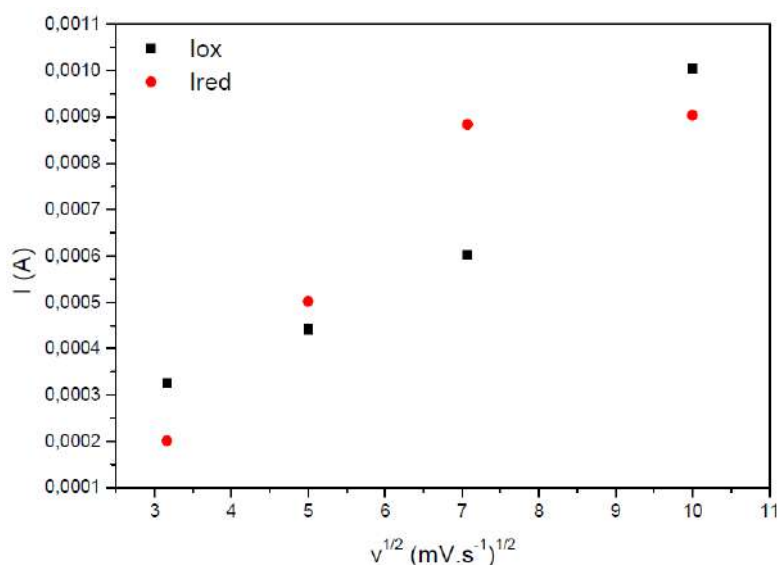
**Tabela 4:** Valores de potenciais e correntes de pico anódico e catódico em função da velocidade de varredura. Condições de síntese: [Py] = 0,1 M; [GOx] = 2 mg/mL; [KCl] = 0,5 M e tampão equimolar; Solução de caracterização: Glicose tamponada 100 mM.

v (mV.s <sup>-1</sup> )	I <sub>ox</sub> (A)	E <sub>p,ox</sub> (V)	I <sub>red</sub> (A)	E <sub>p,red</sub> (V)
<b>10</b>	3,257 10 <sup>-4</sup>	-0,357	2,008 10 <sup>-4</sup>	-0,593
<b>25</b>	4,417 10 <sup>-4</sup>	-0,317	5,019 10 <sup>-4</sup>	-0,683
<b>50</b>	6,023 10 <sup>-4</sup>	-0,300	8,835 10 <sup>-4</sup>	-0,752
<b>100</b>	1,004 10 <sup>-3</sup>	-0,280 (-0,251)	9,034 10 <sup>-4</sup>	-0,849

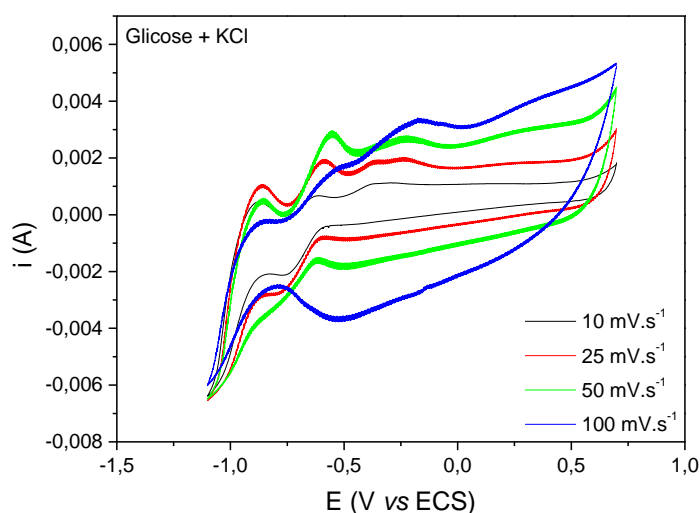
A partir dos parâmetros listados na Tabela 4, foi construído o gráfico que relaciona os picos corrente à raiz quadrada da velocidade, que está mostrado na Figura 30. Verifica-se uma curva com menor linearidade.

A Figura 31 mostra os voltamogramas obtidos com [KCl] = 0,5 M e glicose tamponada. Observam-se três picos de oxidação e um pico de redução. Comparando os

voltamogramas das Figuras 29 e 31, supõe-se que os dois picos de oxidação localizados em potenciais mais positivos corresponderem à reação de reconhecimento da glicose pela enzima GOx e, o pico localizado em potencial mais negativo correspondesse às propriedades de oxi-redução naturais do ppy. Para que esses picos pudessem ser identificados, foi realizado um teste branco no qual um filme de Ppy foi sintetizado e caracterizado na ausência de GOx.



**Figura 30:** Dependência da corrente de pico com a velocidade de varredura em filmes Ppy/GOx (Síntese: [Py] = 0,1 M; [KCl] = 0,5 M; [GOx] = 2 mg/mL e tampão fosfato equimolar). A partir dos VC em [glicose] = 100 mM sem KCl.

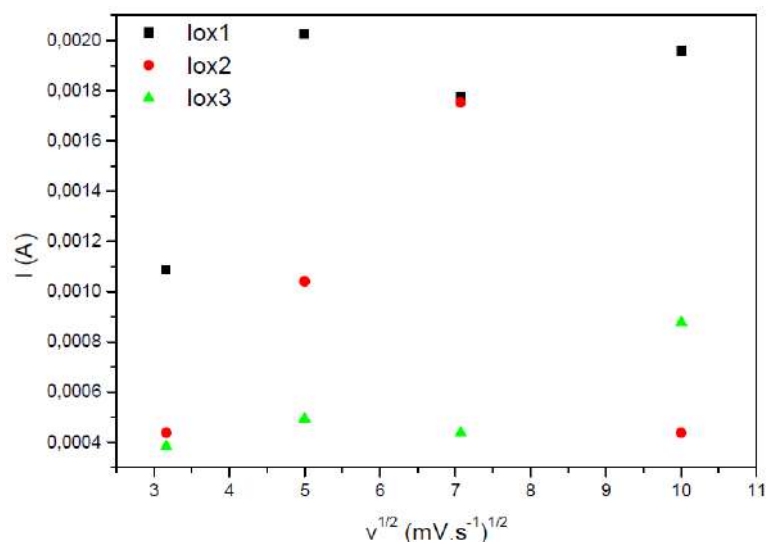


**Figura 31:** Voltamogramas cíclicos de filmes Ppy/GOx obtidos utilizando [Py] = 0,1 M; [KCl] = 0,5 M, tampão fosfato equimolar e [GOx] = 2 mg/mL. Potencial aplicado vs ECS. Solução de caracterização contendo glicose tamponada e [KCl] = 0,5 M.

A dependência da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura para os voltamogramas nessas condições é mostrada na Tabela 5 e na Figura 32. Verifica-se um padrão diferente na curva que relaciona as correntes de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura para estas condições. Supõe-se que as diferenças de comportamento observadas nas Figuras 30 e 32 se devem ao fato de a difusão das moléculas de glicose para as enzimas imobilizadas no polímero serem mais importantes, nestas condições, do que a difusão daquelas e do  $\text{Cl}^-$  para a superfície do eletrodo, o que resultou em uma relação não linear.

**Tabela 5:** Valores de potenciais e correntes de pico anódico e catódico em função da velocidade de varredura. Condições de síntese:  $[\text{Py}] = 0,1 \text{ M}$ ;  $[\text{GOx}] = 2 \text{ mg/mL}$ ;  $[\text{KCl}] = 0,5 \text{ M}$  e tampão equimolar; Solução de caracterização:  $[\text{KCl}] = 0,5 \text{ M}$  e glicose tamponada  $100 \text{ mM}$ .

$v \text{ (mV.s}^{-1}\text{)}$	$I_{\text{ox},1} \text{ (A)}$	$E_{\text{p,ox},1} \text{ (V)}$	$I_{\text{ox},2} \text{ (A)}$	$E_{\text{p,ox},2} \text{ (V)}$	$I_{\text{ox},3} \text{ (A)}$	$E_{\text{p,ox},3} \text{ (V)}$
<b>10</b>	$1,088 \cdot 10^{-3}$	-0,878	$4,381 \cdot 10^{-4}$	-0,622	$3,833 \cdot 10^{-4}$	-0,367
<b>25</b>	$2,024 \cdot 10^{-3}$	-0,861	$1,040 \cdot 10^{-3}$	-0,588	$4,927 \cdot 10^{-4}$	-0,310
<b>50</b>	$1,777 \cdot 10^{-3}$	-0,861	$1,752 \cdot 10^{-3}$	-0,553	$4,381 \cdot 10^{-4}$	-0,233
<b>100</b>	$1,959 \cdot 10^{-3}$	-0,866	$4,381 \cdot 10^{-4}$	-0,539	$8,762 \cdot 10^{-4}$	-0,171



**Figura 32:** Dependência da corrente de pico com a velocidade de varredura em filmes Ppy/GOx (Síntese:  $[\text{Py}] = 0,1 \text{ M}$ ;  $[\text{KCl}] = 1,0 \text{ M}$ ;  $[\text{GOx}] = 2 \text{ mg/mL}$  e tampão fosfato equimolar). A partir dos VC em  $[\text{glicose}] = 100 \text{ mM}$  e  $[\text{KCl}] = 0,5 \text{ M}$ .

### 6.3. Análise dos brancos (filmes sem enzima):

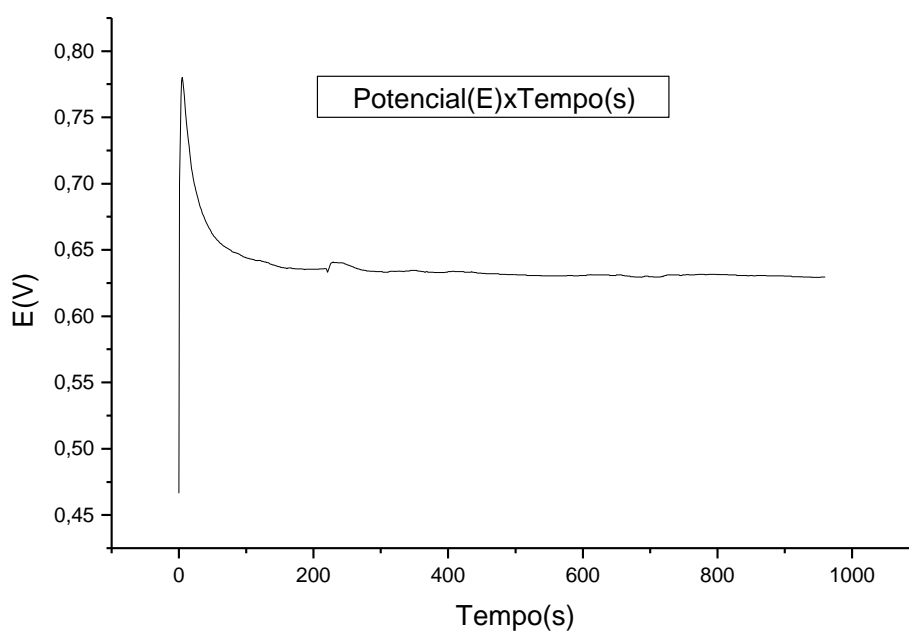
Síntese: [Py] = 0,1 M; [KCl] = 0,5 M e tampão fosfato equimolar.

[Py] = 0,1 M; [KCl] = 1,0 M e tampão fosfato equimolar.

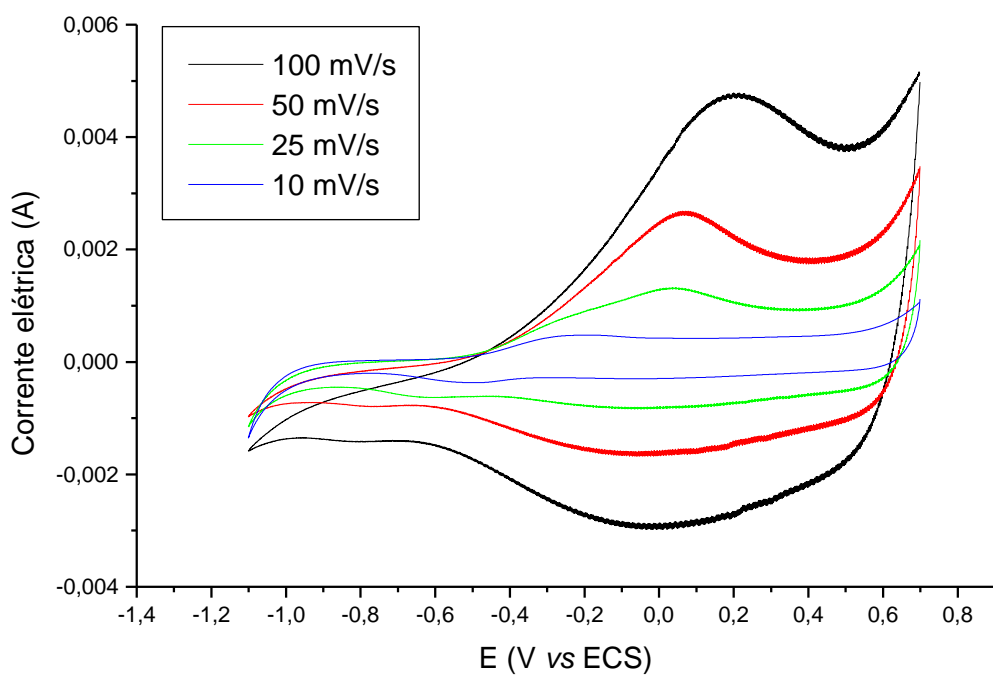
Solução de caracterização: Solução de [KCl] = 0,5 M

Solução de [KCl] = 1,0 M

Na Figura 33 mostra-se a curva de potencial em função do tempo obtida durante o crescimento galvanostático do filme de polipirrol com 0,5 M de KCl. Observa-se o mesmo tipo de crescimento descrito para os filmes com enzima. Na Figura 34 são mostrados os voltamogramas cíclicos para esse filme obtidos com velocidades entre 10 e 100  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

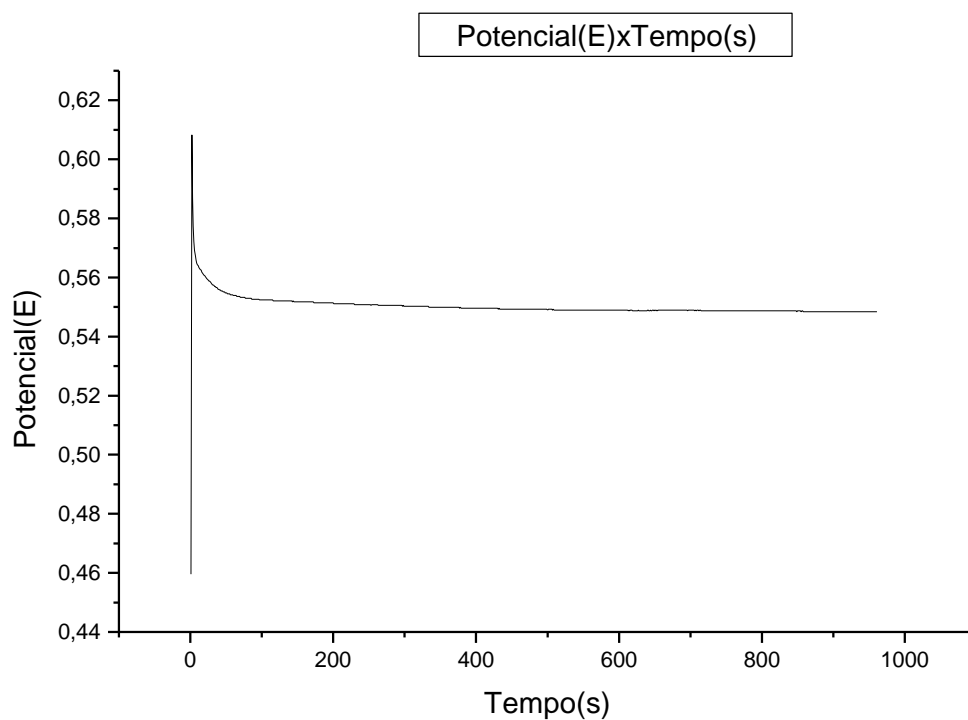


**Figura 33:** Evolução do potencial (E) em função do tempo durante a síntese de filmes Ppy sem GOx, com [KCl] = 0,5 M.

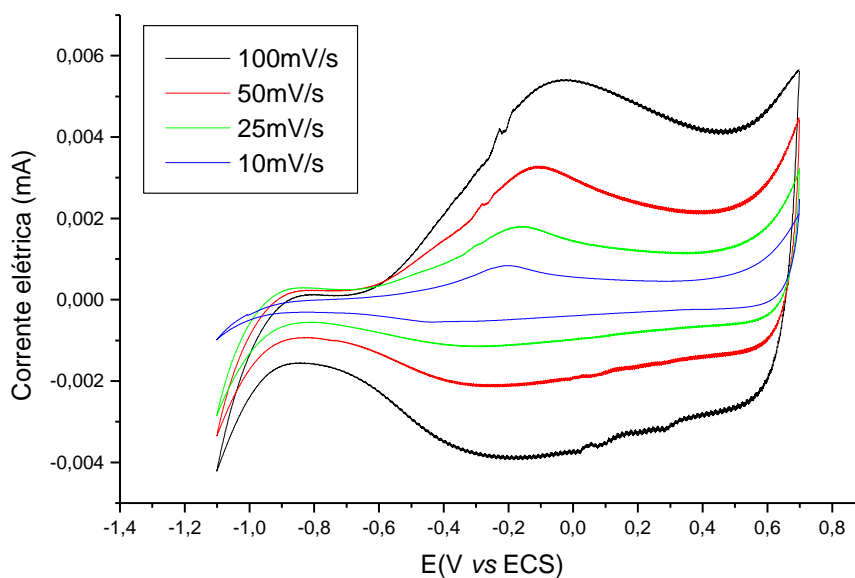


**Figura 34:** Voltamogramas cíclicos do filme Ppy obtidos utilizando  $[Py] = 0,1 \text{ M}$ ;  $[KCl] = 0,5 \text{ M}$ , tampão fosfato equimolar na ausência de GOx. Potencial aplicado vs ECS.

Nas Figuras 35 e 36 são mostradas as curvas de  $E(V)$  vs  $t$  e voltamogramas cíclicos para o filme crescido sem enzima e com  $[KCl] = 1,0 \text{ M}$ .



**Figura 35:** Evolução do potencial (E) em função do tempo durante a síntese de filmes Ppy sem GOx, com  $[KCl] = 1,0 M$ .



**Figura 36:** Voltamogramas cíclicos do filme Ppy obtidos utilizando  $[Py] = 0,1 M$ ;  $[KCl] = 1,0 M$ , tampão fosfato equimolar na ausência de GOx. Potencial aplicado vs ECS.



As curvas de crescimento dos filmes (Figuras 33 e 35) são semelhantes às aquelas obtidas nas condições anteriormente estudadas, indicando a reprodutibilidade da síntese do material, a qual ocorre pelo mesmo mecanismo de crescimento anteriormente descrito. Percebe-se, nestas curvas, uma diferença que pode ser associada à polarização do meio eletrolítico, uma característica mais efetiva sob condições de maiores concentrações salinas. Observa-se nas Figuras 34 e 36, para ambas as amostras, um comportamento voltamétrico distinto daquele observado em solução contendo glicose. Na ausência do analito, a resposta voltamétrica dos filmes corresponde à resposta do Ppy dopado com KCl, uma vez que o sinal que seria observado referente à bioeletrooxidação da glicose não ocorre. Os picos de oxidação foram localizados, aproximadamente, entre -0,4 V e 0,5 V nos resultados obtidos com  $[KCl] = 0,5 M$ ; entre -0,6 V e 0,5 V nos resultados obtidos com  $[KCl] = 1,0 M$ . Isso indica que os picos correspondentes à reação de reconhecimento de glicose e ao movimento de entrada e saída dos íons  $Cl^-$  do filme ocorrem praticamente na mesma faixa de potencial, sendo os picos, obtidos nas caracterizações dos dispositivos na presença de GOx, uma soma dos dois processos.

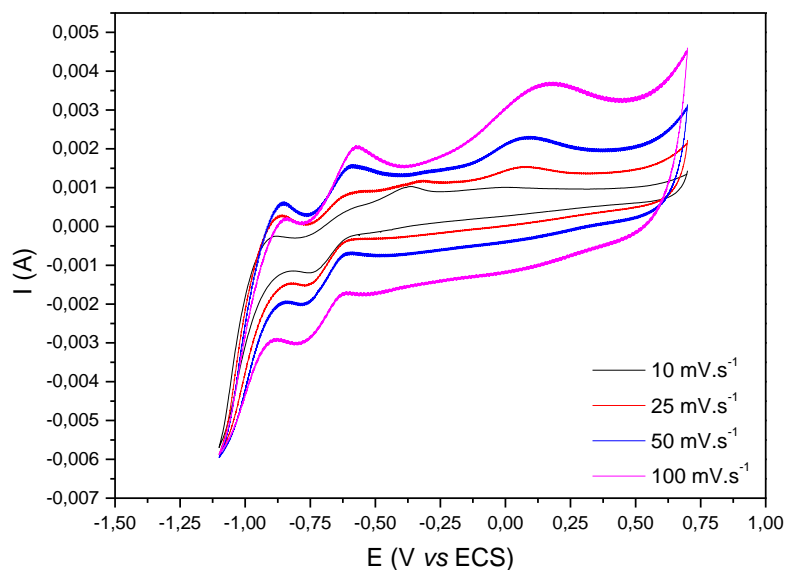
#### **6.4. Análise dos dispositivos obtidos nas seguintes condições de síntese e caracterização:**

Síntese:  $[Py] = 0,1 M$ ;  $[KCl] = 0,5 M$ ,  $[GOx] = 3 mg/mL$  e tampão fosfato equimolar.

Solução de caracterização:  $[KCl] = 0,5 M$  e glicose tamponada.

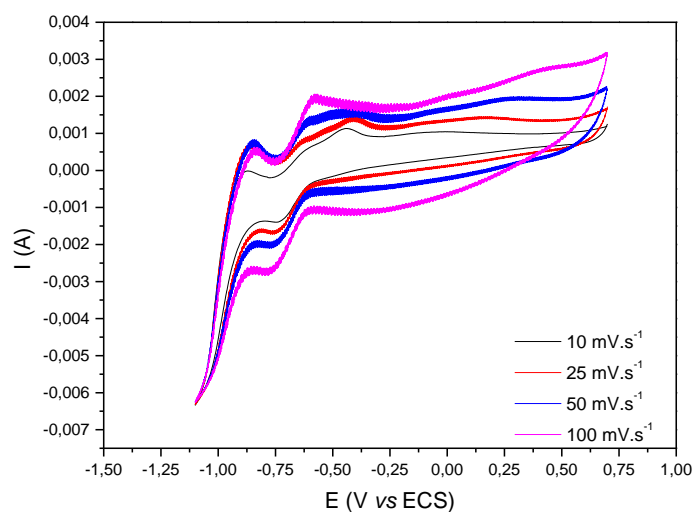
$[KCl] = 0,5 M$  e tampão equimolar.

Na Figura 37 mostra-se os voltamogramas cíclicos obtidos com glicose tamponada e  $[KCl] = 0,5 M$ . Dos voltamogramas são observados três picos de oxidação e dois de redução, sendo um deles com corrente bem baixa.



**Figura 37:** Voltamogramas cíclicos de filmes Ppy/GOx obtidos utilizando [Py] = 0,1 M; [KCl] = 0,5 M, tampão fosfato equimolar e [GOx] = 3 mg/mL. Potencial aplicado vs ECS. Solução de caracterização contendo glicose tamponada e [KCl] = 0,5M.

A figura 38 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos com tampão e [KCl] = 0,5 M. Observa-se dois picos de oxidação e dois picos de redução em potenciais negativos.



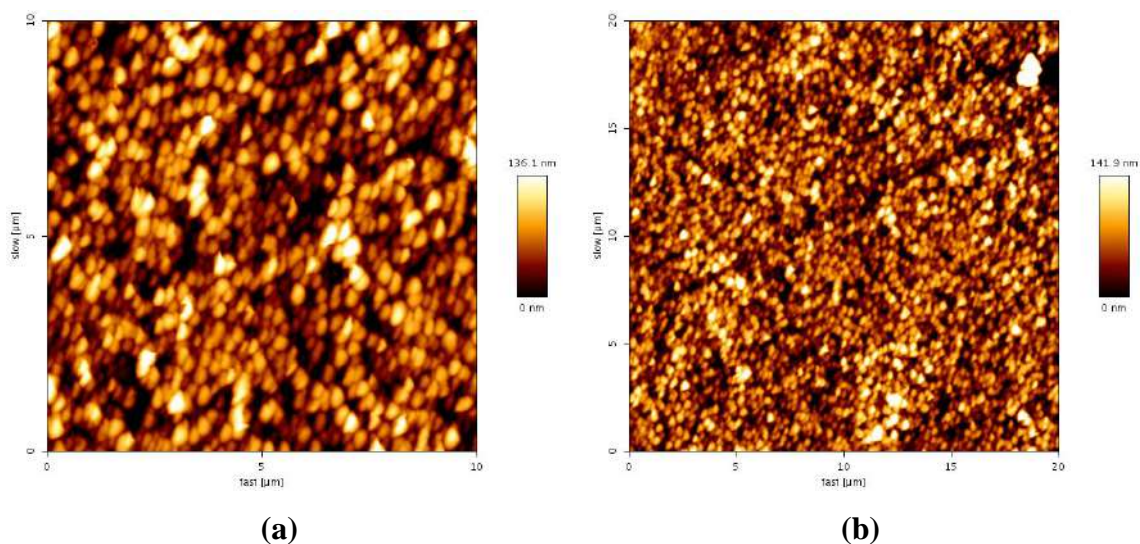
**Figura 38:** Voltamogramas cíclicos de filmes Ppy/GOx obtidos utilizando [Py] = 0,1 M; [KCl] = 0,5 M, tampão fosfato equimolar e [GOx] = 3 mg/mL. Potencial aplicado vs ECS. Solução de caracterização contendo tampão e [KCl] = 0,5 M.

A análise dos voltamogramas em todas as condições de síntese propostas permitiu avaliar o comportamento dos filmes em solução eletrolítica contendo ou não o analito (glicose), bem como a influência da concentração de GOx em cada dispositivo.

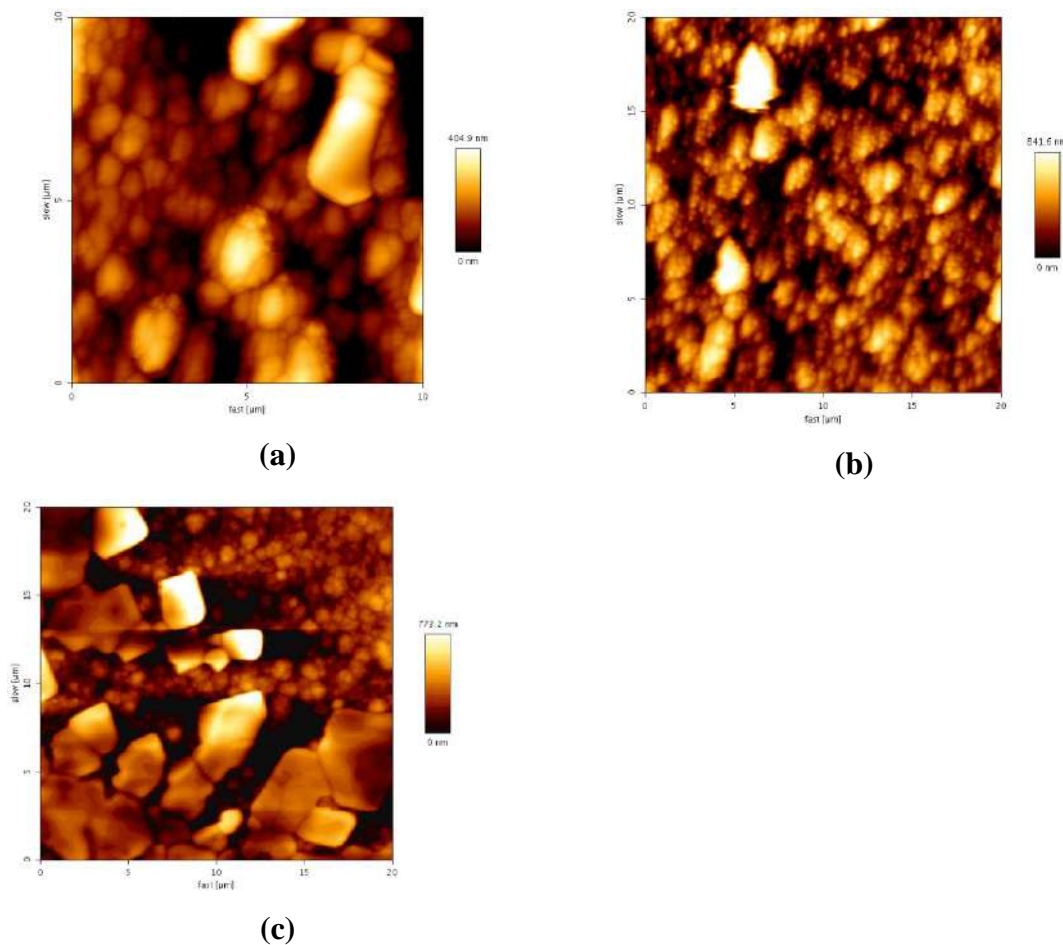
Em todos os casos, os voltamogramas em solução eletrolítica (sem glicose) apresentaram um comportamento semelhante ao do Ppy dopado com KCl, indicando que a imobilização da enzima não interfere nos processos de oxirredução do polímero condutor. Em soluções contendo glicose, os filmes apresentaram uma resposta voltamétrica que inclui tanto o sinal relativo ao processo redox do Ppy quanto o sinal referente ao processo bioeletroquímico da GOx imobilizada, atuando sobre a glicose.

O aumento da concentração de GOx na solução de síntese reflete-se no aumento da definição dos picos das voltametrias, como observado na série de voltamogramas apresentada. Adicionalmente, esta (definição dos picos) também é dependente da concentração de eletrólito suporte tanto na solução de síntese quanto nas de caracterização. Em especial, filmes Ppy/GOx contendo [GOx]= 2 e 3 mg/mL apresentaram picos de oxidação bem definidos associados aos processos redox já mencionados.

Imagens AFM de filmes Ppy/GOx obtidos com 2 e 3 mg/mL (GOx) são mostradas nas Figuras 39 e 40, respectivamente.



**Figura 39:** Imagens obtidas por AFM dos filmes obtidos sobre ITO nas seguintes condições: [Py] = 0,1 M, [KCl]=0,5 M, [GOx] = 2 mg/ml.



**Figura 40:** Imagens AFM dos filmes obtidos sobre platina nas seguintes condições:  $[Py] = 0,1 \text{ M}$ ,  $[KCl] = 1 \text{ M}$ , (a) e (b)  $[GOx] = 3 \text{ mg/ml}$  e (c)  $2 \text{ mg/ml}$ . A imagem (b) corresponde à parte clara do filme, e a imagem (a) corresponde à parte escura.

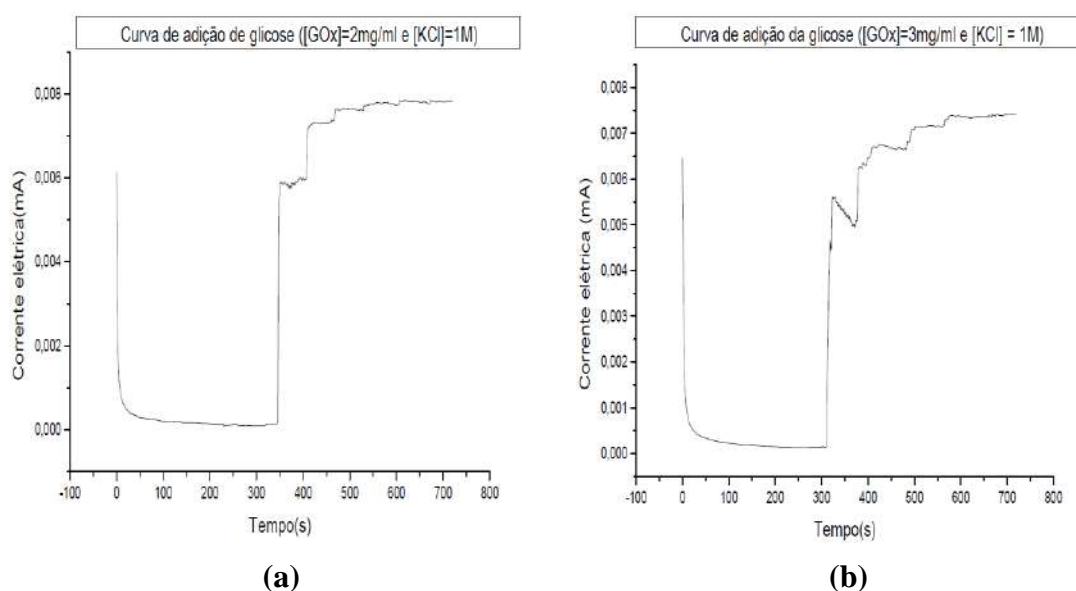
Pode-se perceber, a partir das imagens obtidas dos filmes Ppy/GOx, a influência da superfície do eletrodo de trabalho (se ITO ou Pt). Comparando-se as imagens obtidas sobre ITO, Figura 39 (b), com a imagem obtida sobre Pt, Figura 40 (c), ambas com a mesma concentração de enzima, nota-se que há a formação característica tipo “couve flor” ou globular para ambas. Entretanto, na Figura 40 (c) se observa na parte direita superior da imagem, que as dimensões dos glóbulos são maiores, provavelmente em decorrência da mudança do eletrodo.

Desconsiderando-se o efeito da superfície, o aumento da concentração de GOx nos filmes indica um efeito decisivo na estrutura superficial. Os filmes contendo  $[GOx] = 2 \text{ mg/mL}$  (Figura 39 (b) e 40 (c)) apresentaram uma estrutura mais compacta, resultando em uma superfície mais homogênea que aquela observada para os filmes contendo  $[GOx] = 3 \text{ mg/mL}$  (Figura 40 (a) e (b)). Nos filmes observa-se a formação de uma estrutura granular homogênea, característica do polipirrol, com compactação maior

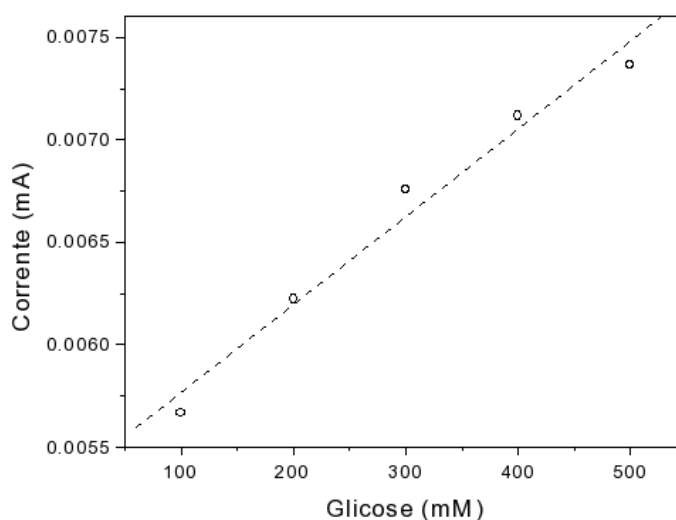
para filmes Ppy/GOx(2 mg/mL), assim como uma distribuição estreita de diâmetro dos nanodomínios. A estrutura superficial compacta das amostras é uma consequência do processo de nucleação e crescimento eletroquímico dos filmes sobre o eletrodo de trabalho.

### 6.5. Curvas de adição de glicose:

Para verificar se existe uma relação linear entre a corrente elétrica e a concentração de glicose foi realizado um experimento de adição de glicose. Para tanto foi escolhido o filme de Ppy/GOx com [GOx] de 2 e 3 mg/mL, obtido em ITO. Foi utilizada uma solução de tampão com [KCl] = 1,0M, e a avaliação da sensibilidade dos dispositivos à presença de glicose foi avaliada estudando-se a resposta amperométrica dos filmes Ppy/GOx frente à adição de glicose em concentrações predeterminadas. A resposta cronoamperométrica dos dispositivos foi registrada com a adição de 1 ml por minuto de solução contendo 100 mM de glicose, a partir de 300s. Os resultados desses experimentos são mostrados na Figura 41 (a) e (b), respectivamente. O gráfico contendo os valores de corrente em função da concentração de glicose é mostrado na Figura 42.



**Figura 5:** Curvas de adição de glicose dos filmes obtidos nas seguintes condições: [Py]=0,1 M, [GOx] = 2 (a) e 3 mg/ml (b) e [KCl] = 1,0 M. Potencial aplicado vs ECS.



**Figura 42:** Relação entre a corrente de pico e a concentração de glicose para o dispositivo Ppy/GOx (3 mg/mL).

A partir da relação aproximadamente linear detectada para a faixa de concentrações estudada, observada na Figura 42, foi realizada uma regressão linear pelo método de mínimos quadrados, sendo encontrados para R e  $R^2$  os valores de 0,98789 e 0,97593, respectivamente. Os outros parâmetros obtidos encontram-se listados na Tabela 6.

**Tabela 6:** Parâmetros obtidos para a regressão linear dos dados de corrente em função da concentração de glicose.

<b>corrente = A + [glicose] × B</b>	
<b>A</b>	<b>B</b>
$(5,34 \pm 0,13) \times 10^{-3}$	$(4,291 \pm 0,39) \times 10^{-6}$

De posse dos parâmetros listados na Tabela 6, pode-se afirmar que o dispositivo apresenta uma resposta aproximadamente linear na faixa de concentração de glicose entre 100 e 500 mM com sensibilidade suficiente para o emprego em amostras padrão. Para o emprego em amostras reais, faz-se necessário ainda o estudo da influência de interferentes e a avaliação da reprodutibilidade dos dispositivos. Adicionalmente, a avaliação da vida útil e da estabilidade durante a estocagem é também importante para a viabilização dos dispositivos.

## 7. CONCLUSÕES

No presente trabalho foram desenvolvidos biossensores baseados em polipirrol e glicose oxidase (Ppy/GOx), os quais foram caracterizados por voltametria cíclica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica. A resposta dos dispositivos foi avaliada em solução pela adição de concentrações controladas de glicose, verificando-se a corrente.

As análises por voltametria cíclica evidenciaram comportamentos distintos para filmes Ppy/GOx obtidos com diferentes concentrações de GOx. Em particular, para filmes contendo 2 e 3 mg/mL GOx, a resposta voltamétrica mais definida dos processos redox permitiu a análise da dependência da corrente com a concentração de glicose.

Filmes Ppy/GOx(3 mg/mL) apresentaram uma resposta amperométrica aproximadamente linear com a concentração de glicose na faixa entre 100 e 500 mM, permitindo, inicialmente, a quantificação de glicose em soluções padronizadas. Este reconhecimento da glicose pelo biossensor pode ser atribuído às propriedades nanoestruturais do filme, morfologia, espessura e imobilização da enzima. A nanoestrutura do filme permitiu a imobilização da enzima durante o crescimento do filme e durante os experimentos de voltametria cíclica e, o conseqüente reconhecimento da glicose pelo filme. Pode se concluir, que o biossensor obtido neste trabalho é promissor para futuras aplicações.

Em trabalhos futuros, pretende-se verificar a reprodutibilidade dos resultados obtidos, localizar as posições das enzimas imobilizadas no filme, através de técnicas de caracterização morfológica e realizar cálculos teóricos das propriedades do filme Ppy/GOx.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CRUZ, A.G.B. da; WALDELL, J.L.; ROCCO, A.M. . J Mat Sci 43 (2008) 5823.
- SHILABIN, A.G. ; ENTEAZI A.A.; Eur Pol J 36 (2000) 2005.
- BARD, A.,J.;FAULKNER,L.,R. Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications", 2nd Ed, NY, John Wiley & Sons, 2001.
- BARISCI, J.N.; STELLA, R., SPINKS, G.M. and WALLACE G.G. Electrochem. Acta 2000, 46:519
- BÖYÜKBAYRAM, Ayse Elif. Immobilization of invertase, polyphenol oxidase e glucose oxidase in conducting copolymers of thiophene-capped polytetrahydrofuran and pyrrole. Tese(Doutorado em Química). The Graduate School of Natural and Applied Sciences of middle east technical University. 2005
- BREDA, J.L. AND STREET, G.B. **Acc. Chem.** 1985, 18:309.
- CARTWELL, R.W. Chemical sensors, Oxford University Press, 1997.
- COELHO, Maria Alice Zarur; SALGADO, Andréia Medeiros; RIBEIRO, Bernardo Dias. Tecnologia enzimática. Rio de Janeiro: FAPERJ; Petrópolis, RJ: EPUB, 2008.
- CRUZ, A.,B.,G., da;WARDELL,J.,L.,;ROCCO, A.,M. Synthetic Metals 157 (2007) 80.
- CRUZ, A. G. B. da. Materiais híbridos "orgânico/inorgânico" nanoestruturados baseados em polipirrol e diânions derivados do 1,3-ditiola-2-tiona-4,5-ditiolato-DMIT. Tese (Doutorado em Química).UFRJ. 2006.
- D'ORAZIO, Paul. Biosensors in clinical chemistry- 2011 update. In: Clinica Chimica Acta N° 412, p. 1749-1761, 2011.
- DARAIN F., PARK J. S., AKUTSU H., SHIM Y. B. Superoxide radical sensing using a cytochrome c3 immobilized conducting polymer electrode. In: Biosensors and Bioelectronics v. 23, p. 161-167, 2007.
- DAVIDSON, R.G., Hammond, L.C., Turner, T.G. and Wilson, A.R. Synth. Met.1996, 81:1.
- DELABOUGLISSE, D. and Garnier, F. J. Chim. Phys. 1992, 89:1131.
- DIAZ, A.F. and LACROIX, J.C. New J. Chem. 1988, 12:171.



DURAN, N.; MATTOSO, L. H.C.; MORAIS, P.C. de. Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Paulo: Editora Artliber, 2006.

ELSENBAUMER, R.L.; ECKHARDT, H.; IQBAL, Z.; TOTH, J. and BAUGHMAN, R.H. Mol.Cryst. Liq. Cryst. 1985, 118:111.

FIORITO, P.A.;BRETT, C.M.A.; TORRESI,S.I.C. Talanta 69 (2006) 403.

NALWA, H.S. (ed) (1997) "Handbook of conductive polymers: spectroscopy and physical properties" Vol. 3. Wiley, Chichester, UK, 1997.

JEON, D., KIM, J., GALLAGER, M.C., Willis, R.F. and Kim, Y.T. J. Vac. Sci. Technol.1991, B9:1154

KIANI, M.S. and MITCHELL, G.R. Synth. Met. 1992, 48:203.

KIANI, M.S.; BHATT, N.V.; DAVIES, F.J. and MITCHELL, G.R. Polymer. 1992, 33:4113.

LI, J.; WANG, E.;GREEN, M. and WEST, P.E. Synth. Met. 1995, 74:127

LIMA, R. S.; NUNES, G. S. Biossensor enzimático para detecção de fungicidas ditiocarbamatos. Estudo cinético da enzima aldeído desidrogenase e otimização do biossensor. In: Quim. Nova, Vol. 30, No. 1, p. 9 - 17 , 2007.

LOUZADA, E. S., *et al.* Construção e caracterização de um biossensor potenciométrico para determinação de pirogalol. In: Revista Analytica. Junho/Julho de 2004. Nº 11, p. 52 – 57.

LUZ, et al. Desenvolvimento de eletrodos baseados em compósitos de polipirrol/acetato de celulose. In: 17º CBECIMat-Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais. 15 a 19 de novembro de 2006. Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

MILAGRES, B. G.. Desenvolvimento de biossensores para determinação de salicilato e glicose. 1996. Tese (Doutorado em Química). UNICAMP.

MOLDOVAN, C. R.. Condutiva Polimers. In: Materials Science and Engineering Reports – R. Vol 56, p.1-6, pp1-129, 2007.

NOGAMI, Y., POUGET, J.P. and ISHIGURO, T. Synth. Met. 1994, 62:257.

PEREIRA, R.P. Biossensores eletroquímicos baseados em polímeros condutores nanoestruturados. Novembro de 2008. UEZO.

RAHMAN, M.A. ; WON, M.S.; SHIM, Y.B., *Electroanalysis* 19 (2007) 631.

RAHMAN, M. A.; KUMAR, P.; PARK, Deog-Su, SHIM, Yoon-Bo. *Electrochemical Sensors Based on Organic Conjugated Polymers*. In: *Sensors*, 2008,8,pg 118-141.

RAMAVICIUS, A; KAUSAITE, A; A RAMANAVICIENE, A. *Sensors and Actuators B* 111-112 (2005) 532.

SALMON, M.; DIAZ, A.F.; LOGAN, A.J.; KROUNBI, M. and BARGAR, J. *Mol. Cryst, Liq.Cryst.* 1983, 83:1297.

SEKER, S; BECERIK, I. *Electroanalysis* 16 (2004) 1542.

SILK, T.; HONG, Q.;TAMM, J. and COMPTON, R.G. *Synth. Met.* 1998, 93:59.

SILVA, C.A. Síntese e caracterização de polímeros condutores através de técnicas eletroquímicas, espectroscópicas e de espectrometria de massa. 2006. Dissertação (Mestrado em Físico-Química). UFRJ.

VISY, C.; LUKKARI J.; PAJUNEM T. and KANAKARE, J. *Synth. Met.* 1899, 22:289.

WALLACE, G. G.; SPINKS, G. M.; KANE-MAGUIRE, L.A.P.;TEASDALE, P. R. *Conductice Electroactive Polymers. Intelligent Materials Systems*. Second edition. 2003 by CRC Press LLC. United States, 2002.

WANG, J; MUSAMEH, M. *Analytica Chimica Acta* 539 (2005) 209.

WILSON, S.; BOWEN, C. New materials for Micro-scale Sensors and Actuators - An Engineering Review. In: *Materials Science and Engineering Reports - R* volume 56, junho de 2007, p.1-129.

XIA, L.; WEI, Z.; WAN, M. Conducting polymer nanostructures and their application in biosensors. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 341 (2010) 1-11.

YANG, R.; EVANS, D.F.; CHRISTENSEN, L. and HENDRICKSON, W.A. *J. Phys. Chem.*1990, 94:6117. YOON, C.O., Sung, H.K., Kim, J.H., Barsoukov, E., Kim, J.H. and Lee, H. *Synth.Met.* 1999, 99:201.