



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES DE
ELÉCTRODOS MODIFICADOS COM POLÍMEROS
CONDUTORES
FUNCIONALIZADOS PARA A
IMOBILIZAÇÃO DE DNA**

Virgínia Clara Teixeira Ferreira

MESTRADO EM ELECTROQUÍMICA APLICADA
(Corrosão e Protecção de Materiais)

2006



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES DE
ELÉCTRODOS MODIFICADOS COM POLÍMEROS
CONDUTORES
FUNCIONALIZADOS PARA A
IMOBILIZAÇÃO DE DNA**

Virgínia Clara Teixeira Ferreira

**MESTRADO EM ELECTROQUÍMICA APLICADA
(Corrosão e Protecção de Materiais)**

Dissertação orientada pela Professora Doutora Luisa Maria Alvares Duarte de Almeida Abrantes e co-orientada pela Professora Doutora Ana Maria Gomes Mora Pires de Andrade Tenreiro

2006

Agradecimentos

Desejo agradecer a todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço profundamente à minha orientadora Professora Doutora Luisa Maria Abrantes pela compreensão, incentivo e constante apoio concedidos e aos seus preciosos conselhos e opiniões.

À minha co-orientadora Professora Doutora Ana Maria Tenreiro pela paciência e disponibilidade sempre demonstrados e ao Professor Rogério Tenreiro pela oportunidade concedida de me aventurar no mundo da biologia.

Ao Doutor Jorge Correia pela simpatia constante.

Aos meus professores do curso de mestrado pelos seus valiosos ensinamentos.

Aos meus colegas do Grupo de Electroquímica Interfacial Ana Melato, Alda, Ana Mourato, Ana Viana, Isabel, António, João, Miguel, Elisabete e Sheila pelo agradável acolhimento, boa disposição e apoio constantes e aos colegas de mestrado pelo companheirismo e apoio.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo financiamento concedido através do projecto POCTI/ESP/39233/2001, que permitiu a realização deste trabalho.

Ao CQB/DQB pelas condições disponibilizadas para a realização do trabalho experimental.

Aos meus amigos da Capital, à Rute e Catarina pela simpatia e boa disposição e a todos os meus amigos de sempre, especialmente à Rita e Ana Lobo que apesar da distância estão sempre presentes.

À minha irmã, Rui Nelson e Bernd pela amizade, ânimo e companheirismo.

Aos meus pais e avó pela confiança, incentivo e carinho sempre presentes e por me fazerem acreditar que sou capaz.

RESUMO

Com o presente trabalho pretendeu-se estudar a modificação de eléctrodos com polímeros contendo grupos funcionais livres com afinidade para o ADN e avaliar a capacidade das biomoléculas imobilizadas para detecção de iões pesados (Zn^{2+}).

Investigaram-se os monómeros 5-Amio-1-Naftol (AN) e Tionina (TN) cujo estudo sistemático permitiu seleccionar as condições de electropolimerização com características apropriadas ao objectivo do trabalho.

A electrossíntese do AN em meio ácido por varrimento de potencial permitiu obter filmes com boa electroactividade e estabilidade, nesse meio. No entanto, a fraca electroactividade em meio neutro, inviabilizou a sua aplicação no presente estudo.

A electroactividade dos filmes de politionina (PTN) sintetizados em meio ácido depende das condições experimentais. Na polimerização potenciostática obtiveram-se filmes com electroactividade crescente com o tempo e potencial de polarização. Potenciodynamicamente, o crescimento do filme com 80 ciclos a 20 mV s^{-1} entre 0 e 1150 mV vs. ESC (PTN 80/20), conduziu a um aumento de electroactividade. Estudos por voltametria cíclica e microbalança electroquímica de cristal de quartzo (MECQ) revelaram alterações estruturais no decorrer da polimerização, sendo corroboradas por microscopia de força atómica (MFA). Analisou-se o comportamento redox do PTN em diferentes meios e numa gama alargada de valores de pH; verificou-se estabilidade em meios biologicamente compatíveis e que a electroactividade é afectada pela natureza e pH da solução.

Em estudos por MECQ observaram-se diferentes variações de massa com o espessamento dos filmes e com o pH da solução; os resultados apontam para a contribuição de diferentes mecanismos, dependendo do pH da solução.

Os grupos amina livres na estrutura do polímero permitiram a imobilização dos nucleótidos dGTP e dG20-P no eléctrodo modificado - PTN 80/20 - sendo esta favorecida pela presença dos agentes acoplantes *N*-hidroxisuccinimida (NHS) e *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC).

A afinidade dos iões metálicos para o ADN permitiu a detecção electroquímica destes com os eléctrodos modificados com PTN e cd-ADN.

Palavras chave: 5-Amino-1-Naftol; Tionina; Electropolimerização; Microbalança electroquímica de cristal de quartzo; Microscopia de força atómica; Microscopia de varrimento electroquímico; Imobilização de nucleótidos; Iões pesados.

ABSTRACT

The purpose of this work was to study polymer modified electrodes containing free functional groups with DNA affinity and to evaluate the capacity of the immobilized biomolecules for the detection of heavy metal ions (Zn^{2+}).

The monomers 5-Amino-1-Naphthol (AN) and Thionine (TN) were investigated and their systematic study allowed to select the electropolymerisation conditions suitable to the objective of the work.

Potentiodynamic electropolymerisation of AN in acidic media yielded films with good electroactivity and stability in this media. However, due to the weak electroactivity observed in neutral media, its use in the present study was not possible.

The electroactivity of the synthesised polythionine (PTN) films in acidic medium depends on the experimental conditions. For the potentiostatic polymerisation the higher electroactivity has been achieved with the increase of the polarisation time and potential. Potentiodynamically, an increase of electroactivity was obtained for the film grown with 80 potential cycles at 20 mV s^{-1} between 0 and 1150 mV vs. SCE (PTN 80/20). Cyclic voltammetric and electrochemical quartz crystal microbalance (EQCM) studies revealed structural changes during electropolymerisation that were corroborated by atomic force microscopy (AFM). The redox behaviour of PTN films in different media and in a wide range of pH values was investigated; stability has been evaluated in biological compatible media and it was verified that electroactivity is affected by the nature and pH of the solution.

By EQCM studies it was observed different mass changes with the film thickening and solution pH; the results suggest the contribution of distinct mechanisms, depending on the pH of the solution.

Free amino functions in the polymer structure enabled the nucleotides, dGTP e dG20-P, immobilisation onto the modified electrode – PTN 80/20 – which was enhanced by the presence of coupling agents *N*-hydroxysuccinimide (NHS) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide (EDC).

Due to the metal ions affinity to DNA their electrochemical detection was possible in the PTN modified electrodes with ds-ADN.

Keywords: 5-Amino-1-Naphthol; Thionine; Electropolymerisation; Electrochemical quartz crystal microbalance; Atomic force microscopy; Scanning electrochemical microscopy; Nucleotides immobilisation; Heavy ions.

Índice

Capítulo 1 – Introdução	1
1.1. Polímeros Condutores	2
1.2. Poli(5-Amino-1-Naftol)	4
1.3. Poli(Tionina)	6
1.4. Imobilização e Hibridação	11
1.5. Interação do ADN com Metais Pesados	13
Capítulo 2 – Parte Experimental	19
2.1. Reagentes	20
2.2. Técnicas Utilizadas	21
2.2.1. Microbalança Electroquímica de Cristal de Quartzo – MECQ	21
2.2.2. Microscopia de Força Atómica	23
2.2.3. Microscopia de Varrimento Electroquímico	24
2.3. Equipamentos	26
2.4. Eléctrodos e células	27
Capítulo 3 – Síntese e Caracterização do Poli(5-Amino-1-Naftol)	31
3.1. Electropolimerização	32
3.2. Caracterização Electroquímica do Eléctrodo Modificado	35
Capítulo 4 - Síntese e Caracterização da Politionina	41
4.1. Electropolimerização da Tionina em meio ácido	42
4.1.1. Electropolimerização Potenciostática	43
4.1.2. Electropolimerização Potenciodinâmica	45
4.2. Caracterização do Eléctrodo Modificado	51
4.2.1. Comportamento redox de filmes de PTN em meio ácido	52
4.2.1.1. Efeito do Modo e Condições de Crescimento	53
4.2.1.2. Efeito da Natureza do Substrato	55
4.2.1.3. Efeito da Espessura dos Filmes	56
4.2.2. Comportamento redox de filmes de PTN em meios biológicos	57
4.2.3. Efeito do pH no comportamento electroquímico do PTN	58

4.2.4. Participação iónica na conversão redox da PTN	61
4.2.5. Caracterização morfológica da PTN por MFA e MEV	65
4.2.6. Caracterização dos eléctrodos modificados por MVE	68
Capítulo 5 - Propriedades do eléctrodo modificadop com PTN	76
5.1. Comportamento na presença de espécies electroactivas em solução	77
5.2. Imobilização de nucleótidos dGTP e dG20-P no eléctrodo modificado	81
5.3. Interação e detecção de metais pesados	87
Capítulo 6 – Conclusões	90
Referências bibliográficas	94

Capítulo I

|ntrodução

1.1. POLÍMEROS CONDUTORES

Os polímeros condutores têm sido alvo de intensa investigação devido à sua potencial aplicabilidade em áreas como a catálise, a construção de dispositivos electrónicos e no desenvolvimento de sensores e biosensores [1]. A capacidade para facilitar a transferência electrónica e a versatilidade e sensibilidade que apresentam, têm atraído muito interesse ao uso de polímeros condutores, nomeadamente o polipirrolo, o politiofeno e a polianilina, como matrizes para a imobilização de biomoléculas [2, 3].

Os polímeros podem ser preparados tanto por via química como electroquímica. Esta última é preferível uma vez que o controlo do potencial é uma pré-condição para a obtenção do material com as características desejadas directamente sobre o eléctrodo que funciona como ânodo durante a síntese, uma vez que, a reacção de polimerização é, em geral, oxidativa [1]. Vários métodos electroquímicos são apropriados para a preparação e estudo de polímeros condutores, nomeadamente, técnicas de impedância, impulso de potencial e corrente, métodos galvanostáticos, potenciostáticos e potenciodinâmicos. Este último permite observar a formação do polímero condutor, pelo aumento de corrente em cada ciclo, no intervalo de potencial da sua conversão redox e, assim, obter informação sobre a velocidade de crescimento [4].

Em geral, os polímeros são obtidos no estado oxidado, condutor, e incorporam contra-íões da solução em que são preparados, para compensação de carga. A variação da composição da solução, *e.g.* pH ou presença de espécies dadoras de electrões, pode provocar alterações na condutividade do polímero [1]. É largamente aceite que o mecanismo da polimerização envolve um primeiro passo de oxidação dos monómeros com a formação de catiões-radicais; estas espécies, altamente reactivas, dimerizam e o crescimento das cadeias prossegue via associação de radicais ou associação do radical com uma molécula de monómero neutro. A eficiência deste processo depende das condições experimentais de reacção, designadamente composição da solução, pH, temperatura, potencial ou velocidade de variação de potencial, densidade de corrente e estado da superfície do eléctrodo. Reacções de dimerização paralelas, podem conduzir a diferentes produtos e/ou estruturas. Geralmente, a oxidação dos monómeros é um processo irreversível e ocorre a valores de potencial mais elevados que a reacção redox do polímero, pois os sistemas conjugados, como é o caso dos polímeros, são oxidados e reduzidos mais facilmente que os seus precursores

monoméricos [4]. A cinética da electropolimerização depende dos mesmos factores acima referidos, sendo os efeitos do material e das propriedades da superfície do eléctrodo mais pronunciados. A densidade do filme polimérico formado diminui com o aumento da espessura; a sua morfologia é fortemente influenciada pela composição da solução, especialmente, pela natureza dos contra-íões [5].

O mecanismo que permite a condução eléctrica nestes materiais mostra que esta propriedade é influenciada por vários parâmetros, tais como o comprimento das cadeias, o comprimento da conjugação e a transferência de carga para moléculas adjacentes [2]. É, pois, da maior importância o controlo e optimização das condições de electropolimerização, para evitar a formação de materiais mistos, electroquimicamente activos e condutores e inactivos e isoladores.

Diversas técnicas electroquímicas, ópticas ou combinadas têm sido usadas na caracterização dos filmes de polímeros electroactivos, na determinação das velocidades de carga e descarga, dos processos de transporte de carga e transferência de carga, merecendo particular relevo a espectroscopia de impedância electroquímica [6], a microgravimetria piezoeléctrica na microbalança electroquímica de cristal de quartzo (MECQ) [7-9], a deflexão de feixe laser (efeito de miragem) [10], a espectroscopia de infra-vermelho [10, 11] e a elipsometria [12-14].

A presença de grupos funcionais livres na estrutura dos polímeros permite, para além da existência de uma carga positiva deslocalizada no filme no seu estado oxidado, a possibilidade de existência de locais preferenciais para que ocorram interacções com moléculas em solução. Os grupos funcionais podem ser introduzidos por modificação química, *a priori*, dos monómeros ou *a posteriori*, do polímero. Existem também monómeros que já contêm os grupos funcionais desejados, figura 1.

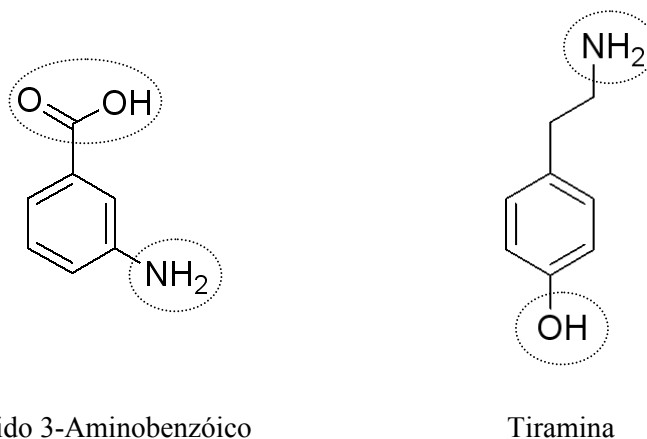


Figura 1 - Representação esquemática de monómeros funcionalizados.

Os compostos aromáticos que contêm grupos -NH_2 e/ou -OH têm recebido especial atenção, devido à funcionalidade conferida e à grande estabilidade dos polímeros a que dão origem, quer em contacto com o oxigénio quer em solução [15].

1.2. POLI(5-AMINO-1-NAFTOL)

O 5-amino-1-naftol faz parte do grupo de compostos orgânicos aromáticos que tem sido usado na modificação de eléctrodos por electropolimerização em diversos meios, orgânicos e aquosos (ácido e alcalino). Recorrendo a diferentes metodologias as propriedades electroquímicas, eléctricas e espectroscópicas dos filmes de poli(5-amino-1-naftol) (PAN) encontram-se largamente reportadas (espectroscopia de ultra-violeta – visível [15], raman [16,17], infra-vermelho com transformada de fourier [10, 15, 18], elipsometria [19], microscopias de força atómica (MFA) [7, 18] e electrónica de varrimento (MEV) [15], espectroscopia fotoelectrónica de raio-X (EFRX) [20], efeito de miragem (EM) [10], microbalança electroquímica de cristal de quartzo (MECQ) [7, 19] e voltametria [7, 18]).

O monómero 5-amino-1-naftol, cuja estrutura é representada na figura 2, contém dois grupos funcionais e dependendo do pH e do meio electrolítico [18] pode ser polimerizado selectivamente através de qualquer deles. Em meio alcalino, a polimerização ocorre via grupo -OH enquanto que em meio orgânico ou ácido aquoso ocorre via grupo -NH_2 , permitindo a presença de grupos -OH livres na estrutura do polímero; torna-se, assim, possível a interacção com outros grupos funcionais, nomeadamente na protecção contra a corrosão como é referido por Meneguzzi *et al.* [18] ou com biomoléculas, atendendo à conhecida possibilidade de interacção do ADN, através do seu grupo fosfato terminal, com grupos -OH [21].

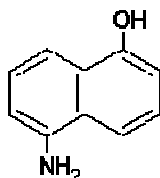


Figura 2 - Monómero 5-Amino-1-Naftol.

Vários estudos sugerem que o polímero assim formado apresenta uma estrutura semelhante à da polianilina [17, 18], podendo coexistir com uma outra estrutura em escada, representadas na figura 3 - a e b, respectivamente. A ocorrência desta segunda estrutura,

resultante do acoplamento *orto* dos anéis aromáticos [16], causa defeitos na cadeia polimérica e resulta em alterações drásticas das suas características físicas e químicas, afectando o tamanho da cadeia e a sua electroactividade [7].

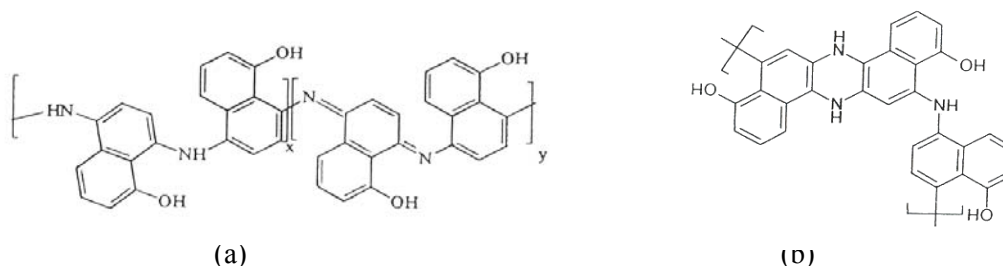


Figura 3 – Estrutura do polímero (a) tipo-polianilina [17, 18]; (b) em escada [16].

Ohsaka *et al.* [15] investigaram o efeito do pH no mecanismo redox do poli(5-amino-1-naftol) numa gama alargada de valores de pH (1-13) e verificaram que existe uma forte dependência do pH: o processo é reversível excepto na região de pH neutro (5-7), onde a electroactividade é fraca; para valores de pH entre 1 e 5, a variação do potencial formal, $E^{\circ'}$, com o pH indica que na oxidação e redução do polímero os electrões e protões envolvidos estão na proporção de 1:1, enquanto que para valores de pH entre 8-13 os protões e electrões envolvidos estão na proporção de 2:1. Para meio aquoso ácido Barbero *et al.* [10], com base num estudo realizado por efeito de miragem e espectroscopia de infra-vermelho, igualmente propõem o mecanismo representado na figura 4, para o processo redox do poli(5-amino-1-naftol) em meio aquoso ácido.

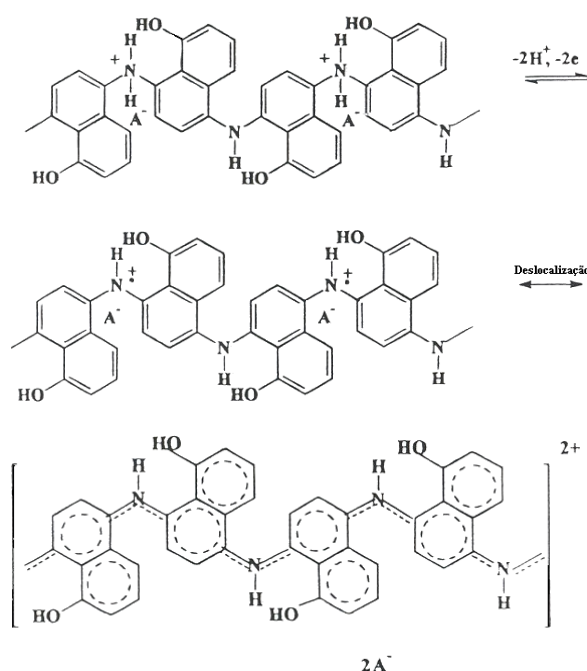


Figura 4 – Comportamento redox do poli(5-amino-1-naftol) em meio ácido aquoso, mecanismo proposto por Barbero *et al.* [10].

O poli(5-amino-1-naftol) tem sido também estudado com vista à protecção contra a corrosão de aço [18] e ao desenvolvimento de sensores de glucose [19].

1.3. POLI(TIONINA)

Em geral, todos os derivados das fenazinas, fenoxazinas e fenotiazinas que contêm um grupo amina dador de electrões ou grupos hidróxilo e pelo menos uma posição *orto* ou *para* não substituída para o acoplamento podem polimerizar, por um mecanismo semelhante ao da polianilina, formando uma ponte -NH- entre duas unidades de monómero através da ligação a um átomo de carbono em posição *orto* em relação ao substituinte amina, -NH₂, do anel do sistema aromático do monómero. A reacção de polimerização ocorre a potenciais elevados, antes da evolução do oxigénio, através da formação de um radical-catião [11, 22], por perda de um protão. Este dimeriza dando origem a dímeros isómeros, dependendo do átomo de carbono atacado [11, 22].

A oxidação do monómero é um processo irreversível que ocorre a potenciais positivos mais elevados que a reacção redox reversível do polímero, como já foi referido [1]. Porém, no caso das azinas a reacção redox reversível do monómero ocorre a potenciais menos positivos; a reacção de polimerização dá origem a um filme cuja conversão redox ocorre na mesma zona de potencial [11, 22].

A tionina, ou acetato de 3,7-diamino-5-fenotiazina, é um derivado da fenotiazina contendo três anéis aromáticos em que o anel central é heteroaromático, com um átomo de azoto e um de enxofre, e dois grupos amina nos anéis laterais, nas posições 3 e 7, como representado na figura 5.

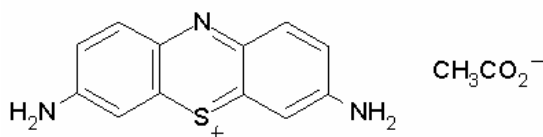


Figura 5 – Representação da molécula de tionina sob a forma de acetato de tionina [11].

Este monómero tem-se revelado um material promissor para a modificação da superfície de eléctrodos, onde tem sido usado tanto por formação de monocamadas [23-26], como por polimerização [12-14, 27-30]. Pode ser polimerizado métodos potenciodinâmicos

em meios ácido [8, 12-14, 28, 29, 31], neutro [25-27, 30] e ligeiramente alcalino [11, 22, 26], em substratos de ouro [11, 24-26, 28, 29, 31, 32], platina [12, 13, 23], carbono [14, 27, 30] e óxido de estanho [29]. As propriedades electroquímicas, eléctricas e espectroscópicas dos filmes de politionina têm sido caracterizados por diversas técnicas, tanto electroquímicas (voltametria cíclica e cronoamperometria), como espectroscópicas, microscopia electrónica de varrimento, microbalança electroquímica de cristal de quartzo e elipsometria, em meio aquoso quer ácido quer ligeiramente alcalino, apresentando um comportamento electroactivo e estável.

A politionina, PTN, tem sido usada no desenvolvimento de biosensores catalíticos por imobilização de enzimas por “*cross-linking*” [30] ou recorrendo a membranas de Nafion [27].

À semelhança do proposto para outras azinas, a electropolimerização da tionina tem sido descrita por um mecanismo semelhante ao da polianilina [11, 22, 33]. Hamnett *et al.* [13] sugerem que a deposição do filme de politionina em platina ocorre em dois passos distintos, sendo o primeiro a substituição das moléculas de monómero (tionina) reversivelmente adsorvidas na superfície por uma camada de óxido de platina e o segundo a deposição do filme de politionina sobre a camada de óxido de platina, que se mantém durante redução do filme, passo muito mais lento e controlado por difusão na fase inicial de crescimento do filme. Por outro lado, Lee *et al.* [14] atribuem o lento crescimento do filme, num eléctrodo de carbono vítreo, a uma baixa velocidade de transporte de carga no polímero, uma vez que a lentas velocidades de varrimento de potencial as curvas voltamétricas são melhor definidas. Assim sendo, o crescimento do filme de politionina não se apresenta uniforme no tempo.

Para Saez *et al.* [28] os anéis aromáticos da PTN, tanto na forma oxidada como reduzida, estão quase paralelos à superfície do eléctrodo. Na forma reduzida há perda de conjugação e o átomo de azoto do anel heteroaromático é protonado. Para estes autores, o filme formado em meio ácido por varrimento de potencial apresenta uma coloração púrpura escura; para outros [27] o filme de politionina formado em superfícies de carbono vítreo em meio neutro apresenta uma coloração amarelo dourado.

Lee *et al.* [14] propõem que o polímero se comporta como um conjunto de unidades discretas com propriedades semelhantes às do monómero, nomeadamente, apresenta a conversão redox da tionina em leucotionina traduzida pela reacções representadas na figura 6-a e b, em meio ácido [14] e neutro [27], respectivamente.

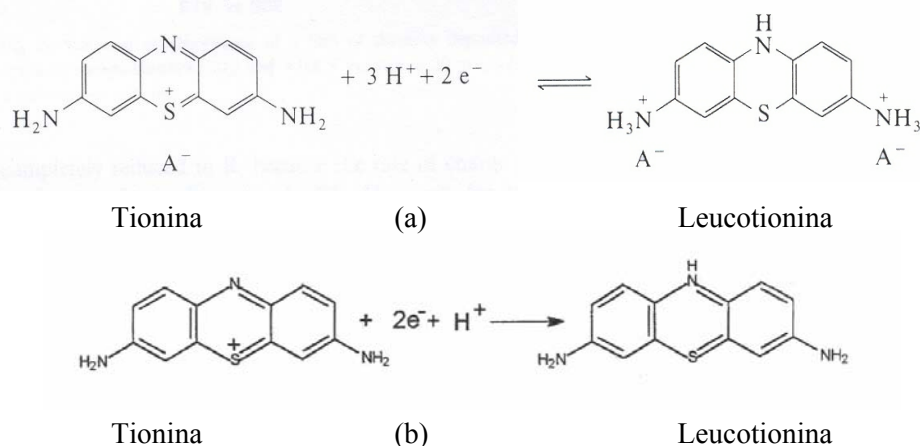


Figura 6 – Representação da conversão redox da tionina em meio a) ácido [14] e b) neutro [27].

Ainda que a estrutura da politionina não se encontre estabelecida, estudos espectroscópicos apontam para a existência de aminas secundárias em ponte entre duas unidades de monómero e para a presença de aminas primárias livres na estrutura do filme [11, 28, 33]. Hamnett *et al.* [13] propuseram a estrutura e conversão da politionina representadas na figura 7; na redução, a valores de pH ácido, dá-se o aumento de cargas positivas no filme, sendo necessária a entrada de mais contra-íons para a sua compensação.

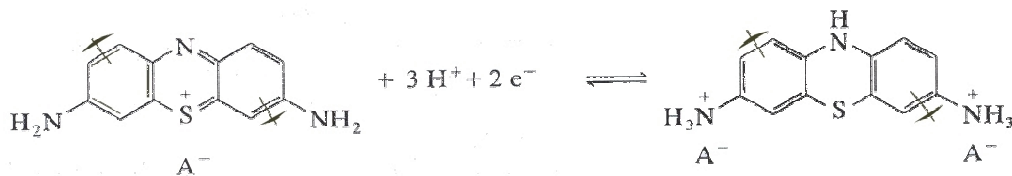


Figura 7 – Representação da estrutura da politionina e sua conversão redox em meio ácido proposta por Hamnett *et al.* [13].

A existência de mais do que um par redox na caracterização de filmes de polímeros electroactivos tem sido observada noutros sistemas, e.g. o poli(azul de metileno), referido por Schlereth *et al.* [11]. O processo que ocorre a valores de potencial mais positivo foi atribuído a modificações nos anéis aromáticos, que diminuindo o carácter dador do átomo de azoto, induz o deslocamento de potencial. O par redox a valores de potencial mais negativos deve-se, segundo Karyakin *et al.* [34], à conjugação tipo monómero também presente no polímero. Este tipo de conjugação pode ter origem na possibilidade de adsorção de moléculas de monómero no polímero através de ligações S-S. A formação destas ligações aumenta a densidade electrónica do sistema aromático, induzindo o deslocamento dos potenciais redox no sentido catódico. Karyakin *et al.* [34] referem, ainda, a hipótese de formação de ligações

tipo benzidina por acoplamento anel-anel no decorrer da polimerização de azinas que contêm grupos amina primários, à semelhança do que ocorre na polianilina. Ding *et al.* [35] sugerem também a possibilidade de os iões HO^- interagirem com a tionina (por ligações de hidrogénio e também electrostaticamente com os átomos de enxofre carregados positivamente).

A resposta redox da politionina depende do pH. Cai *et al.* [36] em estudos com filmes da família da politionina, verificaram que o potencial dos dois pares de picos observados se deslocam cerca de 60 mV/pH para valores de pH > 7,5 e cerca de 30 mV/pH para valores de pH < 7,5, o que indica que para valores de pH > 7,5 a razão entre protões e electrões envolvidos é de 1:2 e para valores de pH < 7,5 estarão envolvidos igual número de protões e electrões na conversão redox do filme. Filmes de politionina crescidos potenciodynamicamente em eléctrodos de carbono apresentam, em soluções com pH entre 6 e 8, uma diminuição de potencial de cerca de 55 mV/pH, de acordo com o valor Nernstiniano esperado para um processo envolvendo dois-electrões/dois-protões (59 mV) [27, 30].

Em estudos da politionina por MECQ, foi observado por vários autores [8, 31, 32, 37, 38], que as variações de massa ocorridas durante o processo redox do filme não eram justificáveis apenas com base no cumprimento dos requisitos da electroneutralidade e que o modelo permselectivo não pode ser aplicado a polímeros redox. Na análise dos processos redox da PTN em diferentes electrólitos [39], é necessário considerar a existência de pares iónicos e espécies solvatadas em solução, que constituindo uma fonte de contra-iões podem ser incorporados no polímero. As variações de massa observadas são assim influenciadas pela natureza e concentração do electrólito. De facto, os filmes de politionina parecem ser constituídos por apenas 50% em volume de polímero, sendo os restantes 50% de conteúdo em solvente e electrólito, em partes iguais, resultando uma espessura do filme pouco dependente do estado redox [8, 13]; o equilíbrio electrónico alcançado numa escala de tempo não garante que todas as espécies móveis tenham atingido os seus locais de equilíbrio, mas em meio ácido, devido à diferença de mobilidade entre os protões e os outros iões aqueles satisfazem os requisitos da electroneutralidade, imediatamente após a injeção de carga electrónica. A natureza especial do transporte protónico em água, parece ter um paralelo em polímeros electroactivos hidratados, como a politionina. Verificaram, ainda, que será maioritariamente o solvente que se deve mover de e para o interior do filme; esta transferência de solvente, não assistida por efeitos de migração, é lenta, depende da direcção e constitui o passo limitante da velocidade de conversão. Foi, ainda observado que, em meio ácido forte, as

curvas massa/potencial e carga/potencial não apresentam uma relação explícita e que, dependendo das condições experimentais (electrólito e sua concentração), espécies com cargas diferentes, atravessam a interface polímero/solução com direcções, independentes das suas cargas. A histerese observada nas curvas carga-potencial e massa-potencial indicam alguma complexidade cinética, nomeadamente o egresso de espécies é mais fácil do que o seu ingresso no filme [32, 38].

Todos estes factores contribuem para a heterogeneidade do polímero formado, podendo contribuir para que este apresente diferentes comportamentos, nomeadamente em termos de electroactividade.

Adsorção de Tionina em eléctrodos de Platina e Ouro

Svetlicic *et al.* [23] estudaram a adsorção de tionina e azul de metileno em superfícies de platina policristalinas, modificadas ou não com átomos de enxofre, em tampão fosfato. Estes autores verificaram que, para uma concentração superficial saturada em tionina, e concentração nula de enxofre na superfície, quase toda a superfície está bloqueada por moléculas de tionina adsorvidas (estas moléculas podem ser removidas por desadsorção oxidativa a potenciais superiores a + 400 mV *vs.* ESC) e que a resposta redox característica de moléculas de tionina não adsorvidas está ausente. À semelhança do que acontece no caso do azul de metileno, estes autores sugerem que as moléculas de tionina se encontram com orientação paralela à superfície em unidades de monómero ou dímeros e admitem que estão envolvidos dois electrões para efeitos de cálculo de cargas de sorção. Também, Clavilier *et al.* [24] estudaram a adsorção da tionina em superfícies de ouro policristalinas não modificadas e com uma monocamada de átomos de enxofre, em tampão fosfato. Estes autores concluíram que a tionina adsorvida em ouro é estável e que, na ausência de átomos de enxofre na superfície, a quantidade superficial de tionina é cerca de 45 % superior. Identificaram também dois processos de redução: o primeiro é um passo lento que corresponde à redução irreversível da tionina a leucotionina envolvendo dois electrões e em que leucotionina se difunde para a solução; o segundo correspondente à conversão reversível da tionina adsorvida em leucotionina que permanece na superfície. Clavilier *et al.* [24] propõem ainda que, a tionina adsorvida em superfícies de ouro tenha uma orientação “*end-on*” correspondente ao empacotamento mais eficiente das moléculas de tionina numa monocamada e que permite a interacção directa através dos grupos amina com a superfície de ouro. Porém, esta orientação

é considerada específica para a adsorção da tionina em superfícies de ouro; em todas as outras superfícies é admitido que a orientação da tionina é paralela, “*flat*”, à superfície excepto para superfícies de ouro ou platina modificadas com uma monocamada de átomos de enxofre onde a orientação se admite ser “*edge-on*”.

1.4. IMOBILIZAÇÃO E HIBRIDAÇÃO DE ADN

A imobilização de ADN numa matriz de um polímero condutor é possível por ligação covalente [40], adsorção, copolimerização ou imobilização na matriz do polímero durante a polimerização [41]. Este procedimento facilita a detecção do sinal electroquímico (amperométrico ou potenciométrico) gerado pela reacção electroquímica de moléculas que interactivam com o ADN, além de que permite a detecção e monitorização electroquímica da hibridação [2].

A imobilização do ADN na matriz do polímero durante o seu crescimento, embora seja mais permanente, cria barreiras estéricas e cinéticas à hibridação [41]. A actividade das moléculas imobilizadas é afectada pela área da superfície, porosidade, carácter hidrofílico da matriz, condições de reacção e metodologia seleccionada para a imobilização [2]. A imobilização por acoplamento covalente permite manter a totalidade da actividade biológica do ADN, incluindo a capacidade de hibridação e bioafinidade. As sequências de ADN são ancoradas através de um dos seus grupos terminais e suspensas da superfície. Este método necessita da existência de grupos funcionais apropriados na superfície, que podem ser obtidos por modificação química da superfície *a posteriori* ou pelo uso de polímeros que já contêm grupos funcionais livres na sua estrutura [42, 43]. Requer ainda a activação do ADN para que se estabeleça a ligação covalente [21]. Para a imobilização por ligação covalente, têm sido usados os agentes acoplantes *N*-Hidroxysuccinimida (NHS) e o *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) [21, 42, 44] que permitem o acoplamento covalente entre os grupos fosfato dos nucleótidos, activados pelos agentes NHS/EDC, e grupos amina livres na estrutura do polímero ou entre os grupos amina das bases do ADN e grupos carboxílicos no polímero. O EDC é um derivado solúvel da carbodiimida que catalisa a formação de ligações amida entre grupos fosfato (ou ácidos carboxílicos) e aminas, activando o fosfato pela formação de um derivado *o*-ureia. Este derivado reage rapidamente com nucleófilos, como aminas. O NHS é frequentemente usado com o EDC para assistir a reacção de acoplamento da carbodiimida e

produzir um intermediário activo mais estável. Neste caso o intermediário formado é um éster que reage com os grupos amina dando origem à formação da ligação fosfato-amina (ou amina-ácido carboxílico).

Zhao *et al.* [21] estudaram a imobilização do ADN em eléctrodos de ouro modificados por monocamadas de tióis com diferentes grupos funcionais (-OH, -NH₂ e -COOH). Concluíram que, tanto a quantidade de ADN imobilizado como o grupo terminal do ADN responsável pela imobilização, é fortemente influenciada pelo grupo funcional da monocamada, figura 8.

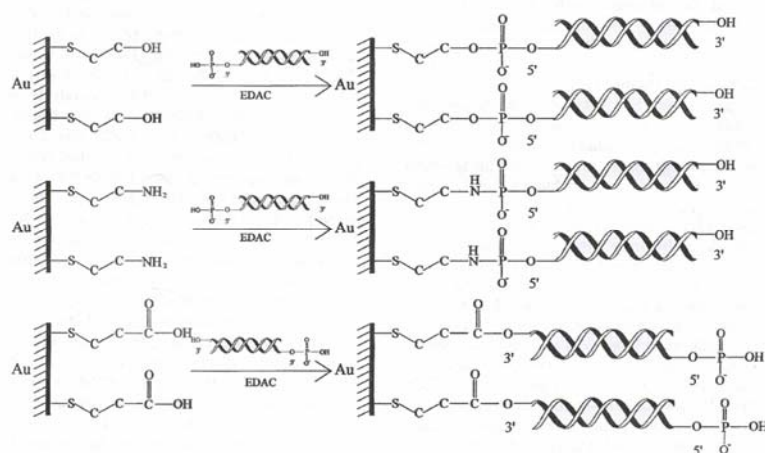


Figura 8 – Representação esquemática da imobilização de ADN em monocamadas com diferentes grupos terminais [21].

O método de imobilização por adsorção é o mais simples, não requer reagentes ou modificações do ADN; permite o uso de diversos materiais para a imobilização, como metais (Au, Pt), óxidos metálicos de Pd e Al, pasta de carbono e polímeros. Podendo adsorver por múltiplos locais a orientação das sequências de ADN é variável e difícil de controlar, de que resulta uma baixa eficiência de hibridação e a sua eventual desorção da superfície durante o processo [45].

A adsorção sob potencial aplicado apropriado aumenta a estabilidade da sonda de ADN imobilizada através da atracção electrostática estabelecida entre a superfície positivamente carregada e a estrutura açúcar-fosfato com carga negativa, permitindo que as bases fiquem orientadas para a solução. A adsorção em eléctrodos modificados com polímeros condutores tira partido do facto de no seu estado oxidado estes possuírem uma carga positiva deslocalizada, atraindo electrostaticamente os grupos fosfato com carga negativa do cs-ADN (ADN de cadeia simples) [41, 46]. No entanto, a variação do potencial de eléctrodo no sentido catódico pode conduzir à desorção.

Outra abordagem possível, é a existência na estrutura do polímero, de grupos funcionais livres, apropriados, que favoreçam a interação com os grupos terminais das sequências de ADN. Têm sido usadas partículas de poli(p-clorometilostireno) modificadas com polietilenimina que contêm grupos amina livres permitindo a imobilização na sua superfície através da interação com os grupos fosfato do ADN [47].

Vários factores determinam a eficiência e cinética da adsorção: natureza do anião do electrólito, pH da solução, tipo e força iónica do tampão usado e comprimento e sequência do ADN [41].

As detecções da imobilização e da hibridação têm sido conseguidas através de vários métodos (ópticos, electroquímicos, MCQ e MVE). Em grande parte a análise é indirecta, recorrendo a indicadores ópticos e electroquímicos [40, 44, 45, 48-52]. A detecção electroquímica directa, pode ser conseguida através do sinal anódico, específico, da oxidação da guanina [51], que base púrica com maior reactividade [45, 48]. O sinal electroquímico diminui na presença da sequência complementar porque, após hidridação, as bases ficam no interior da dupla hélice e o sinal é obstruído por efeitos estéricos dos açúcares. Por MVE têm sido usadas várias metodologias, como o uso de indicadores redox, analisando o resultado das interações e também através do sinal electroquímico de oxidação da guanina promovida por complexos de ruténio [53-55].

1.5. INTERACÇÃO DO ADN COM METAIS PESADOS

O número crescente de poluentes potencialmente perigosos no ambiente, requer o desenvolvimento de técnicas analíticas rápidas e efectivas para serem usadas em programas de monitorização extensivos. Face aos requisitos de tempo e custo dos métodos analíticos tradicionais, os biosensores surgem como uma ferramenta analítica alternativa ou complementar. A sua principal vantagem em relação a outros tipos de sensores é a especificidade de resposta e em alguns casos a capacidade para operar em ambientes complexos. Oferecem a possibilidade de determinar não só espécies químicas mas também os seus efeitos biológicos e a biodisponibilidade [56].

Um biosensor representa uma combinação sinérgica de biotecnologia e microelectrónica; consiste num biocomponente (material biológico) em contacto íntimo com um transdutor compatível que converte o sinal bioquímico num sinal eléctrico quantificável [57]. As biomoléculas são responsáveis pelo reconhecimento específico do analito enquanto

que o transdutor físico-químico fornece um sinal eléctrico que é amplificado pela componente electrónica [57].

Diversas configurações, nomeadamente em termos de elementos de biorreconhecimento (e. g. células, enzimas, anticorpos, proteínas ou ADN) e tipos de transdutores (e. g. potenciométricos, amperométricos, ópticos, conductimétricos, espectrofotométricos) têm sido descritas na literatura [58]. Embora os biosensores surjam muito frequentemente aplicados à detecção de moléculas orgânicas e biológicas, a investigação relativa à sua aplicação na detecção de metais é ainda insipiente [59].

Desde a descoberta da actividade electroquímica dos ácidos nucleicos por Palecek no final dos anos 50 [60], que se observa grande progresso, no desenvolvimento de biosensores electroquímicos de ADN, com base no conceito dos eléctrodos quimicamente modificados [56, 61, 62]; a discriminação de interacções do ADN, ligado à superfície do transdutor, em relação a espécies a analisar despertou interesse em diversas áreas [61]. Estes sensores associam a sensibilidade de detecção com a elevada especificidade das biomoléculas, permitindo o desenvolvimento de modernos métodos de análise de espécies que interactuam com o ADN, incluindo os tóxicos, em meios ambientais e biológicos [63].

Os metais pesados são uma causa séria de poluição. Mesmo em baixas concentrações constituem uma ameaça para o ambiente e para a saúde humana porque são não-biodegradáveis e são retidos pelos sistemas ecológicos [57]. Chumbo, crómio, cádmio, cobre, zinco e mercúrio são os contaminantes metálicos mais frequentemente detectados [57]. O reconhecimento dos efeitos tóxicos de concentrações mínimas de metais pesados resultou em regulamentos para a redução da sua presença no ambiente para níveis muito baixos. A consciência ambiental está em crescimento entre consumidores e industriais enquanto que restrições legais às emissões se tornam mais restritivas. Existe uma necessidade premente no que respeita ao desenvolvimento de tecnologias para o tratamento de águas residuais e para a monitorização ambiental de metais pesados que afectam de modo adverso a saúde humana [57]. A detecção e quantificação de metais pesados em amostras reais, entre elas as biológicas, reveste-se de elevada importância, nomeadamente no diagnóstico clínico [63]. Os metais pesados têm grande afinidade para com o ADN e estão na origem da mutagénese e carcinogénese: a formação de tumores malignos está relacionada com o aumento da concentração de metais pesados nas células tumorais [63]; por exemplo, o cádmio inibe o processo de reparação do ADN e um dos sintomas é o desenvolvimento de tumores. Existem grandes expectativas nos sensores de ADN para a monitorização e/ou remoção de iões metálicos, *in situ* e em tempo real, em áreas como a monitorização ambiental, biologia,

toxicologia clínica, tratamento de águas residuais e monitorização de processos industriais [64].

As técnicas analíticas clássicas para a análise de metais incluem a espectrometria de absorção atómica e de massa, espectrofotometria de UV-vis e espectroscopia de absorção de raios-X [57-59, 64]. Estas técnicas, embora altamente fidedignas e rápidas, apresentam custo elevado, necessidade de operadores treinados e de transporte da amostra do local da recolha para o laboratório [57, 64]. Para além disso, a base biológica dos biosensores torna-os ideais para a análise toxicológica dos metais pesados, permitindo quantificar as concentrações biodisponíveis, enquanto que as técnicas convencionais apenas permitem determinar concentrações totais ou a concentração labil [57-59, 64]. Assim, biosensores capazes de reagir selectivamente apenas com a fracção de iões metálicos disponíveis, ou especificamente com um dado ião metálico, apresentam as vantagens da especificidade, baixo custo, uso fácil, portabilidade e a possibilidade de fornecerem sinal continuamente e em tempo real [57]. Recentemente têm sido desenvolvidos, biosensores baseados em ADN catalítico, células e enzimas e com detecção por fluorescência e luminescência [56, 59, 64].

A ligação de iões metálicos ao ADN pode ocorrer de dois modos: i) por ligação difusa em que os iões permanecem completamente hidratados e interagem electrostaticamente com a cadeia de ADN de modo não-específico, como no caso dos iões monovalentes (e.g. Na^+) ou para baixas concentrações de iões divalentes (e.g. Zn^{2+} e Mg^{2+}); ii) por ligação específica com iões divalentes em maior concentração ou iões multivalentes. Neste caso, a interacção estabelece-se numa zona de elevado potencial electrostático ou com sequências ou bases capazes de estabelecer ligações de coordenação com os iões metálicos [65].

Usando soluções com pH aproximadamente neutro, Zhao *et al.* [66] estudaram a acumulação de metais pesados, em partículas de polissulfona (PSf) com ADN imobilizado na sua superfície, tendo verificado que os iões Zn(II) , Cu(II) , Cd(II) , Pb(II) e Ag(II) se acumulam nessas partículas, os dois últimos em maior extensão, enquanto que a acumulação de Mg(II) não ocorre, independentemente do contra-ião do sal.

O estudo do ADN de cadeia simples (cs-ADN) imobilizado numa membrana, realizado por Babkina *et al.* [63] mostrou que a não existência de ligações de hidrogénio intramoleculares permite que os locais para o estabelecimento de ligações estejam mais disponíveis, tornando o cs-ADN num ligando mais efectivo para a complexação de metais pesados. Iões metálicos, como os de Fe(III) , Pb(II) e Cd(II) , apresentam elevada afinidade para o ADN [63] e a sua adsorção química deve ocorrer por formação de ligação covalente durante a complexação com o cs-ADN imobilizado, o que permite obter resultados

reprodutíveis. Neste caso, as forças de ligação variam na ordem $\text{Pb(II)} > \text{Fe(III)} > \text{Cd(II)}$, o que confirma a afinidade do Pb(II) não só por bases púricas (adenina (A) e guanina (G)) como por pirimídicas (timina (T) e citosina (C)). Aqueles autores sugerem ainda que os iões metálicos se podem ligar ao ADN por efeito quelante através do átomo N(7) da purina e o átomo de oxigénio do grupo fosfato; formação de ligação coordenada com o átomo N(7) da G e raramente da A; no cs-ADN pode ainda ocorrer ligação intra-cadeia por efeito quelante entre os átomos N(7) e O(6) da G e formação de ligações intra-cadeia com os átomos N(7) da G levando a uma elevada estabilidade do complexo [63], figura 9.

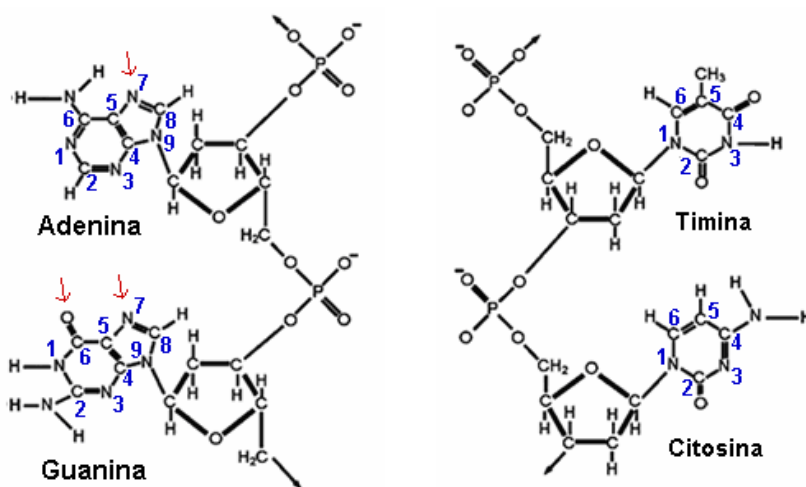


Figura 9 – Representação esquemática de cs-ADN e indicação das posições de interacção com os iões metálicos.

A renovação do biosensor pode ser obtida por adição de EDTA (etilenodiaminatetracetato), cujos complexos com os metais apresentam maior estabilidade do que com o ADN [63].

A formação de complexos entre iões metálicos, nomeadamente Zn(II) , Cd(II) , Ni(II) , Co(II) , Mg(II) e Ca(II) e sequências de ADN de cadeia dupla (cd-ADN), foi estudada por vários autores [65, 67, 68].

O cd-ADN, representado na figura 10 - a, pode assumir diferentes conformações dependendo da sua sequência e das condições ambientais dominantes. A conformação M-ADN corresponde à ligação não-covalente a iões metálicos divalentes específicos, e. g. Zn(II) , Ni(II) e Co(II) , a valores de pH superiores a 8,0 [67, 69], como se ilustra na figura 10 - b para o Zn(II) . O comprimento do ADN parece não afectar a eficiência da conversão do cd-ADN em M-ADN, mas dependendo do seu conteúdo em GC (guanina-citosina) e na repetitividade ou aleatoriedade da sequência [67], algumas sequências formam Zn(II) M-ADN a valores de pH inferiores.

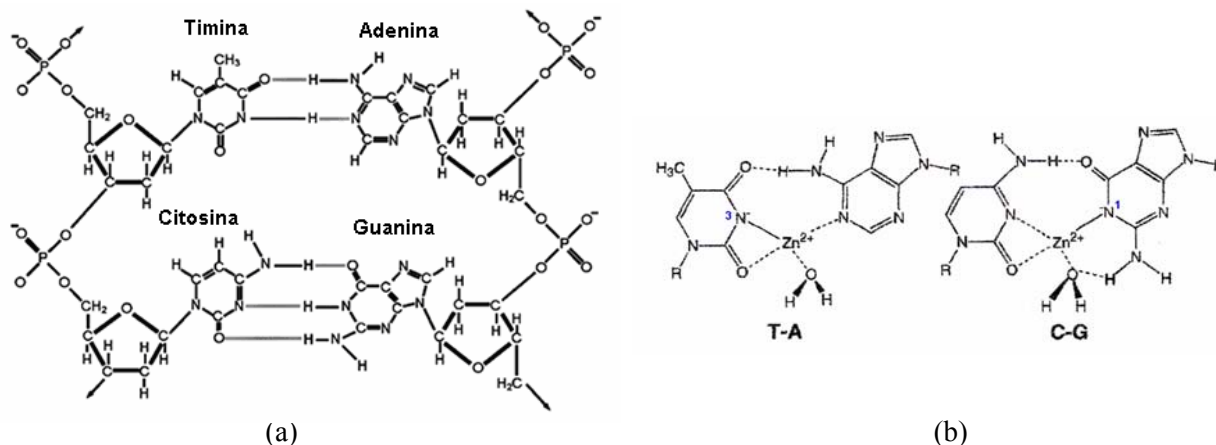


Figura 10 – Representação esquemática de (a) cd-ADN e (b) M-ADN [65].

A formação do M-ADN a valores de pH elevados deve envolver a substituição de prótons imino nas posições N(1) e N(3) das bases G (pK_a 9,4) e T (pK_a 9,9), respectivamente (figura 10), como sugere quer o desaparecimento dos prótons imino dessas bases nos espectros de ^1H -RMN; quer a diminuição do pH na adição do metal ao ADN a pH 8,5 [69].

Embora não seja possível a formação de M-ADN em cs-ADN, podem formar-se *loops* intra-moleculares com a substituição de prótons imino por iões metálicos [65, 67, 69] e ocorrerem interacções electrostáticas entre os iões metálicos e os fosfatos [70].

A formação de M-ADN pode ser revertida pela adição de EDTA ou diminuição do pH. Enquanto o ADN é considerado um semiconductor [67, 69, 70], o M-ADN apresenta condução tipo-metálica. Wood *et al.* [65] verificaram que a formação de M-ADN a pH 8,5 com iões Zn(II) é um processo endotérmico.

A pH 8,5 o cd-ADN desnatura na presença de Cd(II) o que não acontece para Zn(II) ou Ni(II) . A formação de M-ADN é dependente da concentração do ião metálico e do pH da solução: para o Ni(II) e Zn(II) , a pH = 8,5 requer maior concentração de Ni(II) , e não ocorre a pH 7,0 ou 7,5; não se dá, a qualquer pH, com Mg(II) ou Ca(II) [67, 70].

A transferência electrónica através do M-ADN pode ser monitorizada directamente por métodos electroquímicos ou indirectamente por espectroscopia de fluorescência [69-71]. Li *et al.* [71] verificaram, num estudo electroquímico em monocamadas automontadas de cd-ADN, que a velocidade de transferência electrónica entre espécies electrocativas em solução ($\text{Fe(CN)}_6^{4-/3-}$) e a superfície do eléctrodo é superior nas monocamadas após formação de M-ADN com iões Zn(II) a pH 8,6, do que directamente em ouro nas mesmas condições. Uma vez que o cd-ADN tem uma estrutura negativamente carregada os estudos de transferência da carga, como a impedância electroquímica, requerem uma criteriosa escolha das sondas. É

necessário que as espécies electroactivas utilizadas em solução não interfiram com as determinações experimentais. As sondas positivamente carregadas como o $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ não serão recomendáveis porque podem interagir com o ADN criando um percurso alternativo para a transferência de carga; como a transferência deverá ocorrer através do ADN as sondas carregadas negativamente como o $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ não interagirão, sendo por isso as mais favoráveis para estes estudos [70]. Aich *et al.* [69] usaram sequências de ADN marcadas com fluoróforos cuja fluorescência é bloqueada em cerca de 95% após a formação de M-ADN com Zn(II) , Co(II) e Ni(II) ; a cinética de decaimento da fluorescência indica uma transferência electrónica rápida no M-ADN.

A detecção electroquímica dos iões metálicos acumulados no ADN pode ser efectuada recorrendo ao uso de espécies electroactivas em solução, pela detecção de complexos dos metais com EDTA ou pela redução dos próprios iões metálicos [63, 70]. A resposta da conversão redox de espécies electroactivas em solução aumenta na presença de M-ADN devido ao aumento da sua condutividade. A detecção por complexação com EDTA consiste na remoção dos iões metálicos acumulados no ADN com a quantificação do complexo M^{n+} -EDTA; de acordo com o reportado na literatura os limites de detecção variam entre $10^{-10} \text{ mol dm}^{-3}$ para o Pb(II) , $10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$ para o Cd(II) e $10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ para o Fe(III) [63]. Este método permite a detecção da presença simultânea de vários metais; a presença de iões de metais pesados como de Ni(II) , Co(II) e Zn(II) não interfere com a detecção de Pb(II) e Cd(II) devido aos potenciais de redução diferirem em mais de 200 mV [63]. A redução dos iões metálicos acumulados no ADN, à semelhança da electrodeposição metálica de zinco reportada na literatura [72], deve ocorrer a valores de potencial catódicos na zona de evolução de hidrogénio com formação de ZnH , ZnO e ZnOH . A formação de ZnO relaciona-se com o aumento do sobrepotencial que torna impossível a redução completa a Zn e o aumento local de pH pode favorecer a formação de ZnOH . A estabilização dos iões metálicos por interacção com o ADN deve requerer um sobrepotencial para a redução num efeito similar à presença de surfactantes nas soluções de deposição [72]. Deste modo, as interacções do ADN com os iões metálicos devem permitir a detecção destes através do sobrepotencial para a redução.

Na construção de biosensores de afinidade, que permitem o estudo de interacções entre o ADN e diferentes ligandos, tais como os metais pesados, a imobilização de ADN em eléctrodos modificados com polímeros, permitirá associar à selectividade do biosensor, uma maior resistência e estabilidade, adequadas à sua utilização em matrizes complexas, como as amostras ambientais.

Capítulo 2

Parte Experimental

2.1. REAGENTES

Na tabela 1 listam-se os reagentes usados, sem purificação adicional, no presente estudo.

Tabela 1 – Reagentes usados na preparação, caracterização e estudo das propriedades dos polímeros.

Reagente		MM / g mol ⁻¹	Fabricante
5-Amino-1-Naftol		159,19	Aldrich 97%
Acetato de Tionina		287,34	Fluka
HClO ₄		100,46	Riedel-de Haen 70% p.a.
H ₂ SO ₄		98,07	BDH AnalaR, 98%;
H ₃ PO ₄		98,00	Merck, p.a.
Na ₂ HPO ₄ anidro		141,96	Merck, p.a.
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O		137,99	Merck, p.a.
NaClO ₄ ·H ₂ O		140,46	ACROS Organics
Tris - HCl		157,6	Sigma Ultra, > 99 %
MES		195,2	Duchefa Biochemie, > 99 %
KCl		74,56	Merck, puriss.
K ₃ [Fe(CN) ₆]		329,26	Merck, p.a.
K ₄ [Fe(CN) ₆].3H ₂ O		422,41	Merck, puro
CoCl ₂ ·6H ₂ O		237,93	Merck, p.a.
1,10-fenantrolina		198,23	Merck, p.a.
2,2'-bipiridina		156,2	Merck, p.a.
Ru(NH ₃) ₆ .3Cl		309,61	Aldrich, 98%
H ₂ O ₂ 30% (m/v)		(100 vol.) 34,01	Panreac, p.a.
Nucleótidos	dGTP	(100 mM)	Invitrogen Technologies
	dG20-P	6941,0	
	dC20	6345,0	
	cs-ADN	100 mg mL ⁻¹	(600 - 1000 bp)
NHS		115,1	Sigma
EDC / EDAC		191,70	Sigma Ultra
20 × SSC		3 M NaCl + 0,3 M SSC	Invitrogen
ZnCl ₂		136,28	Merck, p.a.
ZnSO ₄ ·7H ₂ O		287,54	AnalytiCals, puro

Tris-HCl (Trizma Hydrochloride) - tris(hidroximetil)-aminoetano Hidroclórico; MES - ácido 2-morfolinoetanossulfônico; DSR4R - CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG CAC GGG GGG GTG TAG CAG TTA CCG GA; dGTP - 2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato; dG20-P - 20-mer desoxiguanosina-5' fosfato; dC20 - 20-mer desoxicitosina; NHS - N-hidroxisuccinimida; EDC - N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida; SSC – solução salina de citrate de sódio.

As soluções aquosas foram preparadas com água millipore MilliQ (18,2 MΩ cm) em material previamente lavado numa solução cromo-sulfúrica.

Para a electropolimerização e caracterização dos filmes de PAN e PTN as soluções foram desarejadas com uma corrente de azoto (pureza $\geq 99,999\%$) durante 15 minutos.

As soluções de MES contendo os agentes acoplantes, NHS e EDC, foram preparadas em ependorfs de 2 mL imediatamente antes de serem usadas. Os nucleótidos foram adicionados às soluções de imobilização na célula com o auxílio de uma microseringa (25 μ L).

Os complexos $\text{Co}(\text{bpi})_3^{2+/3+}$ e $\text{Co}(\text{fen})_3^{2+/3+}$ foram preparados através da adição de $\text{Co}\cdot\text{Cl}_2$ e 2,2'-bipiridina ou 1,10-fenantrolina, respectivamente, na razão de 1:3, directamente na solução.

Ao longo do texto, usa-se a seguinte nomenclatura para designar os filmes de poli(5-amino-1-naftol), PAN, e politionina, PTN: para os filmes crescidos potenciodinamicamente, PAN ou PTN n/v , onde n indica o número de ciclos de potencial e v a velocidade de varrimento de potencial; para os crescidos em modo potencioestático, PTN E/t , onde E indica o potencial anódico e t o tempo durante o qual ele é aplicado.

2.2. TÉCNICAS UTILIZADAS

2.2.1. Microbalança Electroquímica de Cristal de Quartzo – MECQ

Microbalança de Cristal de Quartzo, MCQ, baseia-se nas propriedades piezoelétricas que certos materiais exibem na presença de um campo eléctrico, sendo o quartzo o material piezoelétrico mais útil. Na MECQ, é usado um cristal de quartzo, sobre o qual foi depositada, uma camada de platina sobre uma camada de titânio por evaporação térmica do metal (“*sputtering*”), constituindo o eléctrodo, como se representa na figura 11. Um dos eléctrodos actua como parte do circuito oscilador, ficando exposto ao ar, e o outro como eléctrodo de trabalho da célula electroquímica, em contacto com a solução.

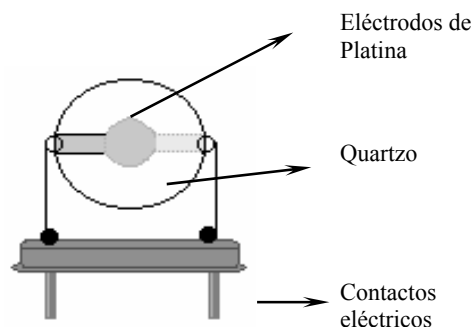


Figura 11 – Representação esquemática do eléctrodo usado na MECQ [73].

A relação entre as variações de massa na interface e de frequência de oscilação do cristal, é descrita pela equação de Sauerbrey [74, 75]:

$$\Delta f = \frac{-2 \Delta m n f_0^2}{A \sqrt{\rho_q \mu_q}} \quad (1)$$

onde Δf é a variação da frequência de oscilação (Hz), Δm a variação da massa interfacial (g), A a área activa do eléctrodo (cm^2), f_0 a frequência de oscilação fundamental da microbalança (Hz), μ_q o módulo de deformação do quartzo ($\text{g cm}^{-1} \text{s}^{-2}$) e ρ_q a densidade do quartzo (g cm^{-3}) indicando que uma diminuição de frequência é proporcional a um aumento de massa na interface. Para uma frequência fundamental de 5 MHz é possível obter uma sensibilidade de $18 \text{ ng cm}^{-2} \text{ Hz}^{-1}$.

A aplicação da equação de Sauerbrey pressupõe que a massa adicionada ou perdida na superfície do oscilador não sofre qualquer deformação durante a oscilação, o que se aplica a filmes finos e rígidos.

A MECQ, tem sido usada para diferentes estudos, nomeadamente electrodeposição [76], dissolução e corrosão de metais [77], adsorção [78], deposição e conversão redox de filmes poliméricos (politionina [8, 32, 37], polianilina [9, 79], politiramina [42, 43], polipirrol [9, 80-82]), imobilização de moléculas biológicas (ADN [80-83] e construção de biosensores [84]).

A aplicação da MECQ ao estudo do crescimento de filmes finos sobre a superfície do eléctrodo permite a determinação da massa depositada, do número de electrões transferidos durante o crescimento, e da velocidade de crescimento, e diferenciar possíveis mecanismos.

Quanto à caracterização da conversão redox desses filmes, é possível identificar o ganho e a perda de espécies (iões e solvente) e assim caracterizar o transporte de massa no filme [74].

2.2.2. Microscopia de Força Atômica

A técnica de Microscopia de Força Atômica (MFA) baseia-se no varrimento de uma ponta muito aguçada sobre a superfície de uma amostra (ou da amostra sob a ponta) através de um transdutor piezoelétrico, registrando-se um sinal em cada ponto da área analisada, resultante da interação estabelecida entre a sonda e a amostra. Na grande maioria das situações, o sinal medido é convertido em distância entre a sonda e amostra em cada ponto, obtendo-se informação topográfica da superfície analisada [85].

No caso da MFA a ponta é montada num braço (“cantilever”), que funciona como uma mola e é sensível a pequenas variações de forças resultantes da interação da ponta com a amostra. A deflexão do cantilever é proporcional à variação de força e depende da sua constante de mola (Lei de Hooke). A deflexão é geralmente detectada por técnicas ópticas (figura 12). Um feixe laser é incidido no “cantilever” e a sua reflexão é direccionada para um fotodíodo. Deste modo, os deslocamentos verticais da ponta, e logo a topografia da amostra são analisados com base nas diferentes intensidades recolhidas pelo fotodíodo.

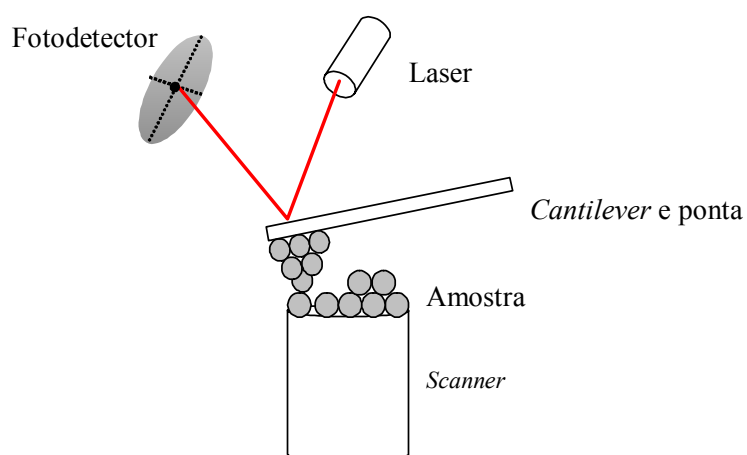


Figura 12 - Esquema de deflexão do feixe laser em Microscopia de Força Atômica.

Em MFA é comum considerar três modos distintos de funcionamento: *modo de contacto*, *modo intermitente* (“tapping”) e *modo de não-contacto*. O modo de contacto consiste no contacto permanente entre a sonda e a amostra, permitindo medir forças

interatómicas repulsivas, o que conduz à obtenção de imagens de elevada resolução em superfícies lisas e com alguma rigidez. No entanto, quando se pretende analisar materiais mais maleáveis e que são facilmente deformáveis pela ponta, como é o caso do presente estudo, utiliza-se muito frequentemente o *modo intermitente*. Neste caso, a ponta oscila a uma dada frequência (da ordem de KHz) com uma grande amplitude e contacta a superfície da amostra ao fim de um ciclo de oscilação. Quando forças de interacção ou gradientes de força são estabelecidas entre a ponta e amostra a amplitude da oscilação é atenuada. Este modo apresenta a possibilidade de fornecer informação adicional à topográfica, através das variações de fase do “*cantilever*” oscilante, devido à presença de materiais com propriedades distintas, tais como dureza e viscoelasticidade [86]. A operação em *modo de não-contacto* implica também a oscilação da ponta, a baixa amplitude e a uma certa distância (dezenas de nanómetros) da amostra, evitando-se o contacto. A ponta é sensível a forças de longo alcance, tais como interacções de Van der Waals, magnéticas, eléctricas que se reflecte na alteração da amplitude, fase ou frequência da oscilação e é utilizada para seguir a topografia da superfície em simultâneo com o registo de domínios magnéticos, eléctricos, etc., consoante o tipo de interacção.

Esta técnica tem sido usada na caracterização morfológica de polímeros como a polianilina [86] e o polibitiofeno [87].

2.2.3. Microscopia de Varrimento Electroquímico - MVE

Usada para a caracterização de sistemas à escala microscópica, a Microscopia de Varrimento Electroquímico, utiliza um ultramicroeléctrodo (UME), colocado numa posição fixa ou movendo-se na proximidade do substrato de interesse, em contacto com uma solução contendo espécies electroactivas [88], figura 13. A reacção de eléctrodo no UME (eléctrodo–ponta) dá origem a uma corrente, i_T , que é perturbada pelo substrato em análise (substrato–amostra) permitindo obter informação acerca da sua natureza, propriedades eléctricas e químicas e topografia [89].

A resolução das imagens de MVE depende fortemente do tamanho da ponta e da sua distância ao substrato [90]; a utilização de UME em forma de disco permite obter maior sensibilidade e uma corrente relativamente independente do raio do material isolador envolvente [91].

Em geral, a corrente, i_T , é controlada pelas reacções electroquímicas no eléctrodo-ponta e no substrato-amostra e é função da condutividade e natureza química deste e da distância ponta/substrato, d , como se ilustra na figura 14.

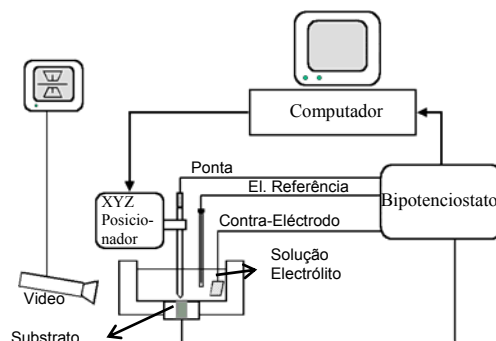


Figura 13 – Representação esquemática da montagem experimental do Microscópio de Varrimento Electroquímico [88].

Nesta técnica existem, fundamentalmente, três modos de operação [88]: (1) *Geração na ponta/Recolha no substrato* - GP/RS (Tip generation/Substrate collection - TG/SC), caso em que a ponta é usada para gerar a reacção que é detectada no eléctrodo-substrato; este modo é similar ao que ocorre no eléctrodo rotativo de disco e anel e é geralmente usado para o estudo de reacções homogéneas (estas provocam a diminuição de corrente no substrato porque as espécies electroactivas têm que se deslocar da ponta para o substrato). (2) *Geração no substrato/Recolha na ponta* - GS/RP (Substrate generation/Tip collection - SG/TC), modo em que a ponta detecta as reacções que ocorrem no substrato; em geral é usado para o estudo de reacções na superfície do substrato. (3) “*Feedback*”, que é o modo de operação mais frequentemente usado e onde apenas é monitorizada a corrente na ponta; como se ilustra na figura 14, estando a ponta afastada da superfície do substrato, a corrente, $i_{T,\infty}$, é controlada pelo fluxo hemisférico de espécies da solução para a ponta. À medida que a ponta se aproxima de substratos electricamente isoladores, este bloqueia parte da difusão de espécies para a ponta e consequentemente a corrente diminui quando comparada com $i_{T,\infty}$. No limite, quando a distância, d , tende para zero, i_T , também tende para zero – “*Feedback*” *Negativo*. Quando a ponta se aproxima de substratos electricamente condutores, embora o substrato bloqueie a difusão de espécies O (por exemplo, para a ponta) ocorre a reconversão de R em O no substrato. As espécies O geradas no substrato, difundem para a ponta, o que leva a um aumento do fluxo quando comparado com $i_{T,\infty}$. No limite, quando a distância, d , tende para

zero, a ponta passa a um regime em que a transferência de electrões por efeito de túnel pode ocorrer e a corrente i_T aumenta significativamente – “*Feedback*” Positivo.

As imagens obtidas por MVE através de varrimentos no plano x-y, a distância constante do substrato (x-y vs. i_T ; $z = \text{constante}$) ou a corrente constante (x-y vs. $d(z)$; $i_T = \text{constante}$), permitem observar diferenças de reactividade química e electroquímica entre detalhes superficiais e obter imagens topográficas de substratos condutores e isoladores.

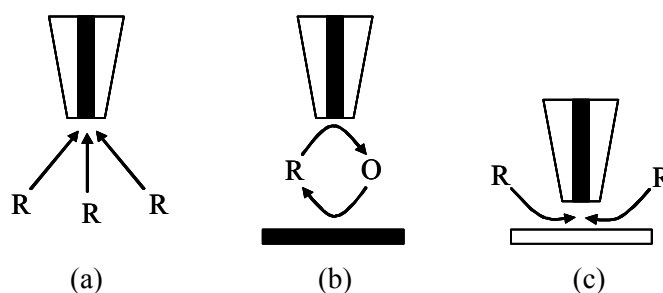


Figura 14 – Operação do MVE em modo *feedback*; (a) ponta afastada do substrato, (b) aproximação a substrato condutor e (c) aproximação a substrato isolador [88].

Nas diversas utilizações do MVE encontra-se o estudo de filmes de polímeros em substratos condutores ou isoladores, sendo possível analisar fluxos de contra-íões que acompanham os processos redox, determinar concentrações e coeficientes de difusão de espécies electroactivas no interior do filme, mesmo sem o conhecimento da densidade ou espessura dos filmes [92-94].

2.3. EQUIPAMENTOS

Todas as experiências electroquímicas convencionais foram realizadas num sistema constituído por uma interface electroquímica, IMT 102, e um analisador electroquímico digital, potenciostato, DEA 332, da Radiometer Copenhagen ligado a um computador para aquisição de dados através do programa Volta Master 2, VM 2.

Os estudos por Microbalança Electroquímica de Cristal de Quartzo foram realizados num sistema constituído por um Oscilador e um Analisador Electroquímico (CH Instruments, Inc. - USA), acoplado a um computador para aquisição de dados com o auxílio do programa Chi 420. Para a aquisição de valores de potencial de circuito aberto simultaneamente com variações de frequência foi usado um multímetro ligado em paralelo entre o eléctrodo de trabalho e o eléctrodo de referência.

A caracterização morfológica dos filmes de Politionina, foi efectuada por Microscopia Electrónica de Varrimento e Microscopia de Força Atómica. Todas as imagens de MFA foram obtidas *ex situ* em modo intermitente (“*tapping*”) com pontas de silício (RTESP7, Veeco), com uma frequência de oscilação de aproximadamente 300 kHz. Foi usado um microscópio de força atómica: Multimode AFM acoplado a um controlador Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Veeco). As imagens de MEV foram obtidas num microscópio electrónico de varrimento: SEM-JEOL. JSM - 5200 LV.

Para os ensaios de Microscopia de Varrimento Electroquímica foi utilizado um microscópio electroquímico: SECM 270 (Uniscan Instruments - UI) constituído por dois potenciostatos-galvanostatos PG580R e uma unidade de controlo SCV 100, interfaciados com um computador para aquisição de dados com o programa SECM (UI). A partir dos varrimentos de área a 2D, segundo o plano XY a Z constante, foram obtidas imagens a 3D usando o programa IsoPlot (UI).

2.4. ELÉCTRODOS E CÉLULAS

O disco de platina, de área geométrica $0,181 \text{ cm}^2$, que funcionou como eléctrodo de trabalho (ET) foi montado num suporte de teflon: colou-se o disco a uma base de latão com cola de prata (CircuitWorks), e preencheu-se o espaço entre o teflon, o latão e a platina com massa cerâmica (Pattex); através doutro suporte, também de teflon, munido de varão de latão central, fez-se o contacto entre o eléctrodo de trabalho e o cabo eléctrico externo (figura 15).

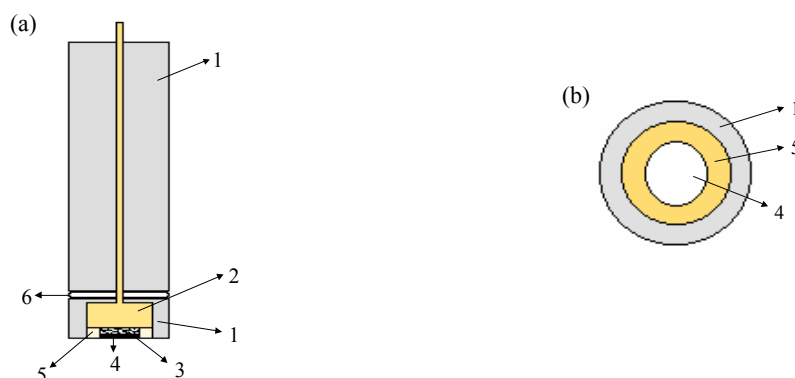


Figura 15 – Representação esquemática da montagem do eléctrodo de trabalho, (a) corte longitudinal e (b) vista de topo; 1- teflon, 2- latão, 3- cola de prata, 4- disco de platina, 5- cerâmica, 6- “o-ring”.

O ET foi polido com pasta de diamante e suspensões de alumina, com granulidade decrescentes de 9 μm (pasta de diamante), 5, 1 e 0,3 μm (suspensão de alumina). Após polimento, e antes de qualquer experiência, o eléctrodo foi sempre sujeito a limpeza electroquímica por varrimento de potencial entre -250 e $+1050$ mV, $v = 500$ mV s⁻¹, numa solução 0,25 mol dm⁻³ de H₂SO₄.

Nos ensaios electroquímicos convencionais utilizou-se uma célula de três eléctrodos sendo a referência (ER) o eléctrodo saturado de calomelanos (ESC), uma folha de platina o eléctrodo auxiliar (EA) e um disco de platina policristalina o ET. Na electropolimerização e caracterização foram usadas células de vidro de dois e três compartimentos representadas na figura 16 – a e b, respectivamente.

Todas a experiências foram conduzidas numa caixa de Faraday.

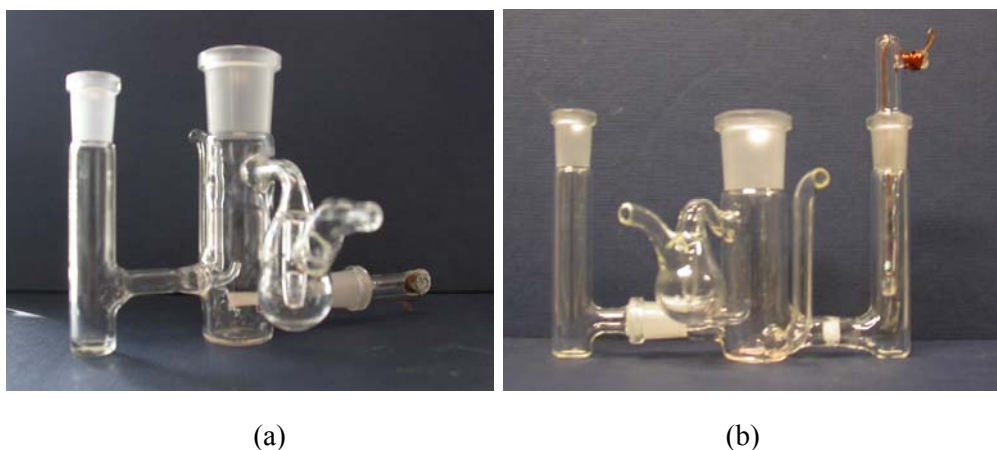


Figura 16 - Células de (a) 2 e (b) 3 compartimentos usada nos ensaios electroquímicos convencionais.

Na MECQ, a célula electroquímica é constituída por um único compartimento onde se encontra o ET, o EA, um fio de platina (Pt counter electrode for EQCM - CHI 129), e o ER saturado de calomelanos, Hg/Hg₂Cl₂ saturado em KCl, ESC, figura 17. Como eléctrodo de trabalho, foi usado um cristal de quartzo a 8 MHz (AT-cut), com uma camada de 1000 Å de platina sobre uma camada de titânio depositada por evaporação térmica do metal e uma área geométrica de 0,2 cm².

As experiências foram também conduzidas numa caixa de Faraday. Antes do início dos ensaios o sistema foi deixado estabilizar por um período de 2-3 horas. Devido à elevada sensibilidade deste foi necessário garantir o melhor isolamento do sistema em relação a flutuações de pressão atmosférica, pelo que a célula utilizada é fechada.

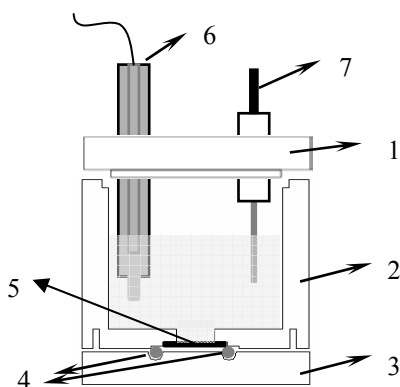


Figura 17 - Esquemas da célula electroquímica da MECQ: 1- tampa com entradas para ER, ET e entrada e saída de N_2 ; 2 - corpo da célula; 3 - base; 4 - contactos eléctricos ET; 5 - ET de platina; 6 - ER; 7 - EA.

Para a obtenção de imagens de MFA os filmes foram crescidos numa célula electroquímica, figura 18, de um compartimento onde se encontra o ET (slide de vidro recoberto de uma camada de platina), o EA, um fio de platina e o ER - saturado de calomelanos, Hg/Hg_2Cl_2 saturado em KCl - ESC. O ET é previamente limpo em solução de H_2SO_4/H_2O_2 e sujeito a tratamento à chama oxidante. Os filmes são, após polimerização, lavados, secos numa corrente de azoto e transferidos para o microscópio para obtenção das imagens.

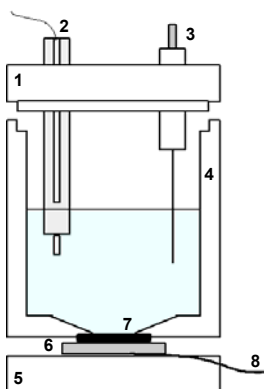


Figura 18 - Célula electroquímica usada no crescimento dos filmes para caracterização morfológica por MFA: 1- tampa com entradas para ER (2) e EA (3) e para entrada e saída de N_2 ; 4 - corpo da célula; 5 - base; 6 - ET de platina; 7 - *o-ring* e 8 - contacto eléctrico.

O eléctrodo usado para obter as imagens de microscopia electrónica de varrimento foi o descrito anteriormente para os ensaios electroquímicos convencionais.

A célula electroquímica usada no MVE é constituída por um único compartimento: numa posição central coloca-se horizontalmente com o auxílio de um nível de bolha de ar o

eléctrodo-substrato, de ouro policristalino montado numa resina epoxídica; o EA, de folha de platina, situa-se a uma distância suficiente para não interferir com as reacções que ocorram nos eléctrodos substrato e/ou ponta e o ER (ESC); montado em suporte próprio o eléctrodo-ponta de platina (100 ou 10 μm), é associado a um posicionador XYZ, permitindo fazer deslocamentos segundo as 3 coordenadas. Para visualizar a posição da ponta em relação ao substrato utilizou-se uma câmara de vídeo e um monitor. De acordo com os seus diâmetros os eléctrodos-ponta serão designados por A (100 μm) e B (10 μm).

Capítulo 3

Síntese e Caracterização do Poli(5-Amino-1-Naftol)

3.1. ELECTROPOLIMERIZAÇÃO

A electropolimerização potenciodinâmica do 5-amino-1-naftol foi realizada em eléctrodo de platina policristalina, numa solução $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ de monómero, usado sem qualquer purificação prévia, em solução aquosa de electrólito, HClO_4 $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, no intervalo de potencial de -100 a $+600 \text{ mV}$. Os filmes preparados serão designados de acordo com a nomenclatura apresentada no capítulo 2.

No primeiro varrimento de potencial no sentido anódico conduzido à velocidade de varrimento de potencial de $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, figura 19, observa-se uma subida da corrente de oxidação para valores de potencial superiores a 500 mV , que corresponde à oxidação do monómero. No varrimento inverso surge uma corrente de redução, a cerca de 150 mV , devido à redução do polímero formado na superfície do eléctrodo de platina. A oxidação do filme ocorre a cerca de 190 mV e é já notória no 2º ciclo de potencial. Com o aumento do número de ciclos de potencial, a densidade de corrente observada para a oxidação do monómero diminui, indicando que à superfície do eléctrodo se está a depositar um filme de polímero, PAN, que dificulta a oxidação do monómero. No entanto, as intensidades dos picos de oxidação e redução do polímero aumentam com o número de ciclos de potencial, revelando o seu crescimento e concomitante incremento de locais electroactivos na sua estrutura. Para filmes crescidos com 30 ou mais ciclos de potencial surge, nos voltamogramas representados na figura 19, um outro processo de oxidação a valores de potencial próximos do limite anódico, cuja intensidade aumenta com o número de ciclos de potencial. De acordo com a literatura [16] esta oxidação corresponde à formação de bipolarões e dicatiões na estrutura do polímero, o que pode provocar a sobreoxidação do filme com consequente diminuição da sua electroactividade. De facto, para o crescimento dos filmes de PAN, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, verificou-se que as cargas de oxidação e redução envolvidas na conversão redox do polímero aumentam linearmente com o número de ciclos de potencial até cerca de 30, após o que a electroactividade dos filmes tende para um patamar, como se ilustra na figura 20. De salientar que se verificam deslocamentos dos potenciais dos picos da conversão redox do filme, denotando que os processos se tornam mais difíceis e que a resposta perde o carácter reversível, tabela 2.

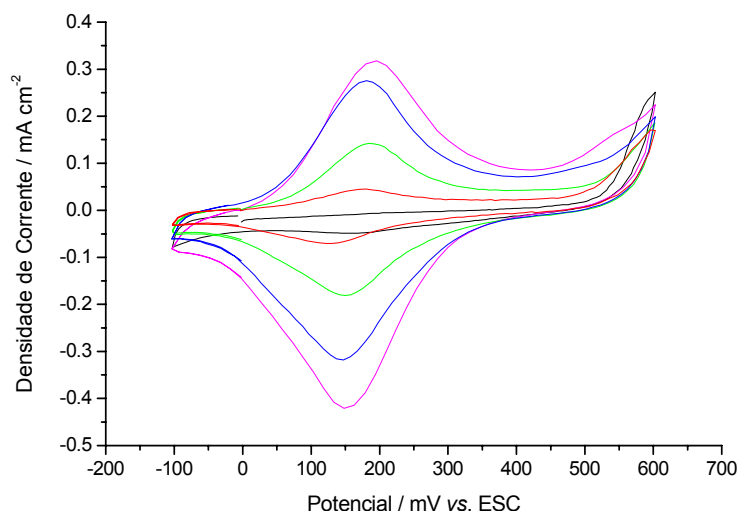


Figura 19 – Voltamogramas cíclicos do 1° (—), 5° (—), 20° (—), 30° (—) e 50° (—) ciclos de potencial da electropolimerização do 5-amino-1-naftol 0,5 mmol dm⁻³ em HClO₄ 0,5 mol dm⁻³; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

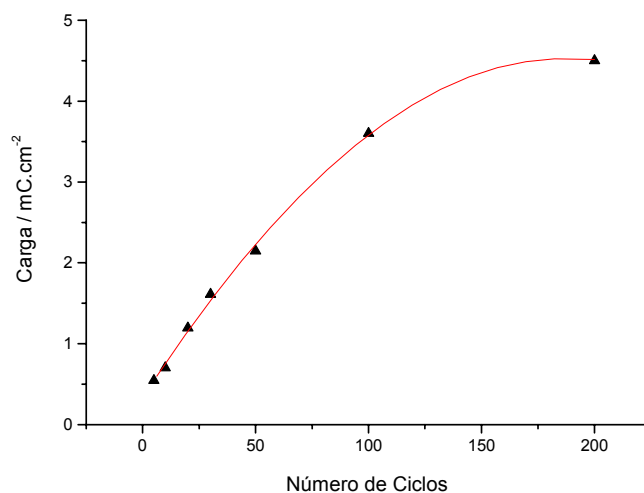


Figura 20 - Variação da carga de oxidação com o número de ciclos de potencial na electropolimerização do 5-amino-1-naftol numa solução 0,5 mmol dm⁻³ de monómero em HClO₄ 0,5 mol dm⁻³; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Tabela 2 – Potenciais dos picos de oxidação e redução do último ciclo da polimerização do PAN.

Filme	E _{ox.} / mV	E _{red.} / mV	ΔE / mV
PAN 5/50	173	133	40
PAN 10/50	178	143	35
PAN 20/50	185	154	31
PAN 30/50	182	148	33
PAN 50/50	189	155	34
PAN 100/50	190	119	71
PAN 200/50	188	76	112

E – valores de potencial dos picos de oxidação (ox.) e redução (red.) do último ciclo da polimerização dos filmes de PAN crescidos com diferentes numeros de ciclos; ΔE – variação de potencial entre o pico de oxidação e redução.

O efeito da velocidade de varrimento de potencial, v , usada para o crescimento do PAN no comportamento redox dos polímeros foi analisado para filmes formados com 20 ciclos. Os valores que se registam na tabela 3 correspondem às características voltamétricas observadas para o último ciclo de polimerização.

Quando v aumenta entre 2 e 50 mV s^{-1} , a quantidade de material depositado decresce, mas os potenciais de oxidação e redução do PAN não são significativamente alterados. No entanto, maiores velocidades de varrimento de potencial conduzem a grandes afastamentos dos potenciais da conversão redox do polímero, o que reflete a menor organização estrutural assim conferida e, portanto, baixa electroactividade.

Embora não seja possível estabelecer uma relação entre a quantidade de polímero depositado e a velocidade de varrimento de potencial durante a electropolimerização, a drástica variação da carga de oxidação e redução que a figura 21 mostra sugere que a elevados valores de v ocorre a formação doutro tipo de estrutura, possivelmente em escada, como referido no capítulo 1, que causando defeitos na cadeia polimérica diminuem a electroactividade.

Os nossos dados apontam para condições de crescimento potenciodinâmico do PAN em que a velocidade de varrimento de potencial não ultrapasse 50 mV s^{-1} e o número de ciclos seja cerca de 30 de modo a observar filmes com boas características de electroactividade.

Tabela 3 – Potenciais dos picos, cargas e densidades de corrente de oxidação e redução do último ciclo da polimerização do PAN a diferentes velocidades de varrimento.

Filme	$E_{\text{ox.}} / \text{mV}$	$E_{\text{red.}} / \text{mV}$	$\Delta E / \text{mV}$	$Q_{\text{ox.}} / \text{mC cm}^{-2}$	$Q_{\text{red.}} / \text{mC cm}^{-2}$	R	$j_{\text{ox.}} / \text{mA cm}^{-2}$	$j_{\text{red.}} / \text{mA cm}^{-2}$
PAN 20/2	176	155	21	9,1	10,7	0,8	0,06	0,09
PAN 20/20	175	156	19	2,0	1,9	1,0	0,12	0,15
PAN 20/50	185	154	31	0,8	0,9	0,9	0,20	0,26
PAN 20/200	199	144	55	0,4	0,4	1,0	0,27	0,31
PAN 20/500	203	118	85	0,2	0,2	0,9	0,41	0,52

E – valores de potencial dos picos de oxidação (ox.) e redução (red.) do último ciclo da polimerização dos filmes de PAN crescidos a diferentes velocidades; ΔE – variação de potencial entre o pico de oxidação e redução; Q – cargas de oxidação (ox.) e redução (red.); R – razão entre as cargas de oxidação e redução; j – densidade de corrente dos picos de oxidação (ox.) e redução (red.).

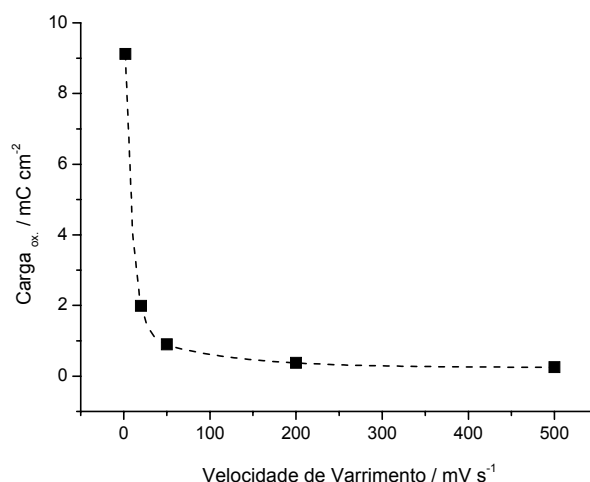


Figura 21 – Carga de oxidação vs. v obtidos para o 20º ciclo de potencial (no intervalo potencial de -100 a 400 mV) da electropolimerização.

3.2. CARACTERIZAÇÃO ELECTROQUÍMICA DO ELÉCTRODO MODIFICADO

A caracterização em HClO_4 0,5 mol dm^{-3} no intervalo de potencial aplicado na polimerização (-100 a 600 mV) dos filmes de PAN crescidos potenciodinamicamente a 50 mV s^{-1} com diferente número de ciclos de potencial - voltamogramas representados na figura 22 - mostra um comportamento semelhante ao observado nos voltamogramas da polimerização. Para mais de 30 ciclos de potencial de crescimento, o processo de oxidação a valores de potencial superiores a 450 mV aumenta de intensidade, desloca-se para valores de potencial mais positivos e é acompanhado de perda de reversibilidade do processo redox do filme, como se apresenta na figura 22. Correspondendo este processo à sobreoxidação do filme como referido acima; no sentido de evitar mais degradação do polímero o limite anódico de potencial na caracterização dos filmes formados, foi realizada no intervalo de -100 a +450 mV. Nestas condições os voltamogramas revelam uma conversão redox reversível que envolve a protonação/desprotonação do grupo amina e a inclusão/exclusão de aniões do electrólito. Verifica-se uma diferença de potencial entre os picos de oxidação e redução, ΔE , de cerca de 30 mV, em boa concordância com o mecanismo proposto por Barbero *et al.* [10], em que no processo redox do polímero em meio ácido estão envolvidos 2 electrões.

Embora o processo de electropolimerização fosse concluído ao limite catódico verificou-se a necessidade de proceder à descarga, por aplicação de um potencial catódico constante de -100 mV durante 600 segundos, para que a redução dos filmes fosse completa;

nestas condições durante a caracterização, a carga de oxidação do primeiro ciclo de potencial é superior à carga de redução, como se ilustra na figura 23 para os filmes PAN 20/50 e PAN 50/50. Comportamento semelhante foi observado para os restantes filmes (tabela 4).

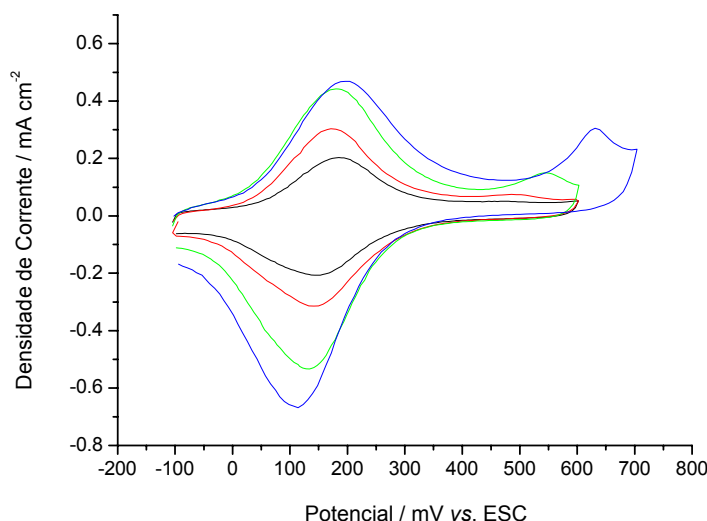


Figura 22 - Voltamogramas cíclicos dos filmes de poli(5-amino-1-naftol), crescidos com 20 (—) PAN 20/50, 30 (—) PAN 30/50, 50 (—) PAN 50/50 e 100 ciclos de potencial (—) PAN 100/50, obtidos em HClO_4 $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Os dados presentes na tabela 4 para PAN 10/5, PAN 20/5, PAN 10/50 e PAN 50/50 mostram ainda que o aumento do número de ciclos e a diminuição da velocidade de varrimento de potencial no crescimento do filme conduz a um aumento das cargas envolvidas na conversão redox dos filmes. Este comportamento está de acordo com a influência do tempo de polarização e da velocidade de varrimento de potencial na estrutura do polímero, descrita na literatura [16-18] e já referida na introdução (figuras 3a e 3b).

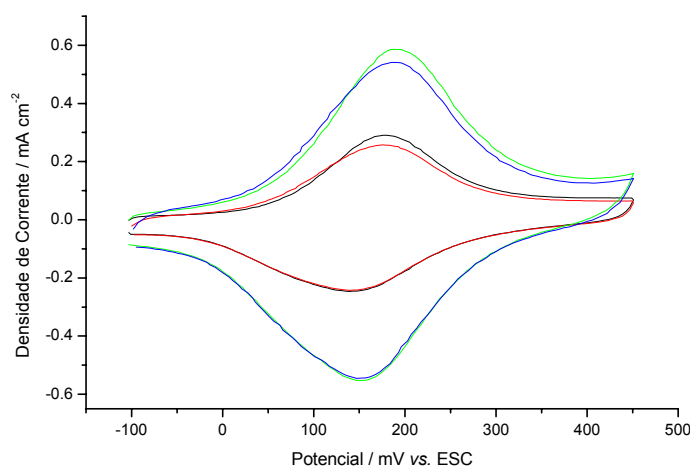


Figura 23 - Voltamogramas cíclicos dos filmes de poli(5-amino-1-naftol) obtidos em HClO_4 $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ com 20: (—) 1º ciclo e (---) 2º ciclos e 50 ciclos: (—) 1º ciclo e (---) 2º ciclos; $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

Tabela 4 – Cargas de oxidação e redução dos filmes crescidos com 20 ciclos de potencial a diferentes velocidades de varrimento de potencial.

Polímero	n	v / mV s^{-1}	Ciclo	Q_{Ox} / mC cm^{-2}	Q_{Red} / mC cm^{-2}	R
PAN 20/2	20	2	1 2	6,7 6,2	6,4 6,5	1,0 1,0
PAN 10/5	10	5	1 2	1,4 1,3	1,3 1,3	1,1 1,0
PAN 20/5	20		1 2	3,9 3,7	3,7 3,7	1,0 1,0
PAN 20/20	20	20	1 2	2,4 2,3	2,3 2,3	1,0 1,0
PAN 10/50	10	50	1 2	0,6 0,5	0,6 0,6	1,0 0,9
PAN 20/50	20		1 2	1,2 1,2	1,2 1,2	1,1 1,0
PAN 50/50	50	50	1 2	2,6 2,5	2,5 2,5	1,0 1,0
PAN 20/100	20	100	1 2	0,9 0,8	0,9 0,8	1,0 0,9
PAN 20/200			1 2	0,3 0,2	0,3 0,3	1,0 0,8
PAN 20/500	20	500	1 2	0,3 0,2	0,2 0,2	1,2 0,9

n – número de ciclos de potencial na electropolimerização; v - velocidade de varrimento de potencial na electropolimerização; Q – cargas de oxidação (ox.) e redução (red.) obtidas a partir dos voltamogramas cíclicos da caracterização dos filmes em solução de electrólito a 50 mV.s^{-1} ; R – razão entre as cargas de oxidação e redução.

Os voltamogramas obtidos na caracterização dos filmes de PAN revelaram também que para filmes formados a baixas velocidades a reversibilidade do processo de conversão redox diminui com o aumento do número de ciclos de crescimento, i.e. com a espessura do filme depositado (tabela 5). O carácter mais denso e compacto das primeiras camadas poliméricas crescidas a baixos valores de v dificulta o movimento dos aniões no seu interior. Para velocidades de crescimento mais elevadas, e.g. 50 mV s^{-1} , o depósito inicial deve ser menos organizado, e um provável aumento da porosidade com o espessamento do filme pode explicar a maior reversibilidade no processo redox observada.

Tabela 5 – Potenciais de oxidação e redução dos filmes PAN, caracterizados em HClO_4 $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ após polimerização e descarga a $-100\text{mV}/600\text{s}$ e diferenças de potencial entre os picos de oxidação e redução.

Meio	Filme	$\frac{v}{\text{mV s}^{-1}}$	$E_{\text{ox.}} / \text{mV}$	$E_{\text{red.}} / \text{mV}$	$\Delta E / \text{mV}$
HClO_4 $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ pH 0	PAN 10/5	50	210	184	26
	PAN 20/5		213	166	47
	PAN 10/50		192	152	40
	PAN 50/50		205	182	23

E – potenciais dos picos de oxidação (ox.) e redução (red.) dos filmes; ΔE – variação de potencial entre os picos de oxidação e redução.

Avaliou-se o comportamento electroquímico do PAN 10/5, PAN 20/5, PAN 10/50 e PAN 50/50 em meio neutro, i.e. com pH compatível com a presença de moléculas biológicas, nomeadamente soluções de tampão fosfato, preparadas a partir de uma mistura soluções $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ de Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4 , ou tris(hidroximetil)-aminoetano (Tris-HCl) pH 7.

No intervalo de potencial em que se observa a conversão redox do PAN em tampão fosfato (-400 a $+400 \text{ mV}$), os voltamograma obtidos para o filme PAN 10/50 e para a platina sem filme, figura 24, mostram que a reversibilidade do processo redox do filme é menor neste meio do que em solução ácida. De notar que se procedeu à prévia polarização do filme a -400 mV durante 1800 s para a completa redução do PAN. Os dados voltamétricos recolhidos para os filmes PAN 10/5, PAN 20/5, PAN 10/50 e PAN 50/50 (tabela 6) mostram grande diversidade de potenciais relativos à conversão redox do polímero e clara perda de reversibilidade do processo redox dos filmes neste meio.

Segundo o mecanismo redox proposto por Ohsaka *et al.* [15] para o poli(5-amino-1-naftol), existem relações 1:1 e 2:1, entre protões e electrões, em meio ácido e básico, respectivamente; a fraca resposta voltamétrica a valores de pH neutro pode dever-se a uma situação de transição entre os dois processos. Também a baixa basicidade do poli(5-amino-1-naftol), referida por Barbero *et al.* [10], que se traduz em meio neutro em menor protonação dos grupos amina deverá contribuir para a menor electroactividade observada.

Compararam-se os resultados obtidos, em tampão fosfato pH 7 com os registados nas mesmas condições para uma solução com ião perclorato, NaClO_4 , pH 7, confirmando-se que os efeitos acima analisados se devem a um efeito de pH e não à natureza do anião em solução (figura 25 - a). De facto na solução de NaClO_4 , o filme apresenta uma electroactividade comparável à obtida em solução tampão fosfato sendo o processo redox igualmente menos reversível do que em meio ácido.

Os resultados obtidos para o PAN 10/50 em Tris-HCl, pH 7, são semelhantes aos obtidos em tampão fosfato pH 7, como se ilustra na figura 25 - b.

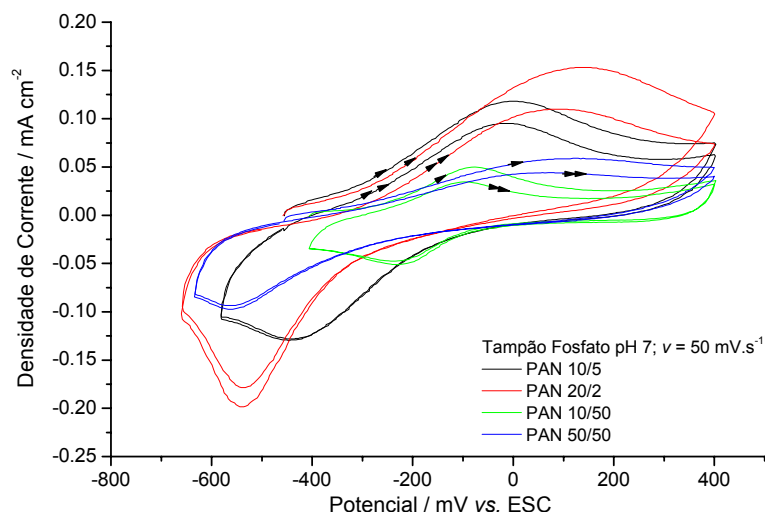


Figura 24 – Voltamograma cíclico da caracterização dos filmes: (—) PAN 10/5, (—) PAN 20/5, (—) PAN 10/50 e (—) PAN 50/50 em tampão fosfato pH 7, descarga do filme a $-400\text{mV}/1800\text{s}$; $v = 50\text{ mVs}^{-1}$.

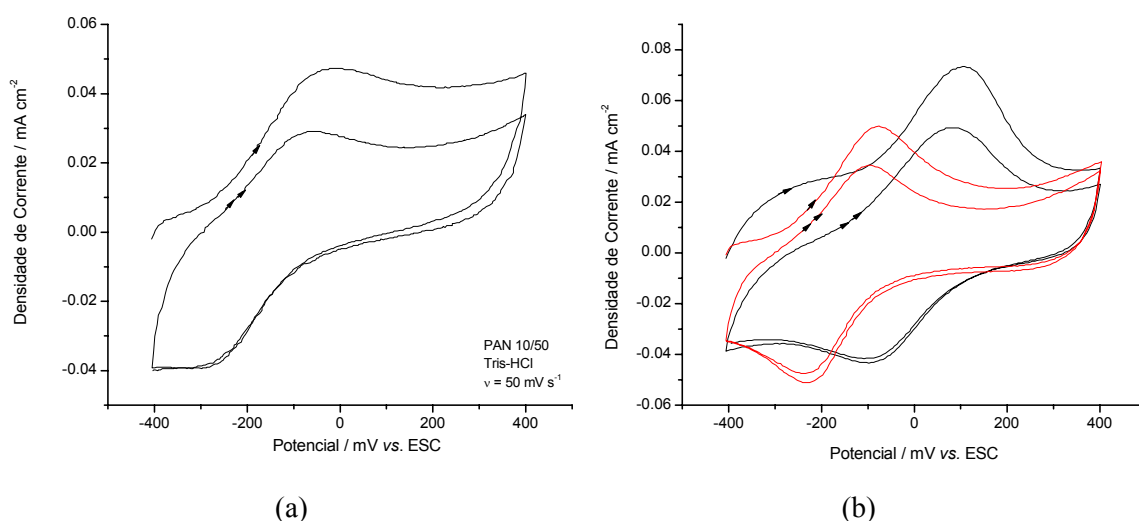


Figura 25 – Voltamogramas cíclicos da caracterização do filme de PAN 10/50 em: (a) (—) NaClO_4 e (—) tampão fosfato, pH 7 e (b) Tris-HCl, pH7; descarga do filme: $400\text{mV}/1800\text{s}$; $v = 50\text{ mV s}^{-1}$.

A resposta do eléctrodo modificado com PAN 10/50, à presença de espécies electroactivas em solução tampão fosfato pH 7, nomeadamente os pares $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, $[\text{Co}(\text{bpi})_3]^{2+/3+}$ e/ou $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{2+/3+}$, foi avaliada como se ilustra para o complexo de ferro na figura 26. Para a conversão redox do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ obteve-se uma resposta electroquímica fraca. Adicionalmente ao processo de oxidação e redução do filme PAN 10/50, verificou-se a ocorrência de outro processo redox, a valores de potencial muito positivos, que corresponde à conversão do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$. Esta conversão é dificultada no eléctrodo modificado, apresentando um grande afastamento de potencial entre os processos de oxidação e redução. Para os pares, $[\text{Co}(\text{bpi})_3]^{2+/3+}$ e $[\text{Co}(\text{fen})_3]^{2+/3+}$, o resultado obtido foi semelhante.

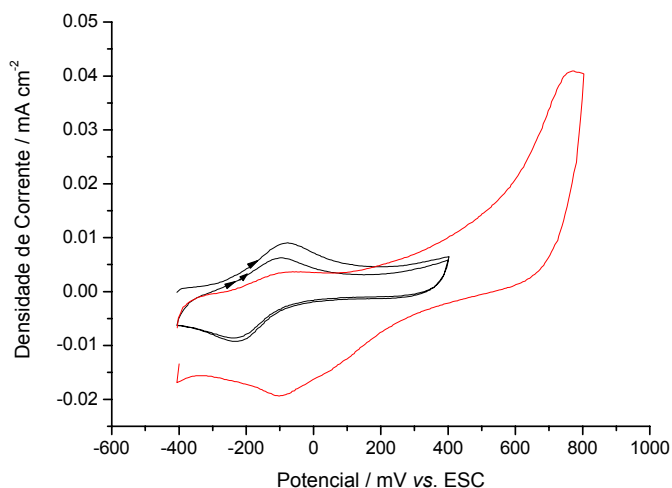


Figura 26 - Voltamogramas cíclicos da caracterização do filme de PAN 10/50 em (—) tampão fosfato, pH 7, e (—) tampão fosfato contendo $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

A fraca electroactividade do poli(5-amino-1-naftol) no meio compatível com as moléculas biológicas que se pretendem imobilizar no eléctrodo modificado e ainda a fraca resposta electrocatalítica na conversão redox das espécies electroactivas estudadas vem inviabilizar o uso deste polímero no cumprimento dos objectivos deste trabalho.

Capítulo 4

Síntese e Caracterização da Politionina

4.1. ELECTROPOLIMERIZAÇÃO DA TIONINA EM MEIO ÁCIDO

Seleccionou-se este monómero (figura 5) para a modificação de eléctrodos de platina por electropolimerização pois contém grupos amina livres e tem a vantagem de funcionar como mediador redox, pelo que se espera que apresente elevada eficiência na transferência electrónica entre a superfície do eléctrodo e espécies imobilizadas na superfície do polímero e/ou em solução.

A resposta voltamétrica da tionina (TN), em meio ácido, é bem definida (figura 27), apresentando, no intervalo de potencial de 0 a 500 mV, um pico de redução a cerca de 195 mV, que corresponde à conversão da tionina em leucotionina (forma reduzida) e um pico de oxidação a cerca de 231 mV, que corresponde à conversão da leucotionina em tionina (forma oxidada), como representado na figura 6 - a (página 7).

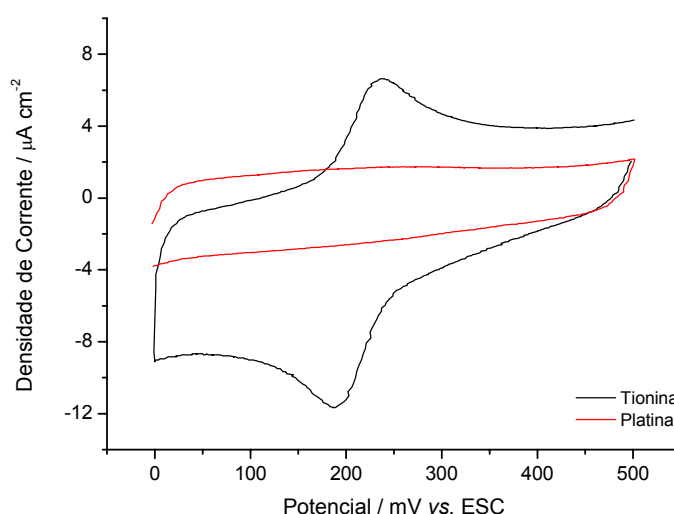


Figura 27 – Voltamogramas cíclicos da (—) conversão redox reversível da TN em meio ácido (Tionina $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) num eléctrodo de platina policristalina e (—) comparação com a resposta da platina no mesmo meio sem monómero; $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

A diferença de potencial entre os referidos picos é de cerca de 36 mV, próxima do valor previsto pelo mecanismo proposto por Lee *et al.* [14], que prevê que a conversão em meio ácido, envolva 2 electrões, figura 6 - a.

A politionina foi polimerizada, potenciostática e potenciodinamicamente, numa solução de acetato de tionina em meio ácido, H_2SO_4 $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$. Os filmes de politionina serão designados de acordo com a nomenclatura descrita no capítulo 2.

4.1.1. Electropolimerização Potenciostática

Foram selecionados valores de potencial no intervalo de 1000 a 1250 mV devido à oxidação irreversível do monómero ocorrer a valores de potencial superiores a 1000 mV (figura 28), tendo-se registado os transientes de carga presentes na figura 29. O aumento de carga verificado a potenciais superiores a 1200 mV deve-se ao comportamento da platina a estes valores de pH como ilustrado no voltamograma cíclico incluído na figura 29 e nos respectivos transientes em solução isenta de monómero.

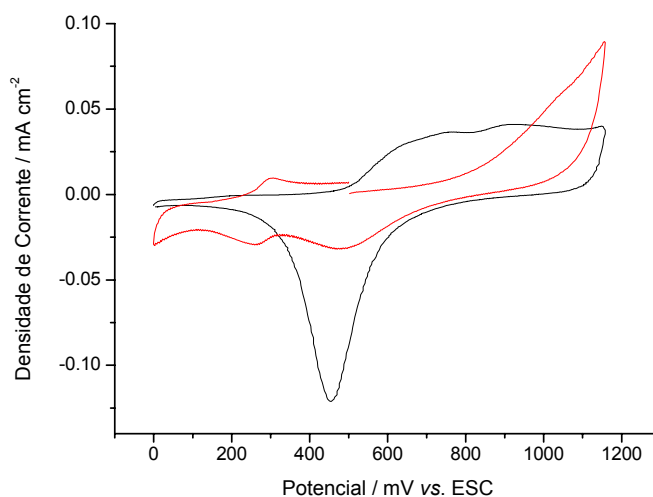


Figura 28 – Voltamogramas cíclicos da platina numa solução de H_2SO_4 $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ (—) sem e (—) com monómero; $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Para os restantes potenciais, comparando os valores de carga obtidos na solução de H_2SO_4 e numa solução com tionina, figura 29, aquela é maioritariamente devida à polimerização, aumentando com o potencial, tabela 6.

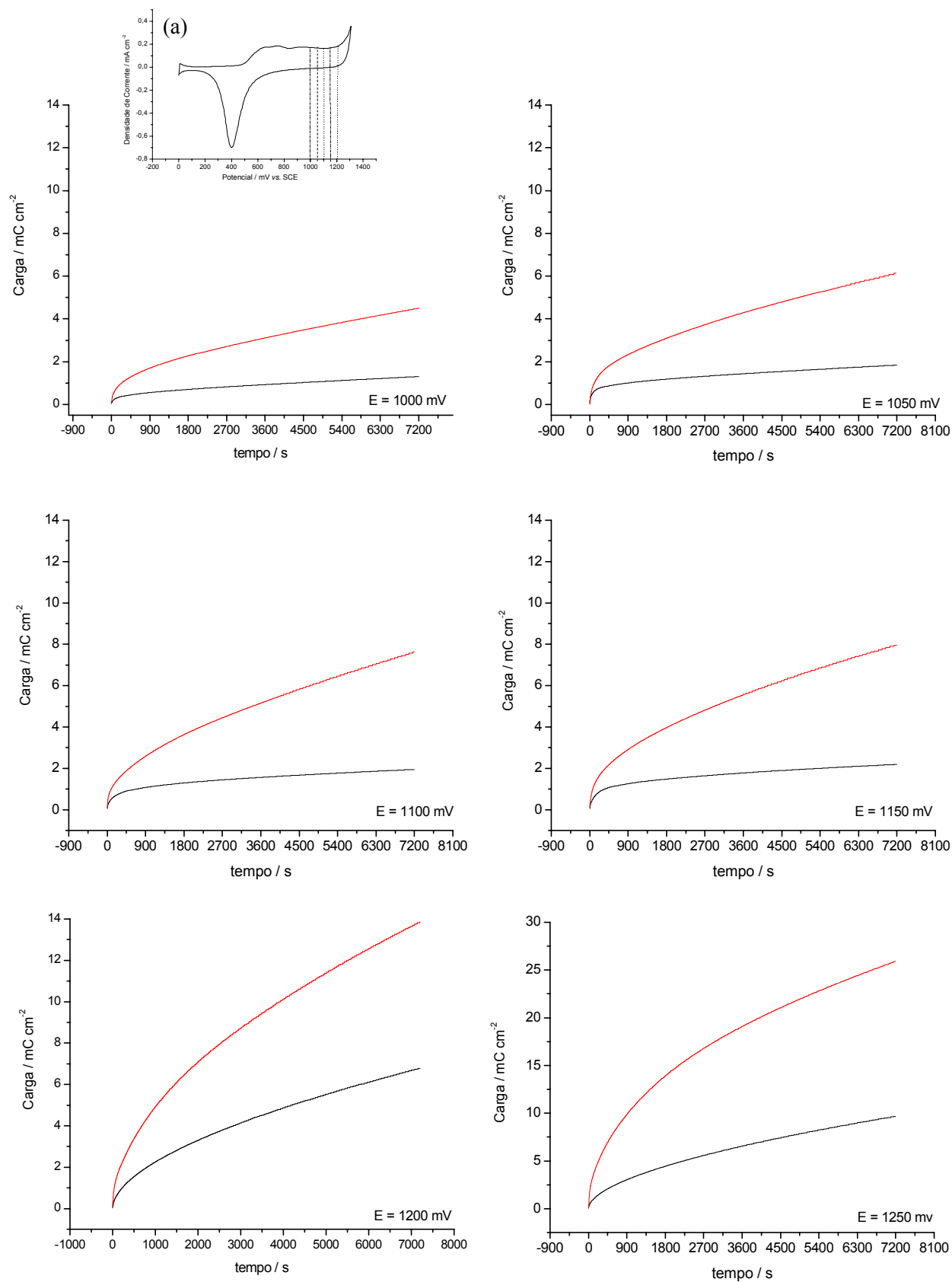


Figura 29 – Transiente de carga da polarização (7200 s) da platina em solução de H₂SO₄ 0,05 mol dm⁻³ (—) isenta e (—) contendo 50 μmol dm⁻³ de Tionina, a diferentes valores de potencial (1000, 1050, 1100, 1150, 1200 e 1250 mV) assinalados no voltamograma da platina em H₂SO₄ 0,05 mol dm⁻³ (a).

Tabela 6 – Valores de carga envolvidos na polarização da platina em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ com e sem tionina.

$t = 7200 \text{ s}$		$Q / \text{mC cm}^{-2}$
Potencial / mV	TN em H_2SO_4	H_2SO_4
1000	4,5	1,4
1050	6,1	2,0
1100	7,6	1,8
1150	8,0	2,2
1200	13,9	6,7
1250	25,9	9,7

Q – Carga envolvida na polarização da platina em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ e na mesma solução contendo monómero ($50 \mu\text{mol dm}^{-3}$).

Assim, o valor de potencial mais favorável para a electropolimerização potenciodinâmica da tionina em meio ácido é de 1150 mV.

4.1.2. Electropolimerização Potenciodinâmica

Os perfis de corrente-potencial observados durante a electropolimerização potenciodinâmica da politionina num eléctrodo de platina (80 ciclos, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$) estão representados na figura 30. No primeiro ciclo de potencial, com potencial inicial ao potencial em circuito aberto ($E_{\text{PCA}} = 500 \text{ mV}$), a reacção irreversível de oxidação da tionina na platina ocorre a valores de potencial superior a 1,0 V, com a formação de radical-catiões que provavelmente dão origem a dímeros isómeros, como reportado na literatura para as azinas com substituintes amina [22]. A deposição dos oligómeros na superfície do eléctrodo deve ocorrer sobre uma camada de PtO [12, 13] e uma vez que a tionina adsorve reversivelmente em platina, não se observa nucleação de uma nova fase na superfície do eléctrodo [24, 95]. No decorrer dos ciclos seguintes, observa-se um pequeno aumento na corrente de oxidação a 1150 mV; o incremento monotónico nas correntes de pico de oxidação e redução a aproximadamente 185 e 220 mV respectivamente, indica o crescimento do filme electroactivo de PTN. Estes incluem a reacção redox homogénea do monómero em solução, sobreposta com a conversão redox da politionina.

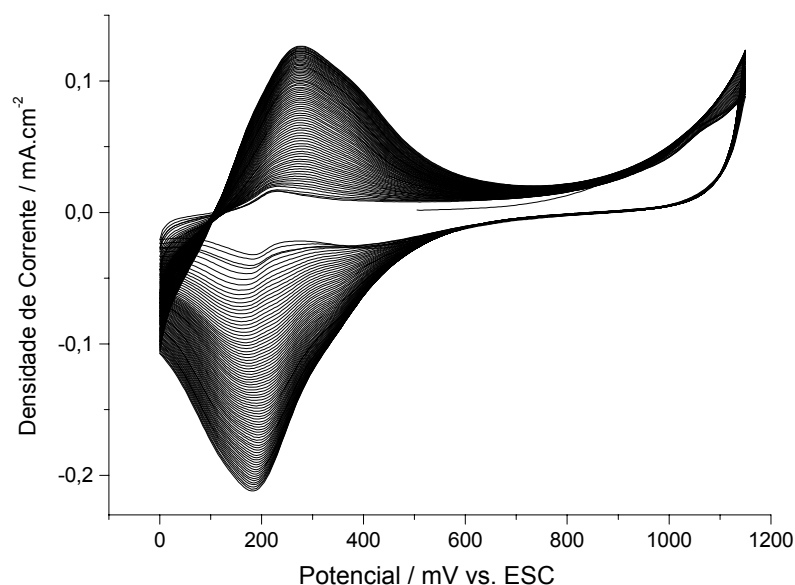


Figura 30 - Voltamogramas cíclicos (80 ciclos) da electropolimerização da politionina em $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ tionina e $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ H_2SO_4 em platina, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Filmes de politionina formados com diferentes valores de potencial de limite anódico, velocidade de varrimento e número de ciclos de potencial foram preparados, lavados com electrólito e caracterizados a 20 mV s^{-1} em solução sem monómero, com o objectivo de seleccionar as condições experimentais para o crescimento potenciodinâmico da tionina em meio ácido que levam à obtenção de filmes com electroactividade mais elevada. Na tabela 7 encontram-se representados os parâmetros obtidos na caracterização electroquímica. As cargas de oxidação ($Q_{\text{ox.}}$) e redução ($Q_{\text{red.}}$) aumentam com o valor de potencial do limite anódico (E_{la}) até 1150 mV , o número de ciclos de potencial (n) e com a diminuição da velocidade de varrimento (v) entre 100 e 20 mV s^{-1} , dando indicação das condições mais favoráveis para a formação de um polímero mais electroactivo na superfície do eléctrodo de platina. É de salientar que filmes de politionina crescidos com mais do que 80 ciclos de potencial apresentam menor electroactividade. O valor de potencial do limite anódico revelou ser um factor fundamental na electropolimerização da tionina. Este, tendo de ser suficientemente elevado para se atingir a oxidação do monómero, não pode ser excessivo e conduzir à sobre-oxidação e destruição do filme. Na tabela 7 também se observa que cargas mais elevadas na conversão redox do filme de politionina correspondem a um maior afastamento dos picos anódico e catódico, ΔE_p , sugerindo a ocorrência de alterações estruturais com o aumento da espessura do filme. Os resultados apontam para que filmes crescidos em meio ácido (H_2SO_4 $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) com 80 ciclos no intervalo de potencial entre 0 e 1150 mV a 20 mV s^{-1} devem apresentar boas características electroquímicas.

Tabela 7 - Dados electroquímicos obtidos a partir dos voltamogramas da caracterização dos filmes de PTN crescidos sob diferentes condições experimentais.

Condições de crescimento			Dados obtidos nos voltamogramas cíclicos de caracterização					
$E_{la} /$ mV	$v /$ mV s ⁻¹	n	$Q_{ox.} /$ mC cm ⁻²	$Q_{red.} /$ mC cm ⁻²	R	$E_{ox.} /$ mV	$E_{red.} /$ mV	$\Delta E_p /$ mV
1100	20	80	0,32	0,32	1,0	279	201	78
1150	20	20	0,41	0,31	1,3	277	226	51
		40	0,62	0,47	1,3	271	210	61
		80	0,75	0,80	0,9	263	167	96
		80	0,42	0,44	0,9	248	154	94
	100	80	0,31	0,28	1,1	246	167	79
1200	20	80	0,43	0,41	1,0	275	156	119
1230			0,28	0,28	1,0	244	164	80
1250			0,16	0,20	0,8	258	170	88

E_{al} – potencial do limite anódico na electropolimerização; v - velocidade de varrimento na electropolimerização; n – número de ciclos de potencial; Q – cargas de oxidação (ox.) e redução (red.) obtidas a partir dos voltamogramas da caracterização dos filmes de PTN à velocidade de potencial de 20 mV s⁻¹; $Q_{ox.} / Q_{red.}$ – razão entre as cargas de oxidação e redução; E_p – potenciais dos picos (a) anódico e (c) catódico; ΔE_p – diferença entre os potenciais dos picos anódico e catódico.

A electropolimerização potenciodinâmica da TN (figura 31) em substratos de ouro policristalino, revelou características semelhantes às observadas em platina. Neste caso, devido, à ausência de oxidação do substrato, sobreposta à oxidação do monómero o filme deposita-se directamente no ouro; a não observação de nucleação no primeiro ciclo da electropolimerização é, igualmente atribuível à adsorção do monómero na superfície do metal [24, 95].

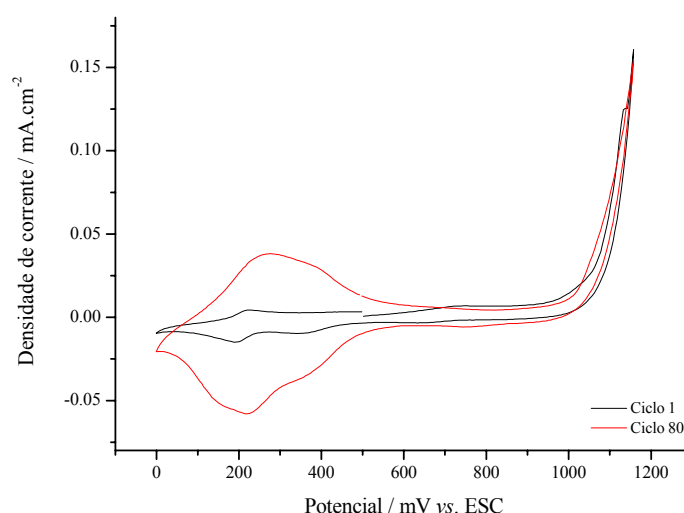


Figura 31 - Voltamogramas cíclicos dos ciclos (—) 1 e (—) 80 da electropolimerização potenciodinâmica da tionina em ouro; TN 50 µm em H₂SO₄ 0,05 mol dm⁻³, $v = 20$ mV s⁻¹.

Os filmes de politionina crescidos nas condições experimentais optimizadas para a electropolimerização potenciodinâmica em meio ácido, PTN 80/20, apresentam uma coloração amarelo dourado, contrariamente ao referido na literatura para filmes formados em meio ácido [28] mas de acordo com o descrito para filmes de politionina crescidos em eléctrodos de carbono vítreo em meio neutro [27].

A electrosíntese da PTN em eléctrodos de platina foi monitorizada por MECQ. Para o tratamento das variações de frequência, assumiu-se um comportamento de uma camada rígida para o filme depositado. Nesse pressuposto, usando a equação de Sauerbrey [75] uma variação negativa de frequência de 1 kHz corresponde a um aumento de massa no eléctrodo de 7 μg . A partir das variações da frequência da ressonância da microbalança durante os ciclos de electropolimerização, foi possível observar que a massa aumenta linearmente com o número de ciclos, como se mostra na figura 32.

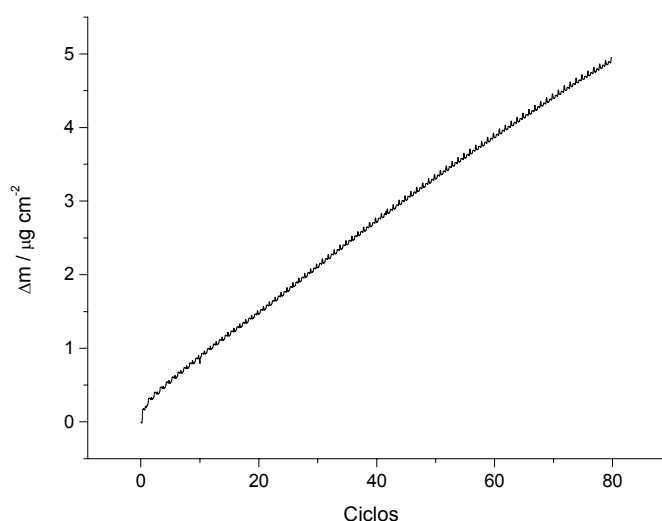


Figura 32 – Perfil potenciodinâmico de Δm / ciclos registado durante a electropolimerização da PTN (80 ciclos, entre 0 e 1150 mV) em eléctrodo de Pt numa solução 50 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ de TN em 0,05 mol dm^{-3} de H_2SO_4 ; $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

A densidade de locais electroactivos, Γ , calculada a partir da carga de oxidação do filme, assumindo um processo envolvendo dois-electrões, é representada na figura 33 em função da massa de PTN depositada após 20, 40 e 80 ciclos de potencial. Apesar da relação linear referida acima, a electroactividade dos filmes de politionina com diferentes espessuras não acompanha a variação de massa, tendendo para um patamar. Este facto pode estar relacionado com as já referidas alterações estruturais que ocorrem ao longo da electropolimerização.

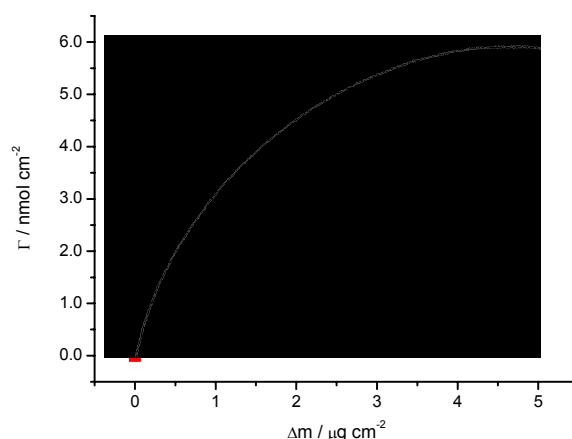


Figura 33 – Relação entre a densidade de locais electroactivos e massa depositada num eléctrodo de platina para a electropolimerização potenciodinâmica de filmes de PTN com diferentes espessuras (PTN 20/20, 40/20 e 80/20).

Adsorção de Tionina em Platina

Para analisar a possibilidade de adsorção de tionina na superfície dos eléctrodos de platina, como um passo prévio à polimerização (tal como sugerido por Hamnett *et al.* [12] e confirmada por resultados experimentais) registou-se a evolução do potencial de circuito aberto (E_{PCA}) da platina policristalina imersa em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ contendo tionina (figura 34). Verificou-se que o processo é lento e o potencial de circuito aberto leva algum tempo a atingir um valor constante ($t = 4 \text{ h}$; $E_{PCA} = 598 \pm 4 \text{ mV}$). A aplicação de um impulso de potencial a 600 e 650 mV ($t = 2 \text{ s}$) permite que o potencial em circuito aberto de 596 ± 3 e $625 \pm 2 \text{ mV}$, respectivamente, seja atingido para $t < 0,5 \text{ h}$. Comparando o valor de potencial em circuito aberto obtido, com os valores de potencial de oxidação (231 mV) e redução (195 mV) da tionina em meio ácido, referidos anteriormente, verificamos que, a TN adsorve na forma oxidada.

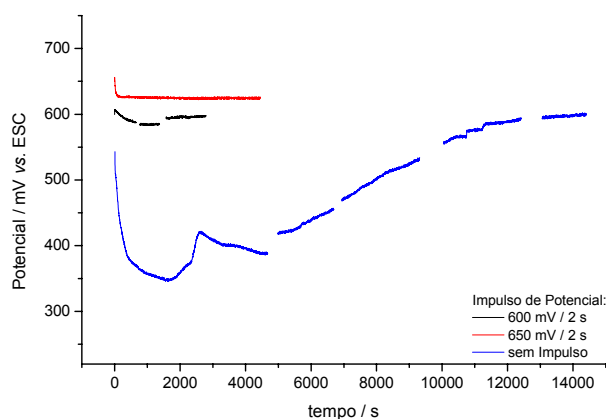


Figura 34 – Evolução do potencial em circuito aberto durante a adsorção da TN em platina ($\text{TN } 50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) (—) sem e com impulso de potencial: (—) $600 \text{ mV}/2\text{s}$ e (—) $650 \text{ mV}/2\text{s}$.

Após os ensaios referidos, presença da tionina adsorvida foi confirmada por voltametria cíclica, observando-se em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ uma desadsorção reductiva, figura 35. A desadsorção completa das espécies para a solução é confirmada pela ausência desta resposta no segundo ciclo de potencial. Os resultados também mostram a maior estabilidade da camada adsorvida após a aplicação do impulso de potencial de 650 mV .

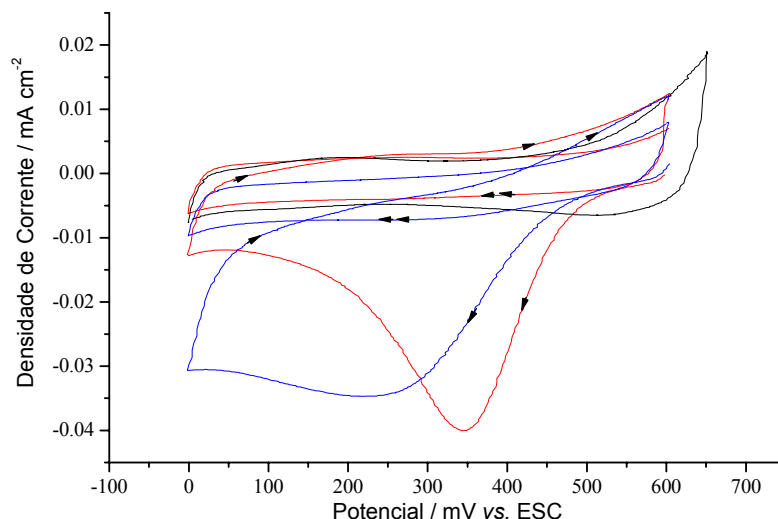


Figura 35 – Voltamogramas cíclicos (ciclos 1 e 2) da desadsorção da tionina adsorvida em platina em diferentes condições de adsorção: (—) $600 \text{ mV} / 2 \text{ s}$ e (—) $650 \text{ mV} / 2 \text{ s}$, e comparação com a platina no mesmo meio; H_2SO_4 $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

A partir dos valores de carga de desadsorção, obtidos por integração das curvas correspondentes aos primeiros varrimentos catódicos (figura 35), foram calculadas as quantidades de tionina adsorvida, Γ_1 e Γ_2 admitindo que estão envolvidos 1 e 2 electrões,

respectivamente, tabela 8; de notar que em estudos semelhantes Svetlicic *et al.* [23] consideraram o envolvimento de 2 electrões.

Tabela 8 – Valores de cargas de redução na desadsorção da Tionina ($50 \mu\text{mol dm}^{-3}$) em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$.

Platina Tionina em H_2SO_4	$Q_{\text{red.}}$ / mC cm^{-2}	$10^9 \Gamma_1$ / mol cm^{-2}	$10^9 \Gamma_2$ / mol cm^{-2}
600 mV / 2 s	0,31	3,3	1,6
650 mV / 2 s	0,20	2,2	1,1

Área – área do pico de redução nos voltamogramas; Γ - concentração superficial de espécies electroactivas; Q – carga.

Estimou-se a área ocupada por uma molécula com o ChemSketch, considerando a já referida orientação paralela, “*flat*”, como orientação mais favorável da adsorção da TN em superfícies de platina; o valor obtido ($6,1 \times 10^{-15} \text{ cm}^2 \text{ molécula}^{-1}$) está de acordo com o valor reportado na literatura ($A = 7,2 \times 10^{-15} \text{ cm}^2 \text{ molécula}^{-1}$) [12]. Avaliaram-se as cargas envolvidas na formação de uma monocamada de tionina adsorvida nessa orientação, Q_1 e Q_2 (tabela 9), igualmente admitindo que no processo estão envolvidos 1 ou 2 electrões.

Tabela 9 – Valores de cargas de uma monocamada de Tionina adsorvida na superfície da platina com orientação paralela à superfície

$10^{15} A / \text{cm}^2$ molécula^{-1}	$10^{10} \Gamma$ / mol cm^{-2}	$Q_1 / \text{mC cm}^{-2}$	$Q_2 / \text{mC cm}^{-2}$
6,1	2,7	0,026	0,052

A - Área ocupada por 1 molécula de tionina; Γ - concentração superficial de espécies electroactivas; Q – carga.

Os valores de carga assim obtidos mostram a adsorção de maior quantidade de TN do que a calculada para a orientação “*flat*”, indicando que neste meio a TN pode adsorver com orientação diferente da inicialmente admitida.

Este facto, permite justificar a não observação da nucleação de uma nova fase na electropolimerização da TN em meio ácido, em substratos de platina ou de ouro, uma vez que antes do início da polimerização já existem moléculas de TN adsorvidas na superfície.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DO ELÉCTRODO MODIFICADO

4.2.1. Comportamento redox de filmes de PTN em meio ácido

Para o estudo do comportamento redox dos filmes de politionina considerou-se o intervalo de potencial 0 - 650 mV. A valores inferiores de potencial a resposta da corrente poderia conter a contribuição da reacção de evolução de hidrogénio; e para limites anódicos mais elevados dar-se-ia a sobreoxidação do filme.

Na figura 36 encontra-se representada a resposta electroquímica típica de um filme de politionina (80 ciclos a 20 mV s^{-1}), onde se pode observar a ocorrência de um pico de oxidação e outro de redução a cerca de 263 e 167 mV, respectivamente, que pela largura devem compreender mais do que um processo.

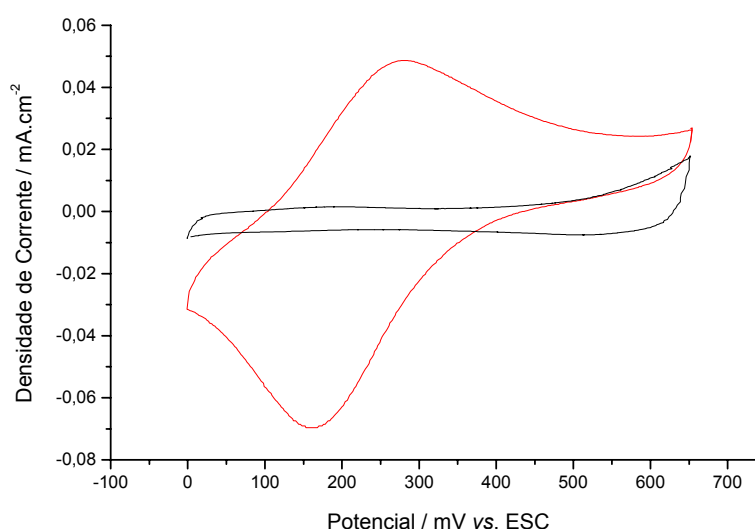


Figura 36 – Voltamograma cíclico típico da caracterização de um filme de PTN 80/20, em meio ácido, H_2SO_4 $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$; $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Na tabela 10 listam-se os parâmetros voltamétricos da caracterização dos filmes de PTN 80/20 obtidos a diferentes velocidades de varrimento de potencial; pelo incremento da carga e aproximação dos potenciais de picos de oxidação e redução a valores de v mais baixos pode concluir-se que o processo de transferência de carga no filme é lento, o que está de acordo com o sugerido por Lee *et al.* [14].

Tabela 10 – Valores de potencial dos picos e cargas de oxidação e redução dos filmes de Politionina, PTN 80/20, caracterizados a diferentes velocidades de varrimento de potencial.

Filme	v / mV s^{-1}	$E_{\text{ox.}}$ / mV	$E_{\text{red.}}$ / mV	ΔE / mV	$Q_{\text{ox.}}$ / mC cm^{-2}	$Q_{\text{red.}}$ / mC cm^{-2}	R
PTN 80/20	100	246	150	96	0,40	0,42	1,0
	20	263	167	96	0,75	0,80	0,9
	2	267	217	50	0,89	1,20	0,7

E – potenciais dos picos de oxidação (ox.) e redução (red.); ΔE – diferença de potencial entre o pico de oxidação e redução; Q – cargas de oxidação (ox.) e redução (red.) dos filmes; R – razão entre as cargas de oxidação e redução.

4.2.1.1. Efeito do Modo e Condições de Crescimento

Para os filmes obtidos por polimerização potencioestática, tanto o aumento de potencial (figura 37) como do tempo de polarização, figura 38, originou filmes com electroactividade crescente. Os valores resultantes da análise dos voltamogramas presentes nas figuras 37 e 38 estão listados na tabela 11. A multiplicidade de processos redox observáveis nalguns dos voltamogramas cíclicos, particularmente notórios em filmes mais espessos ou formados a valores mais elevados de potencial, apontam a presença de camadas com estrutura pouco homogénea. A formação de isómeros no decorrer da polimerização (dependendo de qual átomo de carbono, em posição *orto* em relação ao grupo $-\text{NH}_2$, é atacado, e aos factores referidos anteriormente como os deslocamentos de potencial induzidos pela diminuição do carácter dador do átomo de azoto), a formação de ligações tipo-benzidina e adsorção de moléculas de monómero no polímero através da formação de ligações S-S (que também pode dar origem a um par redox a valores de potencial mais negativos por aumento da densidade electrónica do sistema aromático) são explicações plausíveis do comportamento observado.

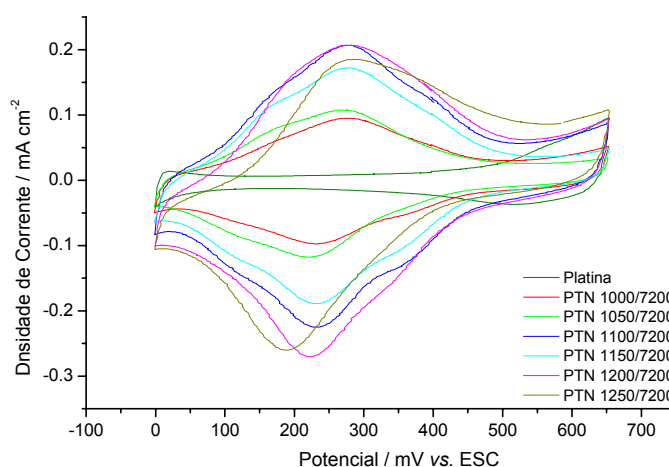


Figura 37 – Caracterização dos filmes de PTN em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, crescidos a potencial constante durante 7200s a: (—) 1000, (—) 1050, (—) 1100, (—) 1150, (—) 1200 mV e (—) 1250 mV; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

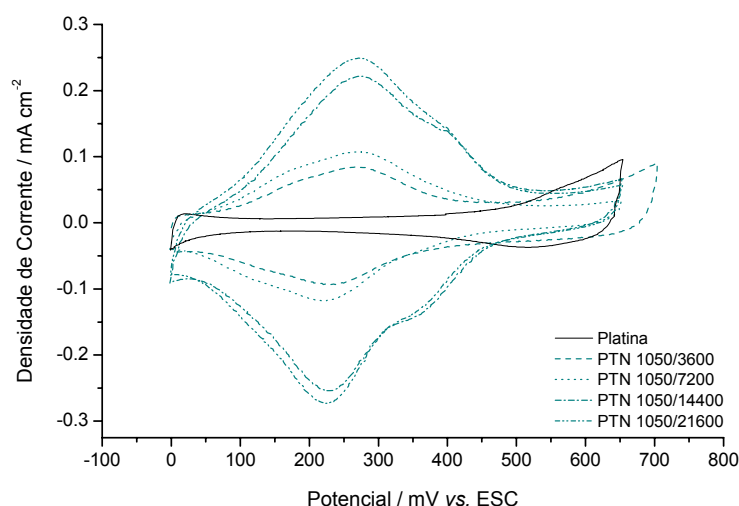


Figura 38 – Caracterização em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ dos filmes de PTN crescidos a potencial constante durante: (— — —) 3600, (.....) 7200, (— — —) 14400 e (— — —) 21600s; $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Tabela 11 – Valores das cargas de oxidação e redução obtidos na caracterização dos filmes de politionina, crescidos potenciostaticamente em diferentes condições.

Filme *	$Q_{\text{ox}} / \text{mC cm}^{-2}$	$Q_{\text{red}} / \text{mC cm}^{-2}$	R
PTN 1000/7200	0,32	0,31	1,0
PTN 1050/3600	0,30	0,32	0,9
PTN 1050/7200	0,34	0,33	1,0
PTN 1050/14400	0,67	0,72	0,9
PTN 1050/21600	0,74	0,74	1,0
PTN 1100/7200	0,68	0,67	1,0
PTN 1150/7200	0,53	0,55	1,0
PTN 1200/7200	0,70	0,79	0,9
PTN 1250/7200	0,62	0,68	0,9

Q – cargas de oxidação (ox.) e redução (red.) dos filmes; R – razão entre as cargas de oxidação e redução; * - $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

O comportamento redox dos filmes de PTN obtidos potenciodinamicamente apresenta as mesmas características, sendo mesmo possível selecionar condições de preparação sob modo potencioestático e potenciodinâmico conducentes à observação de respostas muito similares, e. g. $E_{\text{cres}} = 1150 \text{ mV}$ e $t = 7200 \text{ s}$ e 80 ciclos a $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$, como se ilustra na figura 39.

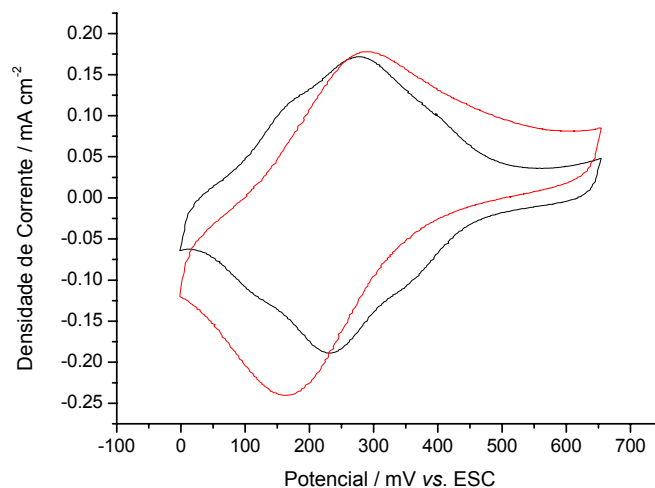


Figura 39 – Voltamogramas cíclicos da caracterização dos filmes (—) PTN 80/20 e (—) PTN 1150/7200 em H_2SO_4 0,05 mol dm^{-3} ; $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

4.2.1.2. Efeito da Natureza do Substrato

Comparou-se o comportamento de filmes crescidos potenciodinamicamente (40 e 80 ciclos) em substratos de ouro e platina verificando-se para o 1º caso uma electroactividade ligeiramente inferior e menor afastamento dos picos de oxidação e redução – figura 40; tabela 12.

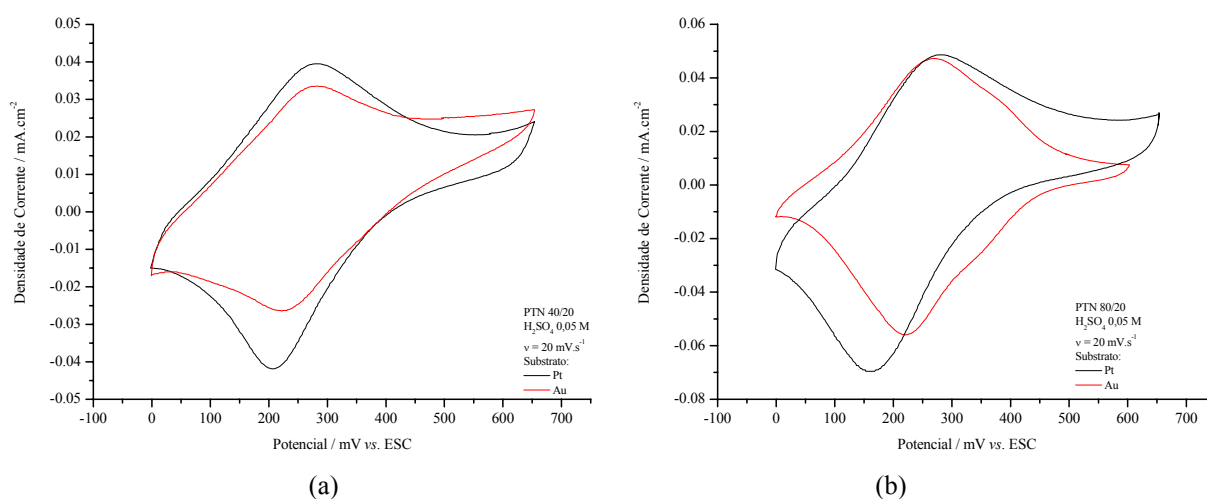


Figura 40 - Voltamogramas cíclicos da caracterização dos filmes (a) PTN 40/20 e (b) PTN 80/20 em substratos de (—) Platina e (—) Ouro; H_2SO_4 0,05 mol dm^{-3} ; $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Tabela 12 - Valores de cargas, potenciais e densidades de corrente de picos de oxidação e redução dos filmes PTN 40/20 e PTN 80/20 em substratos de ouro e platina; H_2SO_4 $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$.

Substrato Filme *	Platina		Ouro	
	PTN 40/20	PTN 80/20	PTN 40/20	PTN 80/20
$E_{\text{ox.}} / \text{mV}$	271	263	272	259
$E_{\text{red.}} / \text{mV}$	210	167	233	221
$\Delta E / \text{mV}$	61	96	39	39
$Q_{\text{ox.}} / \text{mC cm}^{-2}$	0,62	0,75	0,47	0,65
$Q_{\text{red.}} / \text{mC cm}^{-2}$	0,47	0,80	0,35	0,67
R	1,3	0,9	1,4	1,0
$j_{\text{ox.}} / \mu\text{A cm}^{-2}$	40	49	33	47
$j_{\text{red.}} / \mu\text{A cm}^{-2}$	34	57	26	44

Q - cargas de oxidação e redução; R - razão entre as cargas de oxidação e redução; E - potenciais dos picos de oxidação e de redução; ΔE - diferença de potencial entre o pico de oxidação e redução; j - densidade de corrente de oxidação e redução; * - $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

4.2.1.3. Efeito da Espessura dos Filmes

Como se referiu na discussão dos resultados da electropolimerização potenciodinâmica da PTN, são de esperar alterações estruturais quando se preparam filmes espessos. Para analisar a influência da espessura dos filmes no processo de conversão redox da PTN, procedeu-se à caracterização de filmes PTN 20/20 e 80/20 variando a velocidade de varrimento de potencial, entre 5 e 100 mV s^{-1} . Verificou-se que para a PTN 20/20, a densidade de corrente do pico apresenta uma relação linear com a velocidade de variação de potencial, enquanto que para a PTN 80/20, se obtém uma relação linear com $v^{1/2}$, figura 41.

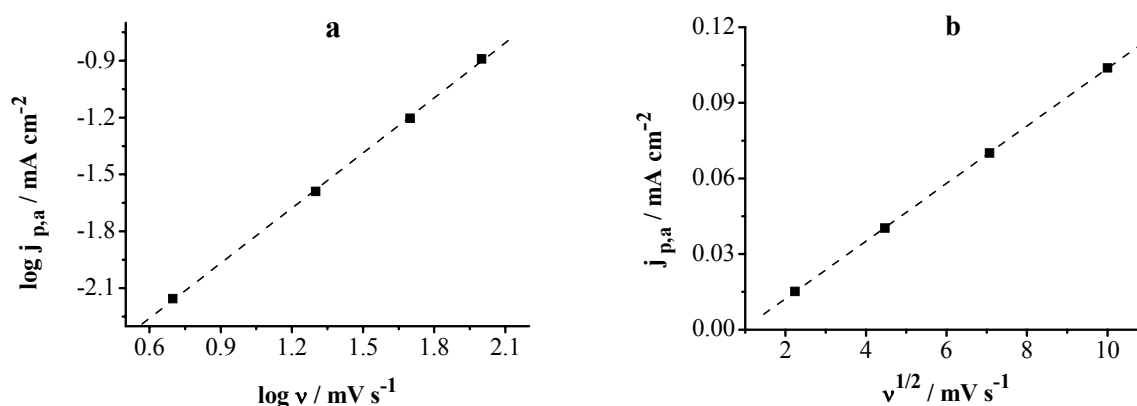


Figura 41 - Representação da densidade de corrente de pico em função da velocidade de varrimento de potencial para filmes de politionina (a) PTN 20/20 e (b) PTN 80/20 em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$.

Os resultados indicam que os processos de transferência de carga nos filmes passam de um controlo por transferência electrónica para um controlo por difusão, com o aumento da espessura.

4.2.2. Comportamento redox de filmes de PTN em meios biológicos

Sendo objectivo do presente trabalho obter eléctrodos modificados com filmes poliméricos electroactivos e estáveis em meios biológicos, estudou-se a resposta da PTN 80/20, em diversos meios compatíveis com moléculas biológicas nomeadamente Tampão Fosfato, Tampão Acetato, Ácido Morfolinoetanossulfónico (MES) e Tris(hidroximetil)aminoetano (Tris-HCl), com valores de pH entre 5,5 e 8,5. Comparando as respostas do filme nos diferentes meios, figura 42, é possível verificar que, para além dos já esperados deslocamentos dos picos de oxidação e redução devido a variações de pH das soluções, também se observam comportamentos redox distintos. Em solução de tampão acetato com pH 5,5, o filme apresenta maior electroactividade, registando-se um pico de oxidação e outro de redução, que pela sua forma alargada devem compreender mais do que um processo; em solução de tampão fosfato, MES e Tris-HCl, dois processos de oxidação e dois de redução são facilmente distinguíveis; menor electroactividade é observada na caracterização em solução de tampão fosfato.

A presença de mais do que um par de ondas redox na caracterização de polímeros electroactivos tem sido também observada em outros sistemas, e.g. no poli(azul de metileno) [22]. O processo que ocorre a valores de potencial mais positivos foi atribuído a alterações nos anéis aromáticos que, reduzindo o carácter dador do átomo de azoto, induzem o deslocamento de potencial. O par redox a potenciais mais negativos, resulta, como já referido, da conjugação tipo-monómero também presente no polímero [34], que pode provir de moléculas de monómero adsorvidas no polímero por ligações S-S; estas, aumentando a densidade electrónica do sistema aromático, induzem o deslocamento de potencial no sentido catódico.

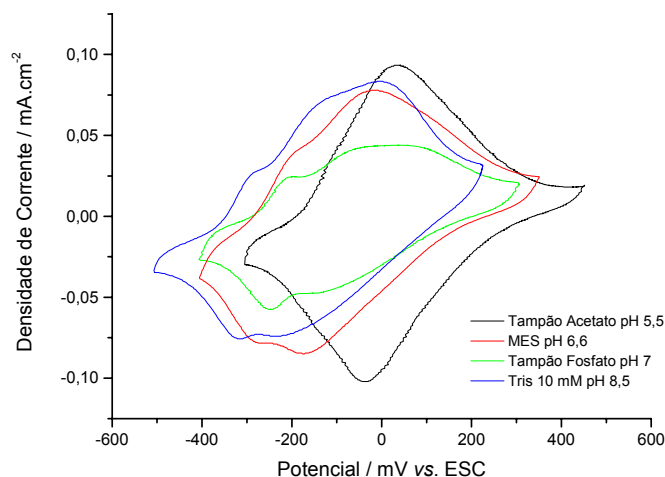


Figura 42 – Voltamogramas cíclicos da caracterização de filmes PTN 80/20 em (—) Tampão Acetato pH 5,5, (—) MES pH 6,6, (—) Tampão Fosfato pH 7 e (—) Tris pH 8,5; $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

4.2.3. Efeito do pH no comportamento electroquímico do PTN

A caracterização electroquímica de filmes PTN 80/20 em soluções numa gama alargada de valores de pH, pH 1,3 (H_2SO_4) e de 5,5 a 12 (soluções de fosfato), cujos voltamogramas se encontram representados na figura 43, permitiu verificar que este apresenta estabilidade e maior electroactividade em soluções com pH entre 1,3 e 9.

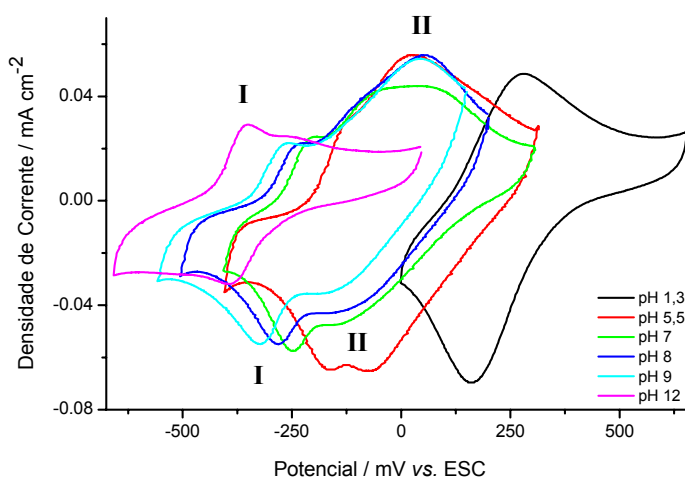


Figura 43 – Efeito do pH na electroactividade do filme de Politionina, PTN 80/20 em soluções tampão fosfato com diferentes valores de pH: (—) 1,3, (—) 5,5, (—) 7, (—) 8, (—) 9 e (—) 12; $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Devido à perda de locais electroactivos com o aumento do pH, em meio mais alcalino, é observada menor electroactividade, o que está de acordo com a hipótese da transferência

electrónica entre locais redox vizinhos acompanhada de transferência protónica, ou seja, a desprotonação do polímero reduz a velocidade de transferência electrónica [6]; para além disso há possibilidade de iões hidróxido, HO^- , formarem pontes de hidrogénio e interagirem com as cargas positivas do filme, estabilizando-o e dificultando a conversão redox da politionina nesses meios [35].

De acordo com o referido anteriormente, dois processos redox são identificáveis (figura 43) a valores de pH superiores a 5,5 (possivelmente encontram-se sobrepostos em meio ácido, onde apenas um par de picos redox é observável). Destes, o processo a valores de potencial mais negativos (I) apresenta-se dependente do pH: a oxidação (I) desloca-se para potenciais menos negativos cerca de 30 e 65 mV/pH com a diminuição do pH entre 12 e 7 e 7 e 5,5, respectivamente. Estes valores estão próximos dos valores Nernstianos de 29,5 e 59 mV para processos envolvendo um-protão/dois-electrões e dois-protões/dois-electrões, respectivamente. De pH 5,5 a 1,3, o deslocamento do valor de potencial de oxidação é de 90 mV/pH, o que representa um processo de três-protões/dois-electrões. Este resultado difere do anteriormente proposto na literatura [28] mas está de acordo com o esquema reaccional representado por Hillman e colaboradores [12, 31] para o processo redox que ocorre em filmes de politionina a valores de pH inferiores a 5. Além disso, este facto parece significar que tanto o átomo de azoto do anel heterocíclico como o que estabelece a ponte entre duas unidades de monómero devem estar protonados neste meio, apesar de o valor do pK_a dos grupos amina primários da tionina ser inferior a -1 . A redução dos anéis das azinas leva à protonação dos grupos amina em azinas contendo aminas primárias, o que reforça o mecanismo de três-protões/dois-electrões [6]. O segundo processo de oxidação (II), pelo menos no intervalo de pH entre 5,5 e 9, parece ser independente do pH, sem a participação de protões. Por outro lado, o pico de redução (II) deverá depender do pH, sendo deslocado para valores de potencial mais negativos com o aumento do pH. Na tabela 13 encontram-se representados os deslocamentos de potencial dos processos anódicos e catódicos com o aumento do pH da solução. É também possível observar que o processo redox (I) apresenta valores de ΔE inferiores, confirmando a sua atribuição à transferência de protões, que devem ter uma cinética mais rápida do que outras espécies, uma vez que estas se podem mover no filme de politionina por um processo tipo-Grotthus [6] através de moléculas de água e grupos amina no polímero. Esta observação também está de acordo com a hipótese acima formulada de este processo poder estar relacionado com conjugação tipo-monómero presente no polímero [34], uma vez que é dependente do pH. Por outro lado, o processo de oxidação (II) apresenta-se independente do pH no intervalo de 5,5 a 9 e com ΔE muito maior. A separação

dos picos reflecte a transferência electrónica lenta, como foi já referido, e a estabilização das cargas positivas do átomo de enxofre no anel da fenotiazina pelos aniões hidróxido da solução [34, 35].

Tabela 13 – Valores de potencial dos picos de oxidação e de redução do filme de PTN em meios com diferentes valores de pH.

PTN 80/20 *		E _{ox.} / mV		E _{red.} / mV		ΔE / mV	
Solução	pH	(I)	(II)	(I)	(II)	(I)	(II)
H ₂ SO ₄ 0,05 mol dm ⁻³	1,3	263		167		96	
	5,5	≈ -115	14	-175	-58	≈ 60	72
Tampão Fosfato 0,1 mol dm ⁻³	7	-213	5	-250	≈ -143	37	≈ 148
	8	-245	59	-283	≈ -158	38	≈ 217
	9	-273	38	-319	≈ -185	46	≈ 223
	12	-360	≈ -272	-379	Não observado	19	---

E – Potenciais de picos de oxidação (ox.) e redução (red.) a valores de potencial mais catódicos (I) e a valores de potencial mais anódicos (II); (---) valores de potencial de pico que não é possível obter devido a alargamento ou sobreposição de picos; * - $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

A diminuição da electroactividade dos filmes PTN 80/20 quando caracterizado em tampão fosfato pH 12, não significa, no entanto, que o filme sofre alterações irreversíveis, uma vez que se reposto numa solução de H₂SO₄ 0,05 mol dm⁻³ (pH 1,3) após caracterização em tampão fosfato pH 12, o filme recupera a sua electroactividade. O mesmo se verificou para o filme PTN 80/20 em tampão fosfato pH 9.

Através dos valores de potencial em circuito aberto, cuja evolução no tempo se encontra representada na figura 44, e comparando-os com os valores de potencial de oxidação dos picos nos mesmos meios, tabela 13, podemos verificar que para os valores de pH 7, 9 e 12 a própria solução, sem a aplicação de potencial, oxida o polímero.

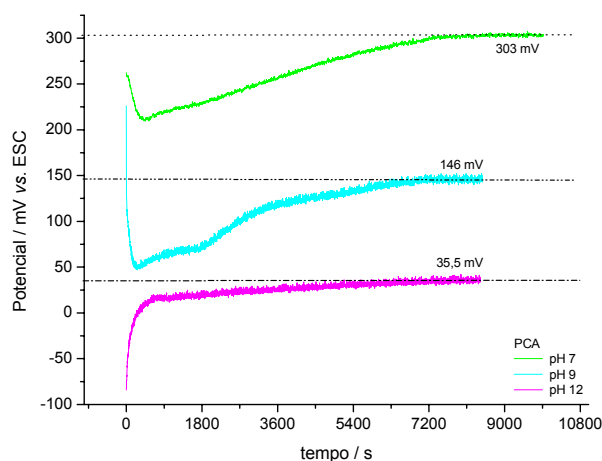


Figura 44 - Potencial de circuito aberto dos filmes PTN 80/20 em soluções tampão fosfato pH 7 (---), pH 9 (---) e pH 12 (---).

Por outro lado, verifica-se que o aumento da concentração de iões HO^- , leva a que o potencial em circuito aberto do filme em tampão fosfato diminua, o que também dá indicação do estabelecimento de interações entre o filme e estes iões.

Pode, pois, concluir-se que os filmes de politionina são estáveis e electroactivos numa gama alargada de valores de pH, sendo a conversão redox inibida em meios alcalinos mas não ocorrendo destruição do filme.

4.2.4. Participação Iónica na Conversão Redox da PTN

No sentido de melhor compreender os processos que ocorrem nos filmes de PTN, estudou-se a variação de massa que acompanha a conversão redox em meio ácido e neutro, recorrendo à microbalança electroquímica de cristal de quartzo (MECQ).

O efeito da velocidade de varrimento de potencial, da espessura dos filmes e do electrólito na variação de massa que acompanha a conversão redox de filmes de PTN, foi estudado para filmes crescidos potenciodynamicamente com 20, 40 e 80 ciclos de potencial, que se caracterizaram em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ (pH 1,3) e MES $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ (pH 6,6) a 5 e 20 mV s^{-1} e em Tampão Fosfato $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ (pH 7) a 20 mV s^{-1} . A tabela 14 apresenta os parâmetros obtidos para os filmes PTN 80/20 em meio ácido e neutro (MES). Em ambos os meios verificou-se maior variação total de frequência para a velocidade de variação de potencial mais baixa (5 mV s^{-1}), o que está de acordo com a maior extensão da conversão redox a baixas velocidades. Em meio neutro, são observáveis dois domínios de variação de frequência, correspondendo a um aumento inicial de massa, menor para baixa velocidade, seguido de diminuição de massa a valores de potencial mais catódicos, ocorrendo esta em maior extensão a 5 mV s^{-1} .

Tabela 14 - Valores de cargas de oxidação e redução e variação de frequência no varrimento catódico em filmes de PTN 80/20 caracterizados em diferentes meios a 5 e 20 mV s^{-1} .

Meio	H_2SO_4		MES	
$v / \text{mV s}^{-1}$	5	20	5	20
$Q_{\text{ox.}} / \text{mC cm}^{-2}$	1,4	1,2	1,8	1,3
$Q_{\text{red.}} / \text{mC cm}^{-2}$	1,6	1,3	1,4	1,4
R	0,9	0,9	1,3	0,9
$\Delta f / \text{Hz}$	-8,5	-7,7	-0,7 / +1,9	-1,4 / +1,0

Q - cargas de oxidação e redução; R - razão entre as cargas de oxidação e redução; v - velocidade de varrimento de potencial; Δf - variação de frequência no varrimento catódico.

A figura 45 ilustra os resultados voltamétricos e gravimétricos registados simultaneamente, para filmes com diferentes espessuras (PTN 20/20, PTN 40/20 e PTN 80/20) a 20 mV s^{-1} em soluções de H_2SO_4 , MES $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ e tampão fosfato $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$.

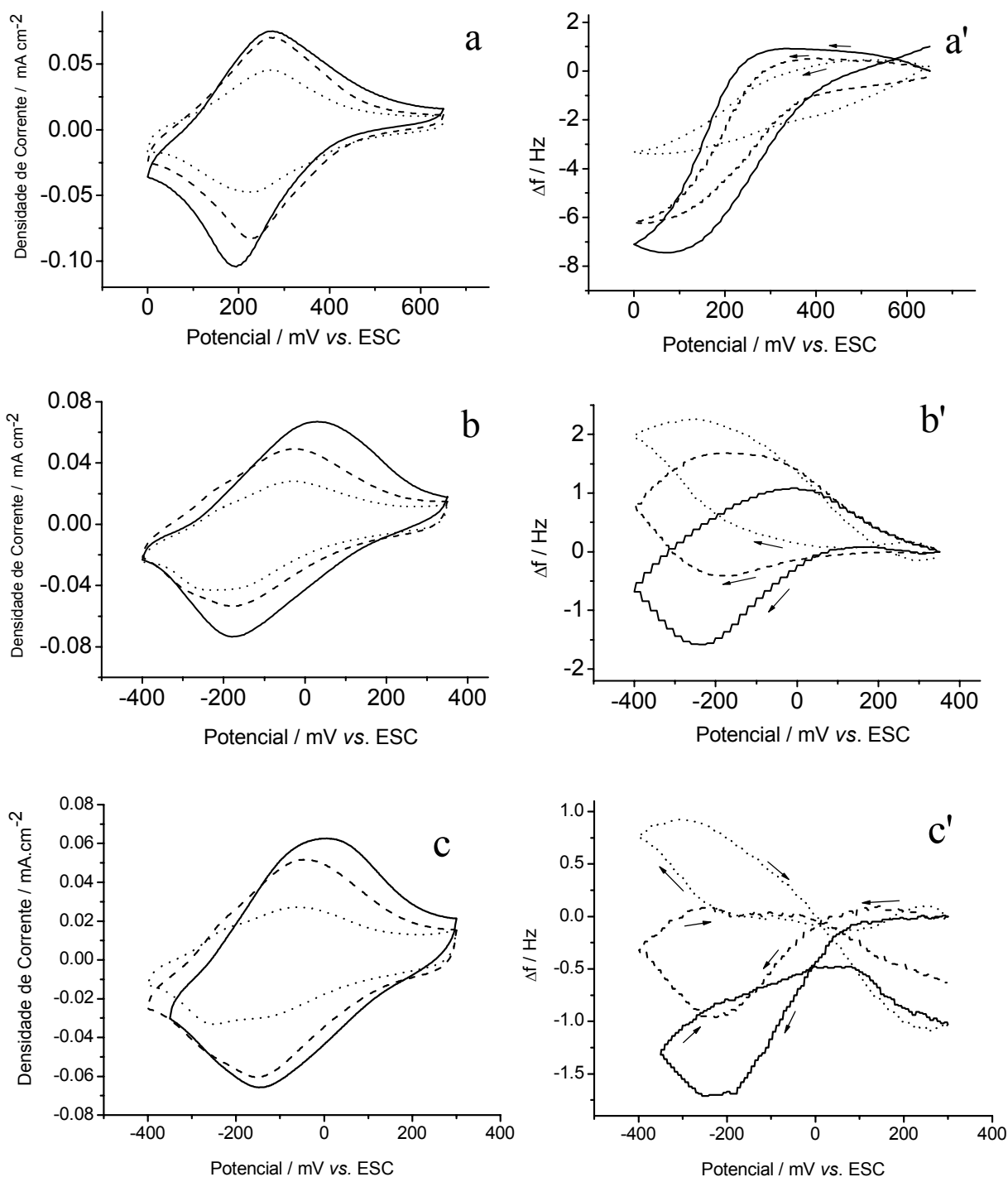


Figura 45 - Voltamogramas cíclicos (a, b, c) e variação de frequência (a', b', c') em função do potencial na caracterização dos filmes (—) PTN 80/20, (---) PTN 40/20 e (.....) PTN 20/20 em (a) H_2SO_4 $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, (b) MES $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ (pH 6,6) e (c) tampão fosfato $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ (pH 7); $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Como seria de esperar, nestes meios, a electroactividade e as variações de frequência, dependem da espessura dos filmes. Os resultados experimentais obtidos, compilados na tabela 15, foram comparados com os valores esperados de variação de massa de acordo com os esquemas reaccionais, propostos na literatura, para a conversão redox do PTN em meio ácido e neutro.

Tabela 15 - Variações de massa esperada e experimental para a conversão redox de filmes de PTN com diferentes espessuras em meio ácido e neutro.

Meio	Filme	E_1 / mV	$\Delta m_{\text{exp } 1}$ / ng cm ⁻²	E_2 / mV	$\Delta m_{\text{exp } 2}$ / ng cm ⁻²	Δm_1 / ng cm ⁻²	Δm_2 / ng cm ⁻²
H ₂ SO ₄ 0,05 mol dm ⁻³	PTN 20/20	600 a 0	23,6	---	---	346	7,0
	PTN 40/20		46,8		---	513	10,0
	PTN 80/20		55,3		---	587	11,8
MES 0,05 mol dm ⁻³ (pH 6,6)	PTN 20/20	400 a -200	-4,1	-200 a -400	-9,6	-527	5,5
	PTN 40/20		3,5		-8,4	-967	10,1
	PTN 80/20		11,5		-6,3	-1255	13,1
Tampão Fosfato 0,1 mol dm ⁻³ (pH 7)	PTN 20/20	350 a -200	-1,2	-200 a -350	-5,2	-271	5,7
	PTN 40/20		6,7		-4,4	-562	11,9
	PTN 80/20		11,8		-2,6	-558	11,8

E – intervalo de potencial no qual ocorrem as variações de massa $\Delta m_{\text{exp } 1}$ e $\Delta m_{\text{exp } 2}$; Δm_{exp} - variações de massa observadas durante a conversão redox do filme de PTN no varrimento catódico no intervalo de potencial E_1 e E_2 ; Δm_1 - variação de massa calculada para a conversão redox do PTN envolvendo três-protões/dois-electrões em meio ácido e um-protão/dois-electrões em meio neutro; Δm_2 - variação de massa calculada para a conversão redox do PTN envolvendo dois-protões/dois-electrões em meio ácido e neutro.

De acordo com o referido na análise do efeito do pH no comportamento redox da PTN com a informação disponível na literatura [31], a conversão redox da PTN em meio ácido ocorre de acordo com um mecanismo que envolve três-protões/dois-electrões, o que implica a incorporação de um anião na redução, figura 46, para compensação de carga. A variação de frequência observada experimentalmente, figura 45-a', suporta tal mecanismo.

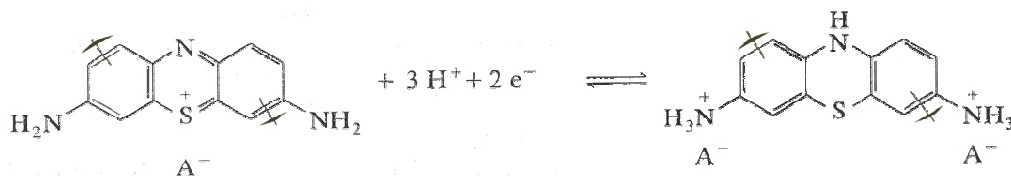


Figura 46 - Mecanismo proposto para a conversão redox da PTN em meio ácido [13].

A variação de massa experimental (Δm_{exp}), é menor que a variação de massa esperada (Δm_1), estimada a partir da densidade de locais electroactivos no filme (assumindo três protões e um contra-ão incorporados na redução do filme), tabela 15. No entanto, comparando a variação de massa experimental com a calculada para um mecanismo

envolvendo dois-protões/dois-electrões (Δm_2) (entrada de 2 protões), os valores experimental e calculado apresentam-se mais próximos, tabela 15.

Em MES a variação de massa observada é menor do que em meio ácido e distinguem-se as duas zonas, já acima referidas, figura 45 – b. No varrimento catódico, a primeira zona, até cerca de -200 mV mostra-se dependente da espessura do filme, enquanto que para valores de potencial mais negativos o declive segundo o qual a variação ocorre é semelhante para todos os filmes estudados.

Na redução do filme PTN 20/20, neste meio, é apenas observável uma perda de massa, embora ocorrendo diferentes regimes, nos dois intervalos de potencial, aproximando-se do mecanismo 2. Para os filmes mais espessos, no primeiro segmento a variação de massa tem uma resultante positiva e o segundo segmento corresponde a uma diminuição de massa, sugerindo a contribuição de ambos os mecanismos considerados.

As variações de massa experimentais ($\Delta m_{\text{exp.1}}$ e $\Delta m_{\text{exp.2}}$) e calculadas (Δm_1 e Δm_2) assumindo processos envolvendo um-protão/dois-electrões e dois-protões/dois-electrões, respectivamente, constam da tabela 15. O primeiro mecanismo implica, na redução, a saída de um anião do interior do filme para a solução e entrada de um protão; Δm_2 pressupõe um mecanismo envolvendo dois-protões/dois-electrões e neste caso, a variação de massa experimental e a esperada são mais próximas, como se mostra na tabela 15.

Em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ com pH 7, observa-se um comportamento semelhante ao obtido em MES no varrimento catódico, no entanto, o valor de frequência final após cada ciclo de potencial afasta-se do valor inicial ($\approx 0 \text{ Hz}$) para valores negativos, correspondendo a um aumento de massa, figura 45 – c e c'. Este facto parece indicar que os filmes de politionina sofrem alterações irreversíveis neste meio, as quais poderão estar relacionadas com a inserção de aniões fosfato. Como já vimos anteriormente no ponto 4.2.3., o filme PTN 80/20 apresenta menor electroactividade neste meio do que noutros com valores de pH semelhantes, o que pode ser devido à incorporação daqueles aniões.

Os presentes resultados apontam para a contribuição de ambos os mecanismos considerados, tanto em meio ácido como neutro; nas presentes condições experimentais, filmes espessos e escala de tempo experimental, podem estar na origem dos desvios observados. Por outro lado, a variação de massa obtida pressupõe que a equação de Sauebrey se aplica o que corresponde a admitir um comportamento de uma camada rígida, que para polímeros desta natureza não é totalmente aplicável.

4.2.5. Caracterização Morfológica da PTN por MFA e MEV

A caracterização morfológica dos filmes de politionina foi efectuada por microscopia electrónica de varrimento (MEV) e por microscopia de força atómica (MFA).

As imagens obtidas para o filme PTN 80/20 por MEV, revelaram uma superfície muito lisa e homogénea, não sendo possível distinguir quaisquer detalhes superficiais.

Eléctrodos de platina modificados com filmes de politionina com diferentes espessuras e crescidos em modos potencioestático e potenciodinâmico foram caracterizados por MFA, *ex situ* em modo “*tapping*”. Na figura 47 encontram-se imagens $1 \times 1 \mu\text{m}$ de topografia e fase obtidas para os filmes PTN 20/20, 40/20 e 80/20. Na imagem obtida para o filme mais fino, pode ver-se a presença de uma camada compacta de polímero constituída por pequenas estruturas globulares com diâmetros de cerca de 20 nm e nódulos distribuídos pela superfície com tamanhos entre 30 e 70 nm. Estes nódulos parecem estar relacionados com a formação subsequente de uma segunda camada de polímero com estrutura distinta como indica a imagem representada na figura 47 - a', onde se pode observar distinção de fase entre a camada compacta e os nódulos. Esta observação está em boa concordância com os resultados electroquímicos (Γ vs. Δm) apresentados no capítulo 3.

Com o aumento do número de ciclos de potencial na electropolimerização, as estruturas globulares parecem formar agregados, figura 47 - b, com diminuição do contraste de fase, figura 47 - b'. Para o filme mais espesso, PTN 80/20, é visível a formação de domínios compactos de tamanho e forma irregulares, figura 47 - c, e verifica-se menor contraste de fase, figura 47 - c'. O valor de rugosidade rms, R_q , obtido a partir de imagens $2 \times 2 \mu\text{m}$ para os filme PTN 20/20 e 40/20, de 3,3 e 3,8 nm, respectivamente, são próximos; no entanto, apesar da formação dos domínios compactos com o espessamento do filme, para o filme PTN 80/20 obteve-se um valor de R_q superior (5,6 nm) que se deve à presença de planaltos isolados por sulcos pronunciados, quando comparados com os filmes finos.

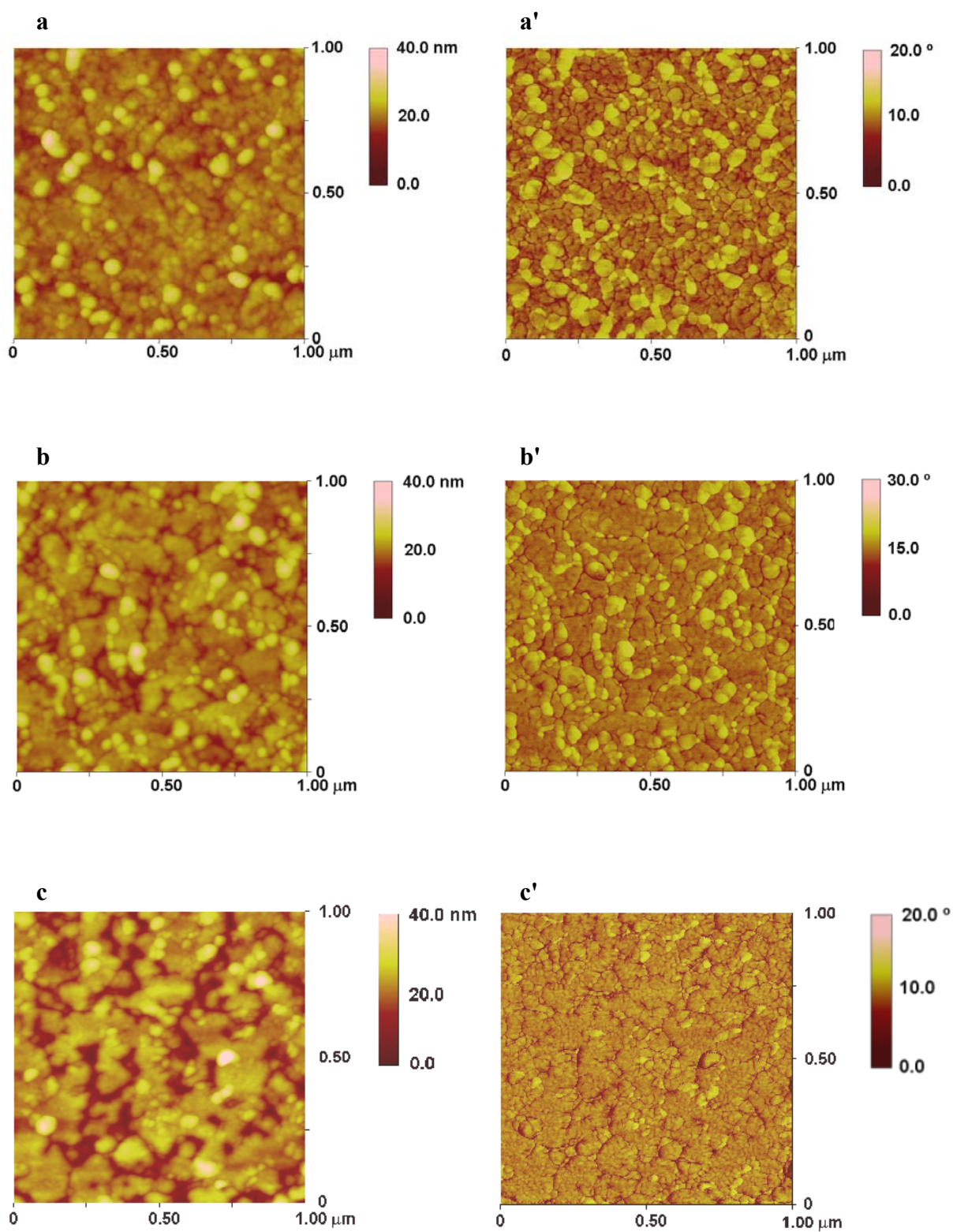


Figura 47 - Imagens de topografia (a, b, c) e fase (a', b', c') obtidas por MFA, para os filmes (a) PTN 20/20, (b) PTN 40/20 e (c) PTN 80/20.

As imagens de MFA, $2 \times 2 \mu\text{m}$, e os correspondentes perfis, obtidas para os filmes PTN 80/20 e PTN 1250/6000 encontram-se representadas na figura 48 - a e b, respectivamente. Foi possível verificar que, apesar de os filmes apresentarem electroactividade semelhante, como vimos anteriormente, a sua topografia é bastante diferente. Enquanto que o filme PTN 80/20 é constituído pelos domínios compactos, acima referido, o filme PTN 1250/6000, crescido em modo potenciostático apresenta uma superfície mais regular, constituída por pequenas estruturas globulares com dimensões semelhantes às observadas para a camada compacta no filme PTN 20/20. Sobre a superfície destacam-se alguns nódulos, tal como observado para os outros filmes. Embora, em princípio, o modo de crescimento potenciostático não favoreça a reorganização estrutural, o filme crescido nestas condições apresenta menor rugosidade, $R_q = 2,9 \text{ nm}$, do que o filme crescido em modo potenciodinâmico ($R_q = 5,6 \text{ nm}$), como se pode verificar pelos perfis representados na figura 48.

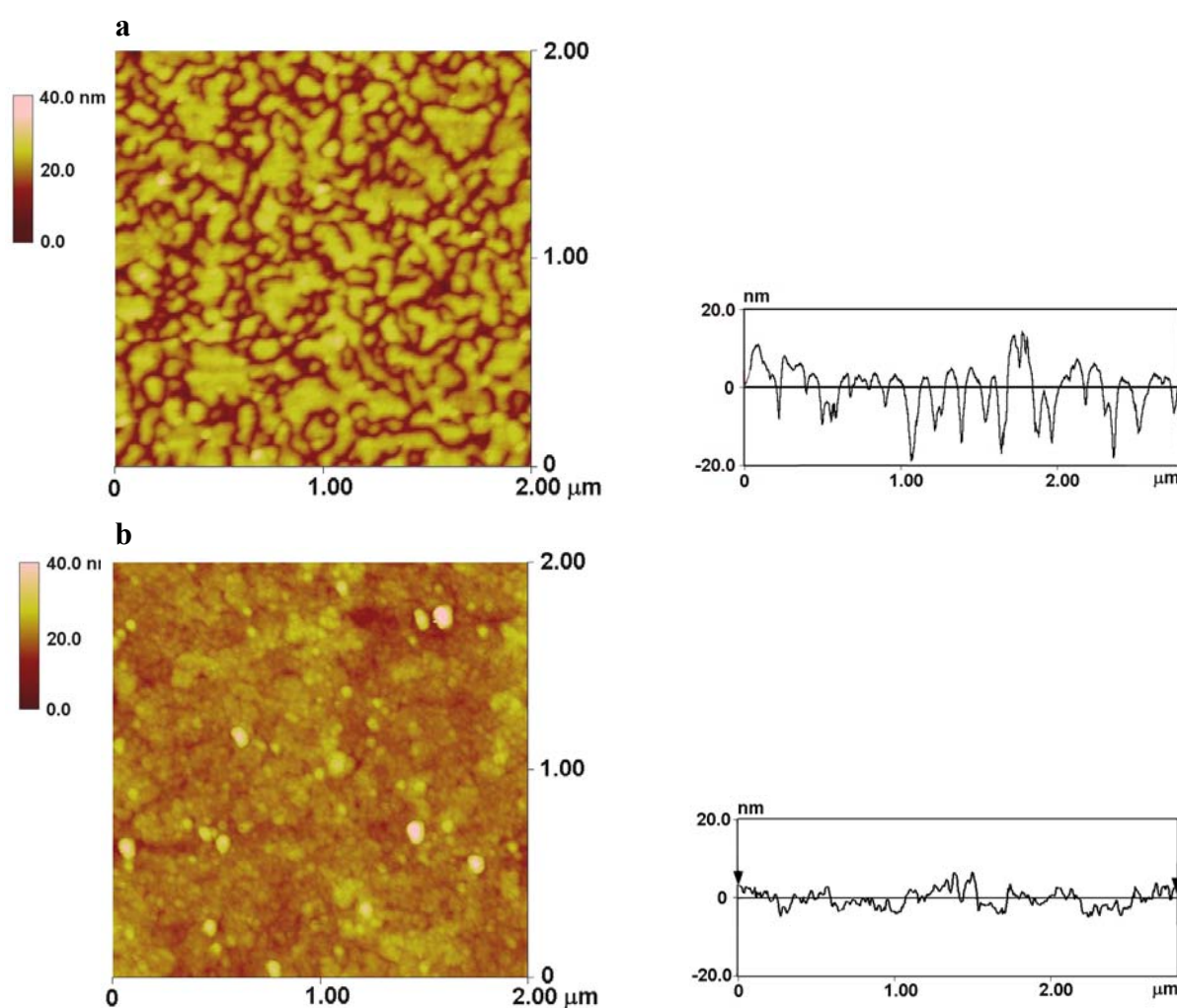


Figura 48 - Imagens de topografia e perfis correspondentes obtidas por MFA, para os filmes (a) PTN 80/20, (b) PTN 1250/6000.

4.2.6. Caracterização dos Eléctrodos Modificados por MVE

Os resultados obtidos por MVE que a seguir se apresentam fazem parte de um estudo ainda preliminar inserido na implementação da técnica de Microscopia de Varrimento Electroquímico. Nesse sentido, foram efectuadas curvas de aproximação (CA) das pontas de platina (A e B) aos substratos ouro e PTN; linhas de varrimento (LV) em x e y a distância em z constante (compreendendo zonas de ouro, PTN e epoxi), e varrimentos de áreas (VA) no plano x-y a distância z constante (em potencial de circuito aberto, PCA, e sob potencial aplicado, E_s) em diversos meios contendo espécies electroactivas.

Neste estudo, as pontas de platina, A (100 μm) e B (10 μm), foram previamente usadas em voltametria cíclica de soluções contendo as espécies electroactivas: $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ em KCl 0,1 mol dm^{-3} e Tris-HCl 0,01 mol dm^{-3} (pH 8,5), $\text{Co}(\text{bpi})_3^{2+}$ em MES 0,05 mol dm^{-3} (pH 6,7). Este procedimento permitiu testar as pontas e o bom funcionamento do sistema, tendo-se obtido o comportamento electroquímico esperado, representado na figura 49.

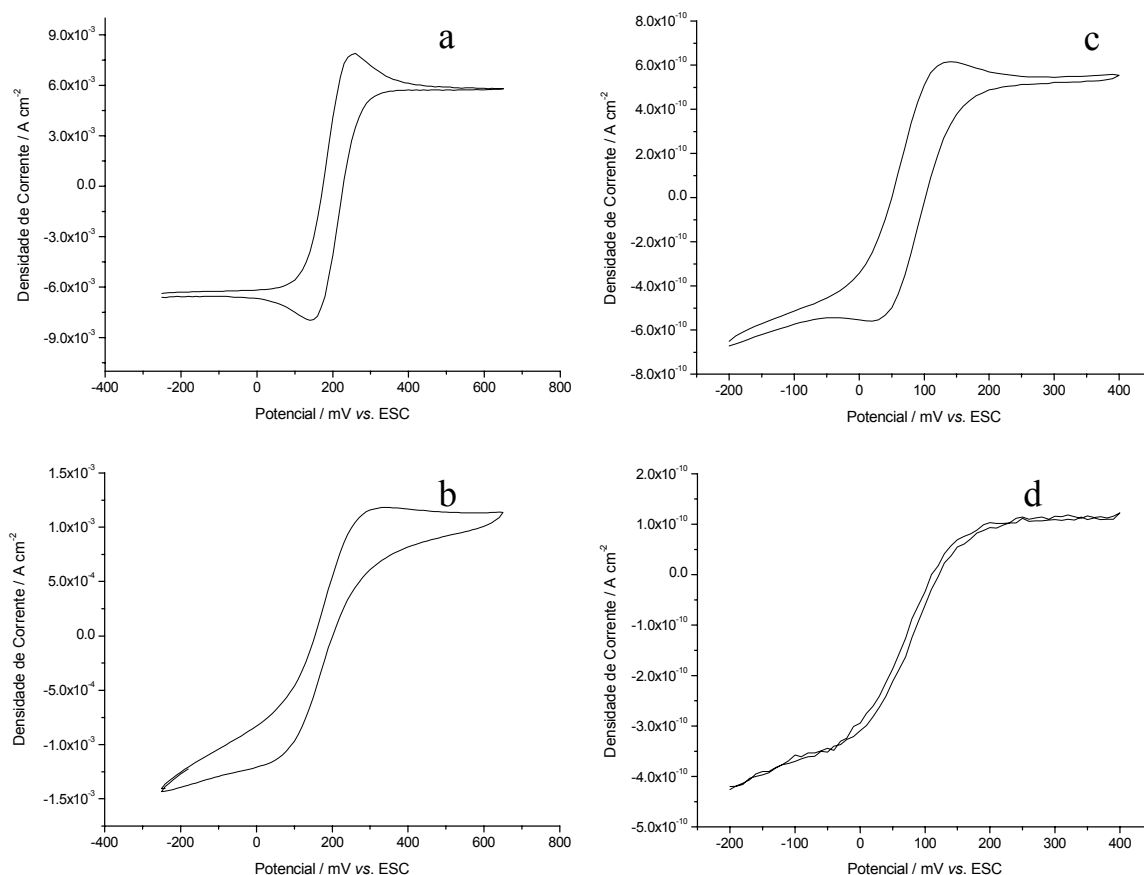


Figura 49 - Voltamogramas cíclicos da caracterização dos microeléctrodos-ponta de platina: (a, b e c) A e (d) B em soluções contendo os complexos (a) $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 25 mmol dm^{-3} em KCl 0,1 mol dm^{-3} , (b) $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 5 mmol dm^{-3} em Tris-HCl 0,01 mol dm^{-3} e (c e d) $\text{Co}(\text{bpi})_3^{2+/3+}$ em MES 0,05 mol dm^{-3} ; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Tabela 16 - Valores de potenciais para a oxidação e redução das espécies electroactivas no microeléctrodo de platina; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Espécies Electroactivas	$\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$		$\text{Co(bpi)}_3^{2+/3+}$	
Meios	KCl $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$	Tris-HCl $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ pH 8,5	MES $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ pH 6,7	
Ponta	100 μm			
$E_{\text{ox.}} / \text{mV}$	235	226	120	118
$E_{\text{red.}} / \text{mV}$	168	101	49	53
$\Delta E / \text{mV}$	67	125	71	65

E – potenciais de oxidação (ox.) e redução (red.) das espécies electroactivas; ΔE – diferença de potencial entre os picos.

Através dos voltamogramas apresentados foram seleccionados os valores de potencial correspondentes à oxidação e redução das espécies electroactivas em solução, apresentadas na tabela 16, para aplicação nos ensaios posteriores.

Através das curvas de corrente em função da distância, d , do eléctrodo-ponta à superfície da amostra é possível, como se descreve no capítulo 2, obter informação acerca da condutividade dos substratos.

As CA experimentais foram normalizadas e comparadas com as curvas teóricas, calculadas através das equações 2 e 3 para substratos condutores e isoladores, respectivamente [90, 96]:

$$\text{Substrato condutor:} \quad \frac{i_T}{i_{T,\infty}} = k_1 + \frac{k_2}{L} + k_3 \exp\left(\frac{k_4}{L}\right) \quad (2)$$

$$\text{Substrato isolador:} \quad \frac{i_T}{i_{T,\infty}} = \frac{1}{k_1 + \frac{k_2}{L} + k_3 \exp\left(\frac{k_4}{L}\right)} \quad (3)$$

onde L é a razão entre \underline{d} (distância ponta/substrato) e \underline{a} (raio do eléctrodo-ponta de platina) e os valores dos parâmetros k_1 a k_4 encontram-se na tabela 17. Foi medido o parâmetro RG das pontas que corresponde à razão entre \underline{a} e o raio da superfície isoladora envolvente, R_g , tendo-se obtido valores de cerca de 2 para as pontas A e B. A distância, d , foi determinada a partir de valores experimentais de i_T e das curvas teóricas. Os valores de corrente, $i_{T,\infty}$, apresentados na tabela 18, foram obtidos a partir da equação 4 e dos coeficientes de difusão, D , das espécies (tabela 19).

Tabela 17 - Valores dos parâmetros das equações 2 e 3.

RG	Substrato	k ₁	k ₂	k ₃	k ₄
2	Condutor [90]	0,6686604	0,6973984	0,3218171	-1,744691
	Isolador [96]	0,76179	0,60983	0,23866	-2,03267

$$i_{T,\infty} = 4 n F D c a \quad (4)$$

sendo n e c, respectivamente, o número de electrões e a concentração da espécie electroactiva envolvida na reacção e F a constante de Faraday.

Tabela 18 - Valores de corrente, $i_{T,\infty}$, calculados a partir da equação 4.

Ponta	Meios	$i_{T,\infty} / A$		
		$Fe(CN)_6^{4-}$	$Fe(CN)_6^{3-}$	$Co(bpi)_3^{2+}$
a = 50 μm	⁽¹⁾ KCl 0,1 mol dm ⁻³	$0,32 \times 10^{-6}$	$0,34 \times 10^{-6}$	---
	⁽²⁾ Tris-HCl 0,01 mol dm ⁻³	$63,4 \times 10^{-9}$	$67,3 \times 10^{-9}$	---
a = 50 μm	MES	---	---	$45,3 \times 10^{-9}$
a = 5 μm	0,05 mol dm ⁻³	---	---	$4,5 \times 10^{-9}$

(1) - c ($Fe(CN)_6^{4/3-}$) = 25 mmol dm⁻³; (2) - c ($Fe(CN)_6^{4/3-}$) = 5 mmol dm⁻³.

Tabela 19 - Valores de coeficientes de difusão, D, das espécies electroactivas em solução.

Espécies Electroactivas	$Fe(CN)_6^{4-}$ [97]	$Fe(CN)_6^{3-}$ [97]	$Co(bpi)_3^{2+}$ [98]
D / cm ² s ⁻¹	$6,61 \times 10^{-6}$	$6,98 \times 10^{-6}$	$4,7 \times 10^{-6}$

Nas figuras 50 a 53 observam-se as CA com um comportamento típico para substratos condutor (ouro) e isolador (epoxi), independentemente do meio e do potencial aplicado à ponta e ao substrato de ouro. As curvas experimentais da figura 52 apresentam algum desvio das curvas calculadas para essas condições, o que pode estar relacionado com a baixa força iónica da solução e consequente perturbação da difusão das espécies, provocando o afastamento.

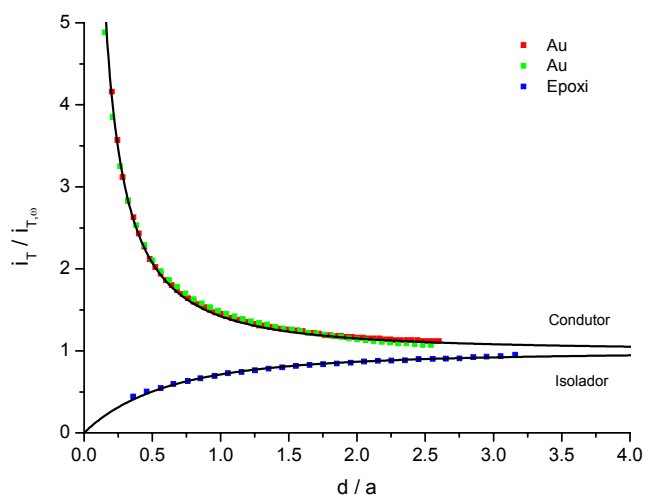


Figura 50 - Curvas de aproximação do eléctrodo-ponta A ($E_T = 150$ mV); E_S : (■) e (■) PCA e (■) 290 mV, em KCl $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ e $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 25 mmol dm^{-3} e comparação com as CA teóricas.

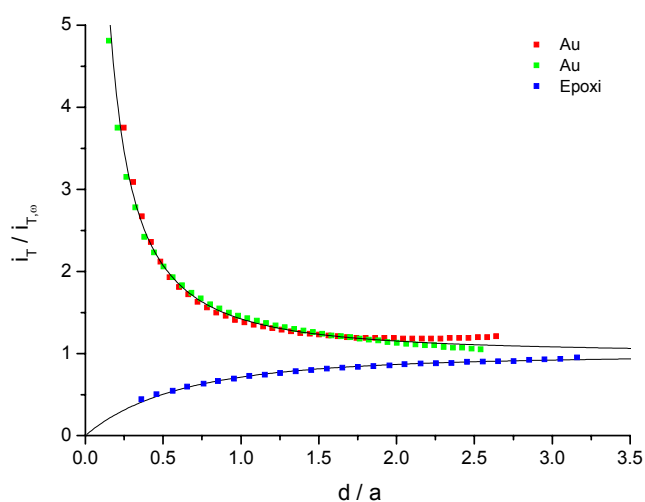


Figura 51 - Curvas de aproximação do eléctrodo-ponta A ($E_T = 250$ mV); E_S : (■) e (■) PCA e (■) 120 mV, em KCl $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ e $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 25 mmol dm^{-3} e comparação com as CA teóricas.

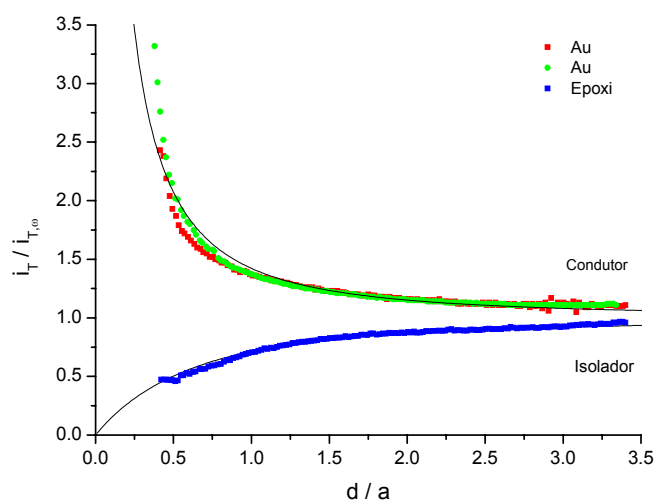


Figura 52 - Curvas de aproximação do eléctrodo-ponta A com $E_S = \text{PCA}$ e E_T : (■) e (■) 130 mV e (■) 40 mV, em MES $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ e $\text{Co}(\text{bpi})_3^{2+/3+}$ 5 mmol dm^{-3} e comparação com as CA teóricas.

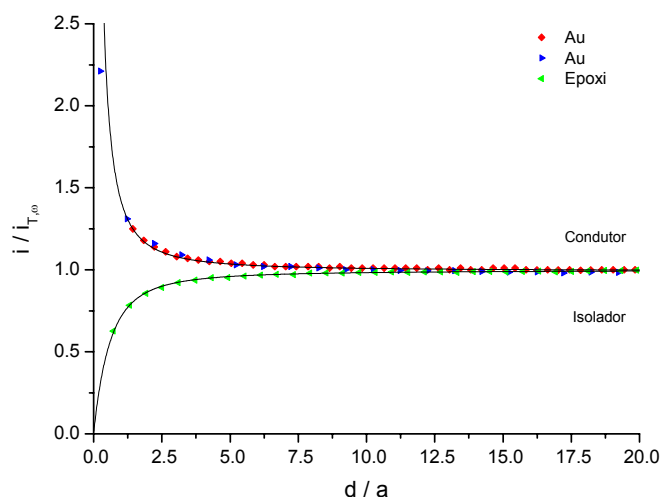


Figura 53 - Curvas de aproximação do eléctrodo-ponta B com $E_T = 40$ mV e $E_S = \text{PCA}$ com S: (■) e (■) ouro e (■) PTN 80/20, em MES $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ e $\text{Co(bpi)}_3^{2+/3+}$ 5 mmol dm^{-3} e comparação com as CA teóricas.

As curvas de aproximação permitiram, assim, fazer uma primeira avaliação acerca da condutividade dos substratos e obter um modo de determinar a distância da ponta ao substrato, d , a aplicar nos varrimentos lineares e de áreas, de modo a ser possível obter uma boa resolução sem que a ponta contacte com o substrato.

Nas LV, quanto maior a aproximação da ponta ao substrato, maior a diferença de corrente observada entre as zonas condutoras e isoladoras, permitindo obter maior resolução, como ilustrado na figura 54. A aplicação em simultâneo de potencial ao substrato, para a reacção inversa à que ocorre na ponta, também conduz a um aumento da corrente na ponta, figura 55 - a e b.

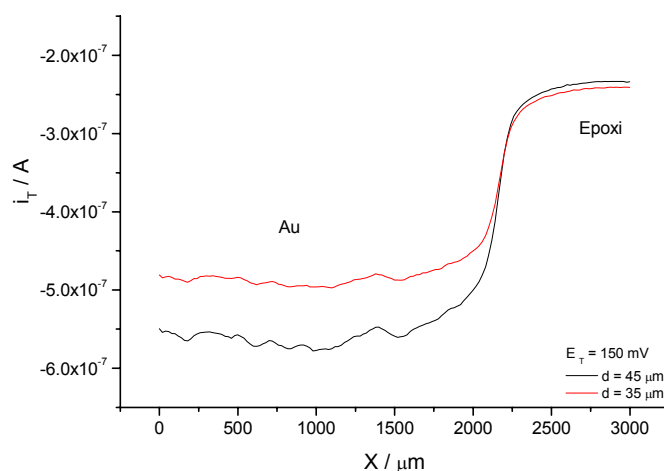


Figura 54 - Linhas de varrimento em solução de $\text{Fe(CN)}_6^{4-/3-}$ $0,025 \text{ mol dm}^{-3}$ em KCl $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ a distâncias d de (—) $35 \mu\text{m}$ e (—) $45 \mu\text{m}$ do substrato Au/Epoxi.

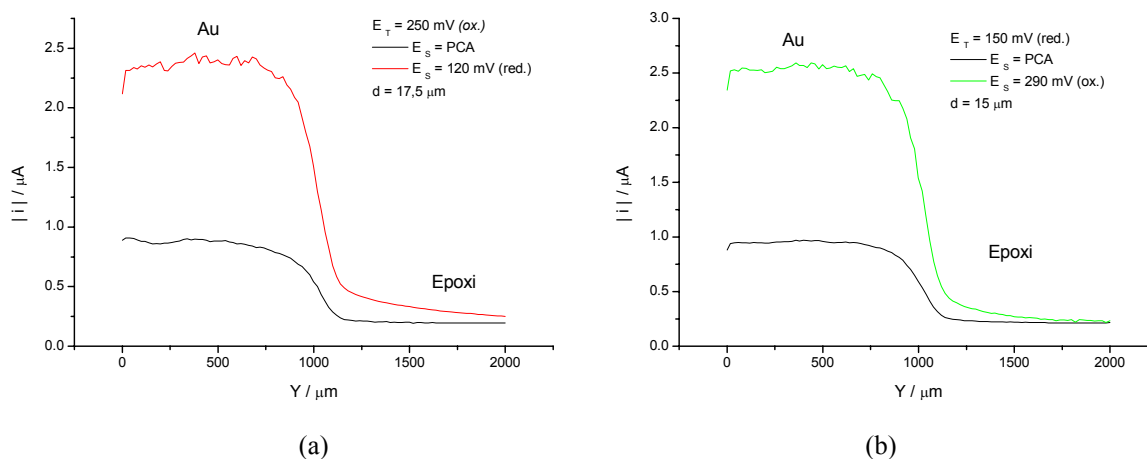


Figura 55 - Linhas de varrimento da ponta A, a distância do substrato Au/Epoxi constante, em solução KCl 0,1 mol dm⁻³ contendo Fe(CN)₆^{4-/3-}; E_s (—) 310 mV (PCA), (—) 120 mV e (—) 290 mV (a) E_T = 250 mV e (b) E_T = 150 mV.

Nas LV sobre o eléctrodo modificado com PTN 80/20 em solução de KCl contendo o complexo de ferro, observou-se menor corrente de “feedback” sobre a área modificada com o filme, como se ilustra na figura 56. Ainda que os resultados apresentados sejam preliminares para o sistema em causa, a baixa condutividade do PTN 80/20 assim observada pode dever-se a alterações do polímero sofridas neste meio.

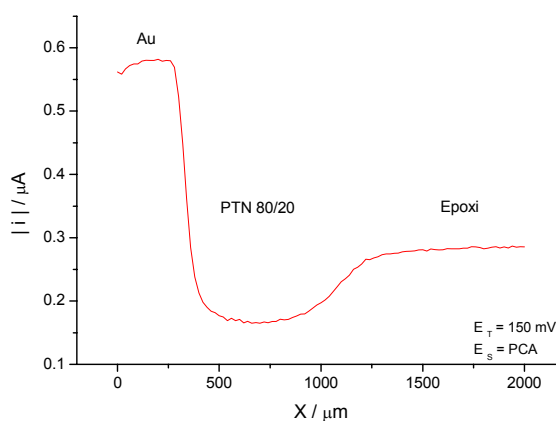


Figura 56 - Linha de varrimento da ponta A em KCl 0,1 mol dm⁻³ e Fe(CN)₆^{4-/3-} sobre o substrato Au/PTN80/20/Epoxi; E_{T,A} = 150 mV e E_s = PCA.

Na sequência dos resultados obtidos em KCl, foi seleccionado o MES, pH 6,6, e o complexo de cobalto, Co(bpi)₃²⁺. Neste meio os filmes de PTN são estáveis e electroactivos e permitem obter, ainda que fraca, uma resposta à conversão redox do complexo de cobalto, de acordo com os resultados que se apresentam no capítulo 5. Na figura 57, é possível observar que com a aplicação de um potencial de oxidação ao substrato, este apresenta condutividade

intermédia entre o substrato isolador, epoxi, e o condutor, ouro, apontando para alguma condutividade do PTN 80/20 no estado oxidado.

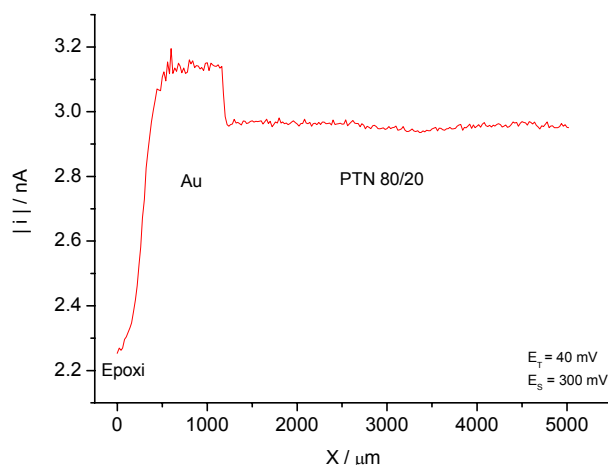


Figura 57 - Linhas de varrimento com a ponta B em solução de $\text{Co}(\text{bpi})_3^{2+/3+}$ no substrato Au/PTN 80/20/Epoxi; $E_S = 300 \text{ mV}$ (ox.) e $E_T = 40 \text{ mV}$ (red.).

Na mesma solução, o varrimento de áreas compreendendo zonas de substrato de ouro e de PTN 80/20, com aplicação de potencial de oxidação na ponta A, permitiu verificar que neste meio o filme no estado reduzido ($E_S = -150 \text{ mV}$), apresenta menor condutividade do que o ouro, como seria de esperar, figura 58. O valor do potencial de redução a aplicar ao substrato foi seleccionado tendo em conta a zona de potencial de redução do filme, figura 42, e das espécies electroactivas em solução.

De notar, é o facto de as correntes surgirem nas imagens 2D e 3D com sinais invertidos, sendo que para reacções de redução no eléctrodo-ponta a corrente é positiva e para reacções de oxidação é negativa de acordo com as definições do equipamento.

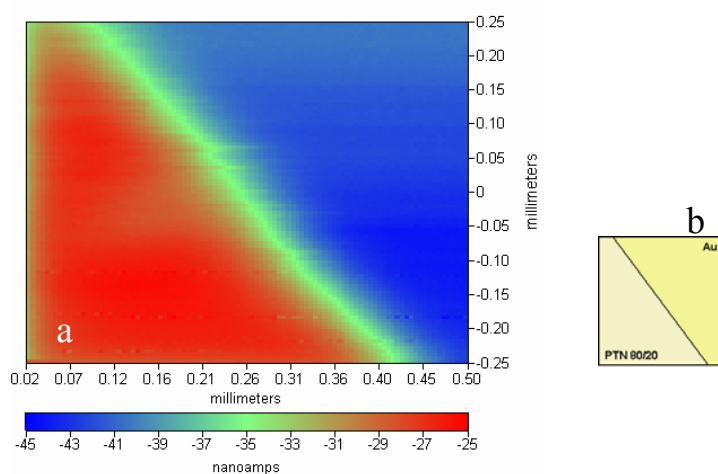


Figura 58 - Imagem a 2D do varrimento de área entre substrato de Au e PTN 80/20 na solução de $\text{Co}(\text{bpi})_3^{2+/3+}$ em MES $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ com a ponta A; (a) $E_T = 130 \text{ mV}$ e $E_S = -150 \text{ mV}$; (b) representação esquemática da área analisada.

Os resultados preliminares apresentados permitem antever grande potencialidade da técnica de MVE no estudo dos eléctrodos modificados. De salientar que este tipo de observações é complexo em sistemas desta natureza com grupos reactivos que podem sofrer degradação. Para efectuar estudos, por esta técnica, é necessária uma escolha criteriosa das condições experimentais e das soluções apropriadas aos sistemas em causa.

Capítulo 5

Propriedades do Eléctrodo Modificado com PTN

5.1. COMPORTAMENTO NA PRESENÇA DE ESPÉCIES ELECTROACTIVAS EM SOLUÇÃO

No sentido de avaliar a transferência electrónica no eléctrodo modificado com politionina, a sua resposta à conversão de espécies electroactivas em solução foi estudada usando complexos de ferro ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$), de ruténio ($\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$) e de cobalto ($\text{Co}(\text{bpi})_3^{2+/3+}$) em diferentes soluções e com diferentes valores de pH: H_2SO_4 0,05 mol dm^{-3} (pH 1,3) tampão fosfato 0,1 mol dm^{-3} (pH 7), MES 0,05 mol dm^{-3} (pH 6,6), Tris-HCl 0,01 mol dm^{-3} (pH 8,5) e peróxido de hidrogénio em tampão fosfato 0,1 mol dm^{-3} (pH 7).

Dos resultados obtidos foi possível verificar que no intervalo de potencial em que o filme é electroactivo e não sofre alterações irreversíveis tanto em meio ácido (0 a +650 mV em H_2SO_4) como em meio neutro (-400 a +300 mV em tampão fosfato pH 7), não se observa resposta da conversão redox do complexo de ferro (que no eléctrodo de platina apresenta os picos de oxidação e redução a 413 e 276 mV e 234 mV e 161 mV, respectivamente) figura 59 - a e b e tabela 20. No entanto, em solução Tris-HCl com pH 8,5, no intervalo de potencial em que o filme é electroactivo, é possível observar a conversão pelo aumento significativo da corrente de redução a valores de potencial inferiores a 100 mV, como ilustrado na figura 59 - c. No intervalo de potencial considerado, apenas é possível observar a redução da espécie $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ e a conversão redox do filme é bloqueada, o que deve estar na origem da diminuição de densidades de corrente entre os 1º e 2º ciclos, na figura 59 - c, devido à oxidação incompleta do filme no primeiro varrimento anódico.

Na presença do complexo de cobalto em solução tampão fosfato, figura 60 - a, a resposta redox do filme é inibida, uma vez que a densidade de corrente dos picos de oxidação e redução do filme diminui significativamente. O aumento de corrente observada a valores de potencial próximos do limite anódico deve estar relacionada com a conversão da espécie electroactiva, o que está de acordo com a gama de potencial em que ocorre a oxidação do complexo em platina (93 mV), tabela 20.

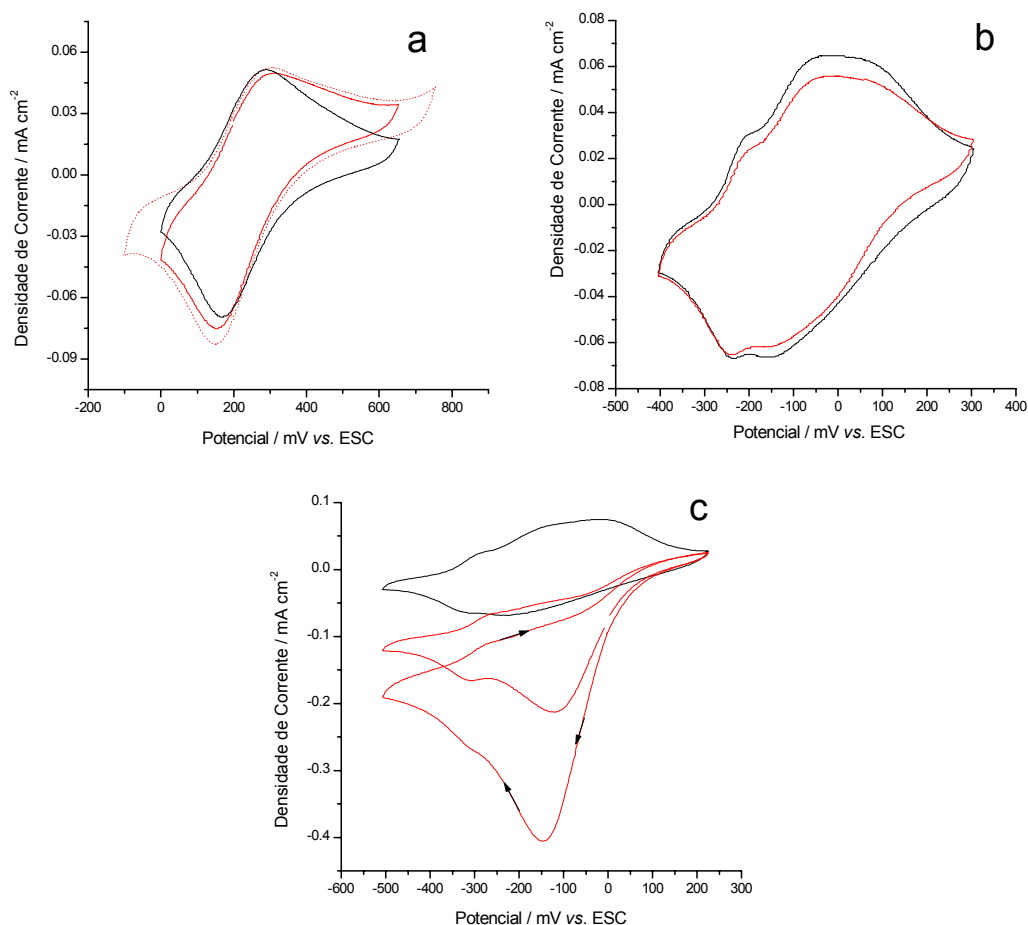


Figura 59 – Voltamogramas cíclicos da caracterização do filme PTN 80/20 (—) em diferentes meios (a) H_2SO_4 pH 1,3, (b) tampão fosfato pH 7 e (c) Tris-HCl pH 8,5 e (—) na presença de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$; $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Tabela 20 – Valores de potencial dos picos de oxidação e redução de espécies electroactivas em platina, em diferentes meios.

Espécies	Meio	Condições	$E_{\text{ox.}} / \text{mV}$	$E_{\text{red.}} / \text{mV}$	$\Delta E / \text{mV}$
$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 1 mmol dm^{-3}	H_2SO_4 pH 1,3	Platina	413	276	137
	Tampão Fosfato pH 7		240	193	47
$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 5 mmol dm^{-3}	Tris-HCl pH 8,5		226	101	125
$[\text{Co}(\text{bpi})_3]^{2+/3+}$ 1 mmol dm^{-3}	MES pH 6,6		130	52	78
	Tampão Fosfato pH 7		90	38	52
$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ 1 mmol dm^{-3}	MES pH 6,6		-124	-195	71

E – potenciais dos picos de oxidação (ox.) e redução (red.) das espécies; ΔE – diferença de potencial entre o pico anódico e catódico.

Em solução MES pH 6,6 contendo o complexo de cobalto, ocorre um comportamento semelhante ao observado em tampão fosfato, figura 60 - b; observa-se uma inibição da resposta do filme e um aumento de corrente a valores de potencial próximos do limite anódico (150 a 350 mV). No varrimento catódico, a resposta da conversão redox do complexo surge a valores de potencial próximo de 0 mV e sobrepõe-se com a do filme, a valores negativos de potencial.

No caso do complexo de rutênio, a resposta redox deste sobrepõe-se à do polímero e um aumento de corrente anódica e catódica é observável, figura 60 - c.

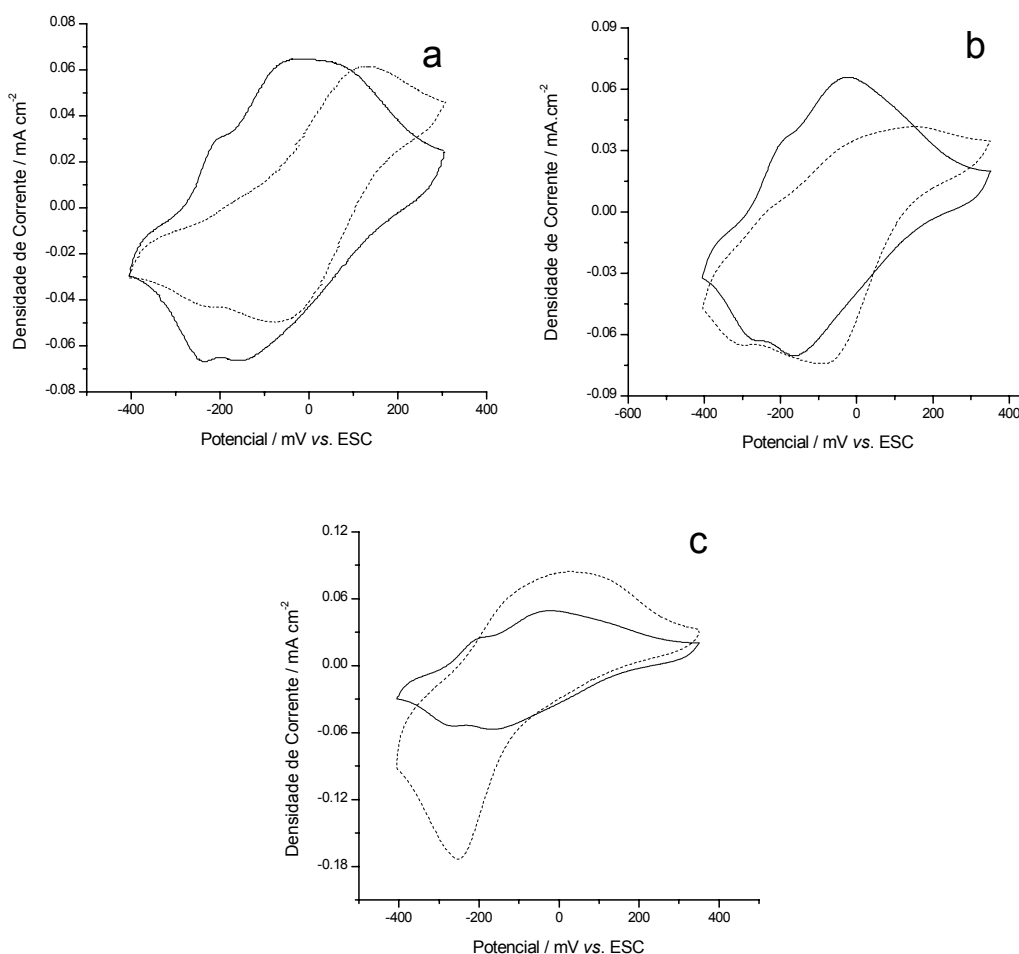


Figura 60 – Voltamogramas cíclicos da caracterização do PTN 80/20 em: (—) (a) Tampão fosfato pH 7 / $\text{Co}(\text{bpi})_3^{2+/3+}$, (b) MES pH 6,6 / $\text{Co}(\text{bpi})_3^{2+/3+}$ e (c) MES pH 6,6 / $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$ e (---) comparação com a caracterização do filme nesses meios apenas em solução de electrólito; $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Comparando a resposta do filme PTN 80/20 antes e após caracterização na solução de MES pH 6,6 contendo o complexo de cobalto, observou-se apenas uma diminuição de electroactividade, que se pode dever a alterações estruturais e/ou incorporação de complexo

no interior do filme com inibição de centros redox, figura 61 - a. O complexo de ruténio provoca alterações mais significativas na resposta redox do filme, figura 61 - b. Para além da diminuição da densidade de corrente dos picos de oxidação e redução do filme, a resposta típica da PTN 80/20 neste meio é alterada de modo irreversível, o que poderá estar relacionado com o facto de na estrutura do polímero existirem grupos amina livres que podem coordenar com o complexo, ficando este irreversivelmente imobilizado na sua estrutura.

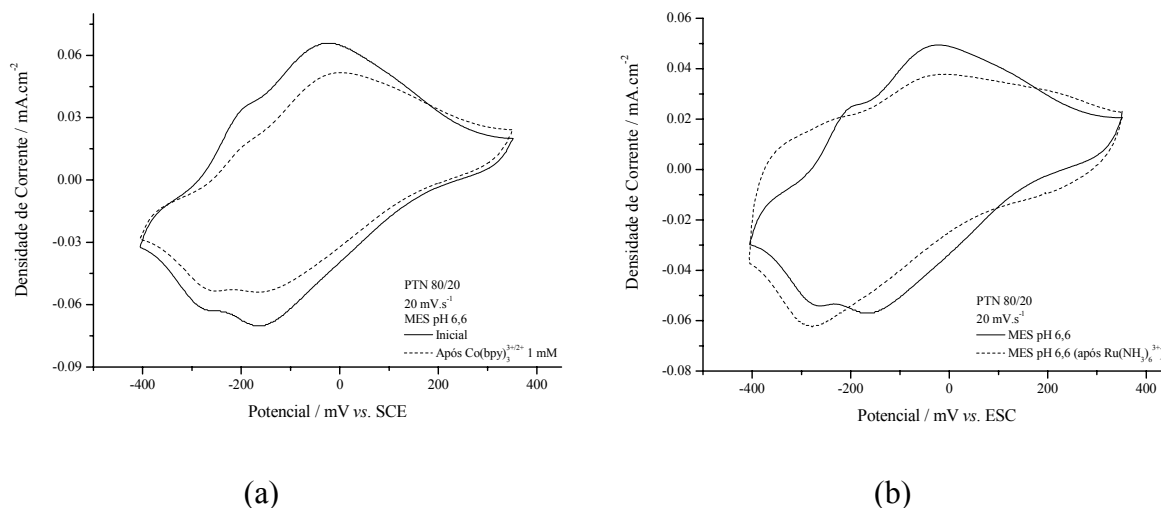


Figura 61 - Voltamogramas cíclicos da caracterização do filme PTN 80/20 numa solução MES pH 6,6 antes (—) e após (----) caracterização na solução contendo os complexos (a) $\text{Co}(\text{bpy})_3^{2+/3+}$ e (b) $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$; $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

No estudo da resposta para a redução do peróxido de hidrogénio, H_2O_2 , verificou-se que os filmes de politionina, PTN 80/20, apresentam actividade electrocatalítica para a redução desta espécie em tampão fosfato pH 7. O aumento da densidade de corrente de redução a valores de potencial de cerca de 0 mV, por comparação com a resposta do filme apenas em tampão fosfato pH 7 deve-se à redução do H_2O_2 e ocorre na zona de potencial em que o processo ocorre em Pt, figura 62. De facto, tem sido reportado na literatura [26, 27, 99] o uso de filmes de politionina na construção de sensores de peróxido de hidrogénio em que a politionina parece apresentar alguma eficiência na transferência electrónica entre a espécie electroactiva em solução, centros redox de enzimas imobilizadas e a superfície do eléctrodo.

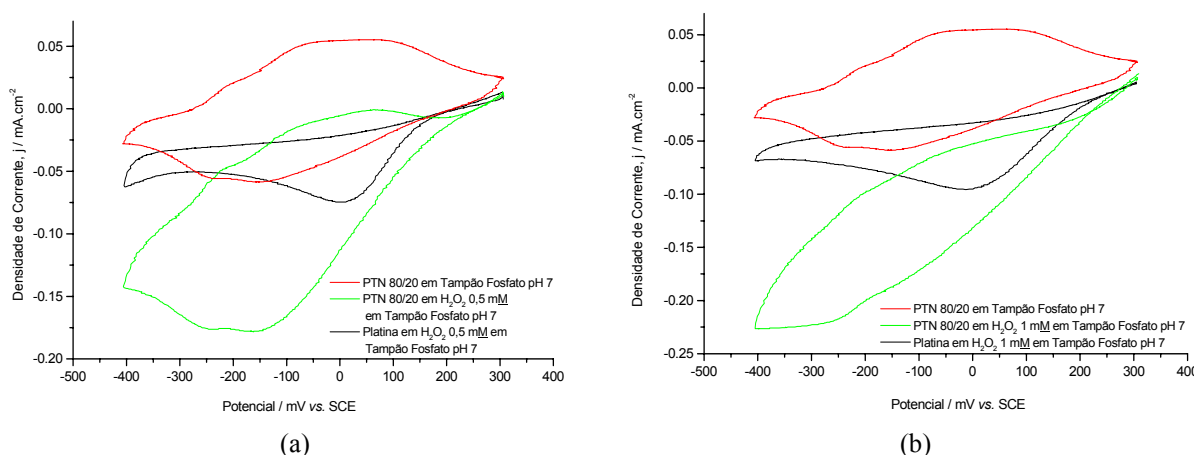


Figura 62 - Voltamogramas cíclicos da catálise da redução do H_2O_2 em Tampão Fosfato pH 7 a 20 mV.s^{-1} com diferentes concentrações de (—) H_2O_2 (a) $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ e (b) 1 mmol dm^{-3} e comparação com a resposta da (—) platina no mesmo meio e do (—) polímero numa solução sem peróxido.

5.2. IMOBILIZAÇÃO DE NUCLEÓTIDOS dGTP E dG20-P NO ELÉCTRODO MODIFICADO

A imobilização de biomoléculas por adsorção em superfícies modificadas que apresentam grupos funcionais apropriados, tem sido estudada [47, 100], nomeadamente a adsorção de ADN em partículas de poli(*p*-clorometilestireno), modificadas com polietilenimina (que contém grupos amina livres), permitindo a interacção com os grupos fosfato do ADN [47]. A interacção electrostática entre os grupos amina da tionina, positivamente carregados, e os grupos fosfato dos ácidos nucleicos, dando origem á formação de complexos também se encontra reportada [99]. Nesse caso, as forças de interacção são mais fortes em soluções com baixos valores de pH; para $\text{pH} > 2,7$, existem menos cargas positivas na tionina e as interacções são fracas.

A presença de grupos funcionais livres apropriados na estrutura do polímero permite, através da química da carbodiimida, o acoplamento covalente entre os grupos fosfato dos nucleótidos, activados pelos agentes *N*-Hidroxysuccinimida (NHS) / *N*-(3-imetilaminopropil)-*N*'-etil-carbodiimida (EDC), e os grupos amina livres na estrutura da politionina [21, 42, 44].

Para o estudo da imobilização dos nucleótidos dGTP e dG20-P em filmes de politionina, PTN 80/20, considerou-se apropriado usar uma solução $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ de MES; por um lado, havia-se observado menor electroactividade do filme PTN 80/20 em tampão fosfato do que nesta solução, e por outro, o objectivo de imobilizar nucleótidos na superfície do eléctrodo modificado por interacções específicas e por acoplamento covalente, implica a

utilização de meio que não provoque interferências. A presença de iões fosfato em solução, competindo com os grupos fosfato dos nucleótidos por locais favoráveis à interacção no polímero, é desvantajosa; para o acoplamento covalente é também necessário garantir que no meio reaccional não haja espécies que possam reagir com os agentes acoplantes, em detrimento da activação dos grupos fosfato dos nucleótidos.

Foram aplicados dois procedimentos: no primeiro, A, os nucleótidos foram adicionados a 2 mL de solução de electrólito na célula da MECQ ficando as interacções a dever-se à adsorção das biomoléculas no polímero; no procedimento B, os nucleótidos foram adicionados à solução de MES contendo os agentes acoplantes ($0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ NHS e $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ EDC) para que a imobilização ocorresse por acoplamento covalente e por adsorção. A imobilização foi monitorizada, durante duas horas, através do registo simultâneo das variações de frequência, Δf (na MECQ) e pela evolução do potencial em circuito aberto (PCA) do eléctrodo modificado. Os resultados da imobilização da dGTP e da dG20-P pelos dois procedimentos, encontram-se nas figuras 63 e 64, respectivamente. A variação de massa do eléctrodo modificado, Δm , calculada a partir dos valores de Δf (eq. (1)), consta da tabela 21. Ainda que as variações de massa calculadas tenham por base o modelo de camada rígida (eq. 1) e que como vimos anteriormente no ponto 4.2.4. não é totalmente aplicável a este tipo de sistemas, os valores obtidos permitem fazer uma análise da imobilização em termos relativos. Verificou-se que a quantidade de dGTP imobilizada no eléctrodo modificado com PTN 80/20 pelo procedimento B ($0,297 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$) é sensivelmente duas vezes a quantidade imobilizada por adsorção ($0,158 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$); para a imobilização da dG20-P obteve-se uma relação semelhante, aumentos de massa de $0,442$ e $0,978 \text{ } \mu\text{g cm}^{-2}$ por adsorção e acoplamento covalente, respectivamente. Considerando como real a área geométrica do eléctrodo ($0,2 \text{ cm}^2$) e as massas moleculares de dGTP ($573,1 \text{ g mol}^{-1}$) e dG20-P ($6941,0 \text{ g mol}^{-1}$) estimaram-se as coberturas superficiais, Γ , de biomoléculas (tabela 21). É de realçar que o valor obtido para a dGTP é cerca de quatro vezes maior do que o observado para a dG20-P, o que pode ser explicado tendo em conta o tamanho, a orientação na superfície do polímero e as repulsões entre os oligonucleótidos imobilizados, carregados negativamente.

O recobrimento superficial teórico correspondente a uma monocamada de dGTP, $\Gamma_{\text{teórico}} = 0,276 \text{ nmol cm}^{-2}$, foi calculado considerando um empacotamento máximo e uma área por molécula de $60,1 \text{ } \text{\AA}$ (estimada com o auxílio do ChemSketch).

Como pode ser observado nas imagens de MFA o valor da área real do polímero é bastante superior à área geométrica. Com base em valores de rugosidade reportados na

literatura para superfícies pouco rugosas (factor de rugosidade de 4 [101]), os valores de recobrimento superficial da dGTP experimentais podem ser normalizados (PTN 80/20 $\Gamma_{dGTP,A} = 0.069$; $\Gamma_{dGTP,B} 0,130$; PTN 1250/6000 $\Gamma_{dGTP,B} 0,137 \text{ nmol cm}^{-2}$) e comparados com o valor teórico.

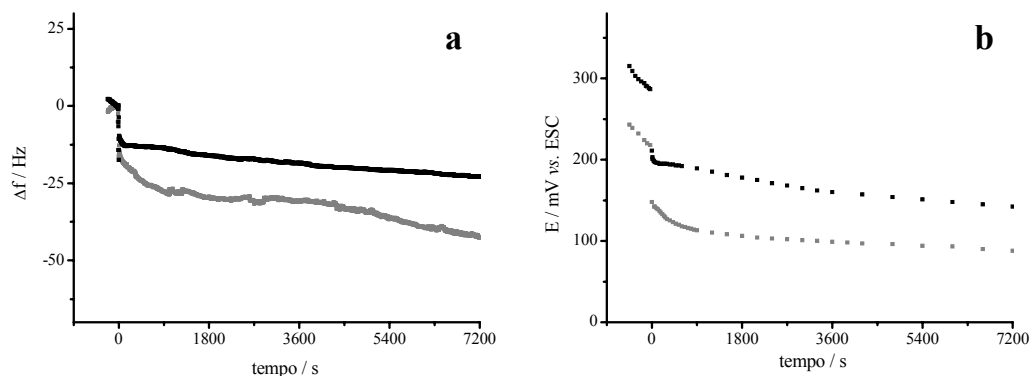


Figura 63 - Variações de (a) frequência e (b) potencial em circuito aberto durante a imobilização da dGTP no filme PTN 80/20 por (■) adsorção (procedimento A) e (■) adsorção e acoplamento covalente (procedimento B) em MES $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$.

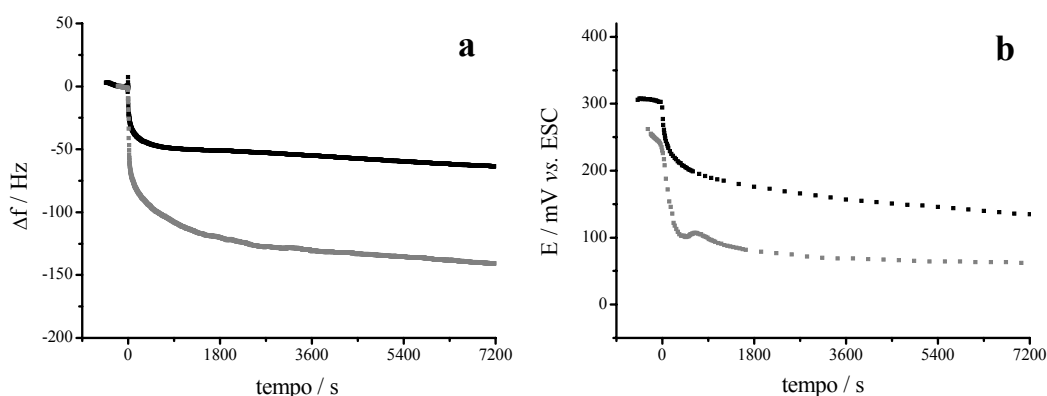


Figura 64 - Variações de (a) frequência e (b) potencial em circuito aberto durante a imobilização da dG20-P no filme PTN 80/20 por (■) adsorção (procedimento A) e (■) adsorção e acoplamento covalente (procedimento B) em MES $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$.

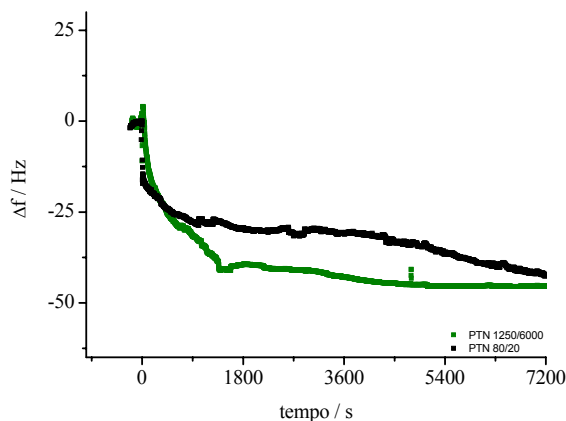


Figura 65 - Variações de frequência durante a imobilização covalente da dGTP no filme (■) PTN 80/20 e (■) PTN 1250/6000 em MES $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ contendo os agentes acoplantes NHS $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ e EDC $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$.

Na presença dos agentes acoplantes, a imobilização de dGTP e dG20-P (no filme de PTN que contém grupos amina livres na sua estrutura) é favorecida, apresentando maior grau de recobrimento para o procedimento B. Na imobilização da dG20-P o tamanho, a orientação na superfície do polímero e as repulsões entre os oligonucleótidos imobilizados deverão ser os factores responsáveis pelo baixo grau de recobrimento obtido.

Tabela 21 - Valores de frequência, massa, recobrimento superficial de moléculas e PCA obtidos para a imobilização da dGTP e dG20-P por adsorção e acoplamento covalente e adsorção em eléctrodos modificados com politionina.

Biomoléculas Procedimento	dGTP			dG20-P	
	A	B		A	B
Filme	PTN 80/20	PTN 80/20	PTN 1250/6000	PTN 80/20	
Δf (Hz)	-22,8	-42,4	-45,4	-63,60	-140,77
Δm ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	0,158	0,297	0,315	0,442	0,978
Γ (nmol cm^{-2})	0,069	0,130	0,137	0,016	0,035
ΔE_{OCP} (mV)	145	130	115	168	173

Δf - variação experimental de frequência na imobilização; Δm - variação de massa; Γ - recobrimento superficial de biomoléculas; ΔE_{OCP} - variação de potencial em circuito aberto após adição dos nucleótidos.

As variações de potencial em circuito aberto, representadas nas figuras 63 e 64 - b, estão de acordo com os resultados obtidos na microbalança electroquímica de cristal de quartzo, sugerindo alterações na interface devido às interacções que se estabeleceram.

A imobilização de dGTP pelo procedimento B, em filmes de politionina electrosintetizados sob diferentes modos ($0,130 \text{ nmol cm}^{-2}$ e $0,137 \text{ nmol cm}^{-2}$ para PTN 80/20 e PTN 1250/6000, respectivamente), figura 65, mostra que, apesar das diferentes morfologias e rugosidades ($R_{\text{q,PTN 80/20}} = 5,6 \text{ nm}$ e $R_{\text{q,PTN 1250/6000}} = 2,9 \text{ nm}$) dos filmes a quantidade de grupos funcionais livres à superfície deverá ser semelhante.

Tentou-se detectar a hibridação da dG20-P com a sequência complementar, dC20, por MECQ. A hibridação foi realizada numa solução $5\times\text{SSC}$ (2 mL), à qual foi adicionada a sequência complementar, na célula. No entanto, não foi possível obter variações de frequência coerentes o que pode dever-se ao aumento viscoelasticidade com a hibridação, levando à instabilidade na oscilação do cristal.

Recorreu-se à de detecção electroquímica da imobilização e hibridização dos nucleótidos. Para tal, complexos de cobalto e ruténio têm sido usados, e.g. $\text{Co}(\text{bpi})_3^{2+}$ e $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ [21, 44, 102, 103] pois apresentam um comportamento reversível de associação com o ADN de cadeia dupla por interacções electrostáticas, o que se traduz num aumento de

intensidade de corrente após hibridização. Assim, os filmes PTN 80/20, após imobilização foram caracterizados por voltametria cíclica, em soluções contendo os referidos complexos e as respostas comparadas com as obtidas após hibridização no mesmo meio. Como se ilustra na figura 66, a cerca de -300 e -400 mV, parece haver um aumento da densidade de corrente do pico anódico para as soluções contendo os complexos metálicos. No entanto, tendo em conta os resultados apresentados anteriormente onde se verificou que os complexos provocam alterações na resposta redox da PTN particularmente significativas no caso do complexo de ruténio e tendo-se verificado que após imobilização ocorre uma perda de electroactividade dos filmes de politionina, em ambas as soluções (o que pode estar relacionado com efeitos dos agentes acoplantes e da própria imobilização, porque esta também bloqueará locais electroactivos no filme), este método não se revela satisfatório para detectar a hibridização das sequências de ADN.

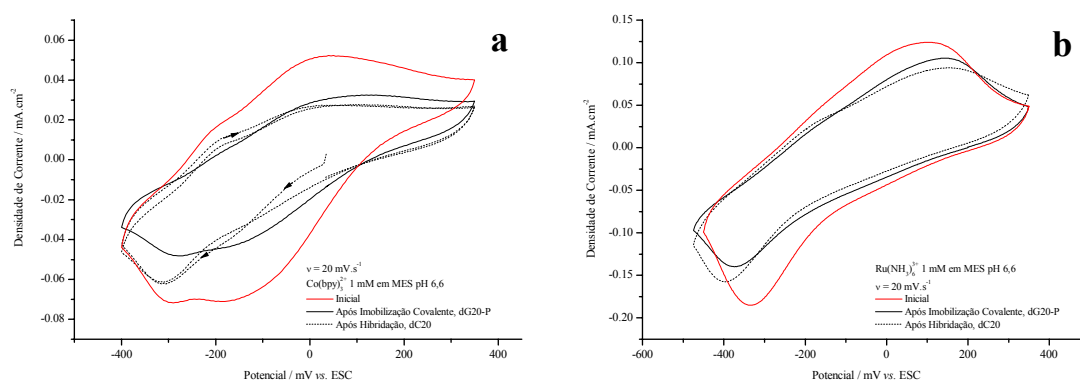


Figura 66 - Voltamogramas cíclicos da caracterização do eléctrodo modificado com PTN 80/20 em soluções de MES pH 6,6 contendo os complexos (a) Co(bpy)_3^{2+} 1 mmol dm^{-3} e (b) $\text{Ru(NH}_3)_6^{3+}$ 1 mmol dm^{-3} , (—) após polimerização, (—) após imobilização covalente da dG20-P e (----) após hibridação com a sequência complementar dC20; $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Embora com carácter preliminar, tentou-se a caracterização por MEV do eléctrodo modificado com politionina, após imobilização covalente de dG20-P e hibridação com a sequência complementar dC20 com o substrato em potencial em circuito aberto, e varrendo com a ponta B sujeita a 40 mV (potencial de redução do complexo Co(bpi)_3^{3+}), uma área compreendendo zonas de ouro, PTN 80/20 e PTN-dG20-P/dC20, obteve-se a imagem 2D representada na figura 67 - a, onde não é possível detectar a presença dos oligonucleótidos imobilizados por diferença de condutividade no substrato entre as áreas de polímero e de polímero modificado com as biomoléculas. A deposição de ADN (600 - 1000 bp) por

“casting” sobre o filme de politionina, PTN 80/20, também ainda não causou alterações que permitam detectar as biomoléculas imobilizadas por este método.

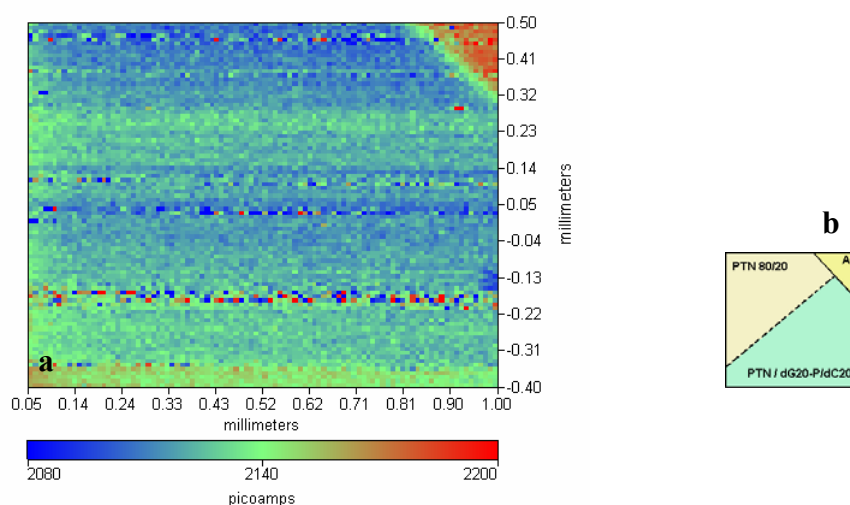


Figura 67 - (a) Imagem a 2D do varrimento de área entre substrato de Au, PTN 80/20 e PTN-dG20-P/dC20, na solução de $\text{Co}(\text{bpy})_3^{2+/3+}$ em MES com a ponta B; $E_T = 40 \text{ mV}$ e $E_S = \text{PCA}$; (b) representação esquemática da área varrida.

Para não alterar as condições de observação na análise dos diferentes sistemas (PTN, PTN+ADN, PTN+ADN+comp), no eléctrodo-substrato de ouro do MVE foi criado um “array” dividindo a área do eléctrodo onde foi depositado um filme de politionina, PTN 80/20, em 6 domínios isolados entre si, como se representa na figura 68. Após modificação do eléctrodo, entre cada domínio fica, exposta uma zona de ouro; cada par de domínios (1 e 2) foi ainda modificado por imobilização covalente de dG20-P, zona B, e por imobilização covalente e hibridação com a sequência complementar, dC20, zona C, ficando apenas com o filme de PTN 80/20, a zona A.

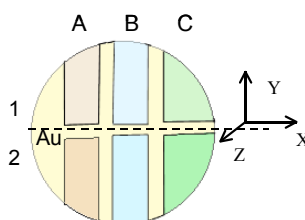


Figura 68 – Representação esquemática do “array” criado no eléctrodo de ouro do MVE e identificação dos diferentes domínios: A – PTN 80/20, B – PTN 80/20-dG20-P e C – PTN 80/20-dG20-P-dC20.

Após a modificação do eléctrodo, este foi colocado no microscópio de varrimento electroquímico numa solução de Tris-HCl $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ (pH 8,5) contendo o complexo de

ferro, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 5 mmol dm^{-3} . O varrimento de uma área xy, a distância constante do substrato, compreendendo as diversas zonas cujas imagens 2D e 3D se encontram representadas na figura 69, permite obter uma imagem geral do “array” criado na superfície do eléctrodo de ouro do microscópio. Por esta metodologia também não foi possível detectar a presença das biomoléculas imobilizadas por diferença de condutividade no substrato entre as diferentes zonas analisadas.

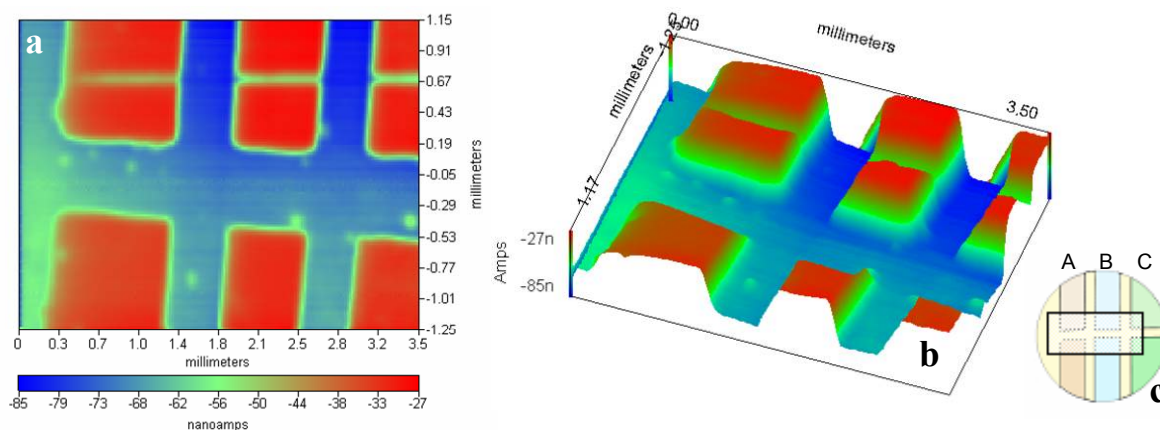


Figura 69 - (a) Imagem a 2D do varrimento de área entre substrato de Au, PTN 80/20 e PTN-dG20-P/dC20, na solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ em Tris-HCl $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ com a ponta A; $E_T = 250 \text{ mV}$ e $E_S = \text{PCA}$, (b) Imagem 3D processada a partir da imagem 2D e (c) representação esquemática da área varrida.

5.3. INTERACÇÃO E DETECÇÃO DE METAIS PESADOS

A interacção e acumulação do ião metálico Zn^{2+} em eléctrodos modificados com PTN 80/20 e PTN 80/20/dG20-P/dC20 (PTN/cd-ADN) foi estudada por i) voltametria cíclica através da resposta na presença do ião Zn^{2+} e ii) MVE, procurando observar o aumento de condutividade do ADN na presença dos iões metálicos.

Os resultados obtidos com PTN 80/20 (em solução de electrólito, Tris-HCl $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ (pH 8,5)) e presentes na figura 70, mostram comportamentos semelhantes da Pt e PTN 80/20 (processos atribuíveis à adsorção e desadsorção de hidrogénio e a valores de potencial mais negativos o aumento acentuado de densidade de corrente catódica, que deve corresponder à redução de protões). Na presença de Zn^{2+} os processos descritos são bloqueados tanto em platina como no eléctrodo modificado e as correntes observadas na zona catódica são significativamente diminuídas. Para uma densidade de corrente arbitrária de $-0,70 \text{ mA cm}^{-2}$, são observados sobrepotenciais de -170 e -301 mV para a platina e PTN

80/20, respectivamente, com a adição do ião metálico à solução, tabela 22. Este facto está de acordo com o esperado porque na presença dos iões metálicos, a redução dos protões é bloqueada. A formação de M-ADN, por imersão do eléctrodo modificado PTN/cd-ADN na solução de ZnCl_2 ($t = 3$ h) antes da caracterização em Tris-HCl, implica uma redução de sobrepotencial de +216 mV face à caracterização na solução contendo ZnCl_2 ($0,4 \text{ mmol dm}^{-3}$) imediatamente após hibridação, tabela 22.

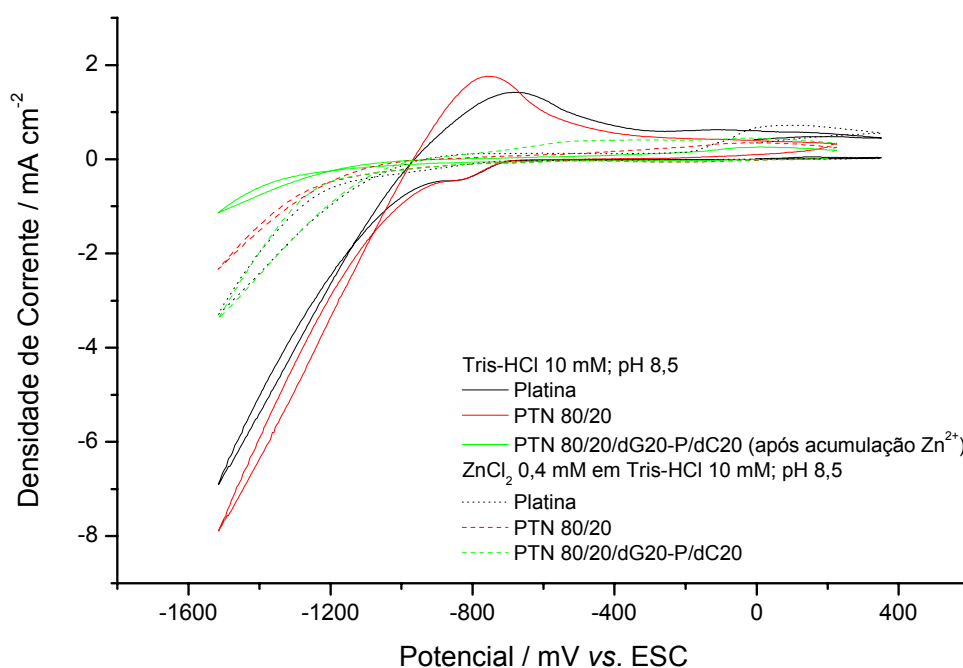


Figura 70 – Voltamogramas cíclicos da (—) platina, (—) PTN 80/20 e (—) PTN 80/20/dG20-P/dC20 (após acumulação de Zn^{2+} : 3h em ZnCl_2 $0,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ em Tris-HCl 10 mM , pH 8,5) em solução de Tris-HCl $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 8,5 e em solução ZnCl_2 $0,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ em Tris-HCl $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ (pH 8,5): (—) platina, (—) PTN 80/20 e (—) PTN 80/20/dG20-P/dC20.

Tabela 22 – Valores de potencial no varrimento catódico correspondentes à densidade de corrente arbitrariamente seleccionada, no eléctrodo de platina e nos eléctrodos modificados em solução de electrólito e na presença de Zn^{2+} .

Meio	Eléctrodo	$j_{\text{arb.}} / \text{mA cm}^{-2}$	E / mV	η / mV
Tris-HCl $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ pH 8,5	Platina	-0,70	-977	
	PTN 80/20		-954	
	PTN 80/20 / dG20-P/dC20*		-1377	
ZnCl_2 $0,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ em Tris-HCl	Platina	-0,70	-1147	-170
	PTN 80/20		-1255	-301
	PTN 80/20 / dG20-P/dC20		-1161	+216

$j_{\text{arb.}}$ – densidade de corrente seleccionada para comparação de sobrepotenciais ; η - sobrepotencial; * - após acumulação de Zn^{2+} na solução ZnCl_2 $0,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ em Tris-HCl $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 8,5; $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Por MVE, utilizou-se o substrato modificado descrito no ponto 5.2. (figura 68) e efectuaram-se linhas de varrimento no MVE ao longo do eixo dos xx em domínios com e sem a acumulação do metal pesado, figura 71. Verificou-se um aumento de condutividade com a acumulação dos iões mas sendo o aumento observável em todos os domínios, indica que a ocorrer interacção com o Zn^{2+} , esta também se estabelece com a politionina.

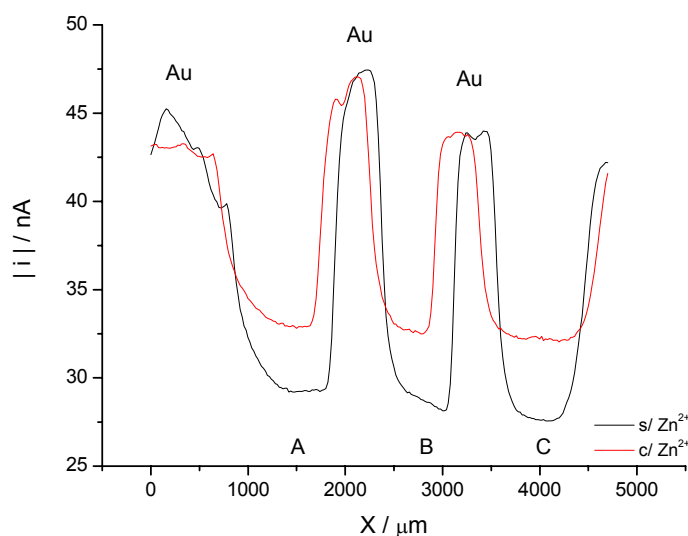


Figura 71 – Linhas de varrimento sobre o eléctrodo modificado em diferentes domínios (A - PTN 80/20, B - PTN 80/20-dG20-P e C - PTN 80/20-dG20-P-dC20) de acordo com o esquema da figura 68, ao longo do eixo dos xx: (—) sem acumulação de Zn^{2+} e (—) com acumulação de Zn^{2+} a partir de uma solução de ZnCl_2 $0,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ em Tris-HCl $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$, $t = 3$ horas; $E_T = 250 \text{ mV}$ e $E_S = \text{PCA}$.

Os resultados do estudo voltamétrico, complementados pela informação obtida por MVE, parecem apontar para uma efectiva estabilização dos iões metálicos (Zn^{2+}) no eléctrodo modificado com ADN hibridado e para a possibilidade de detecção destes iões pesados com o eléctrodo modificado com politionina e cd-ADN.

Capítulo 6

Conclusões

Conclusões

No trabalho desenvolvido estudaram-se as condições para a modificação de eléctrodos com polímeros contendo grupos funcionais livres, o comportamento e a estabilidade destes em diferentes meios nomeadamente os compatíveis com as moléculas biológicas, a interacção de ADN com os eléctrodos modificados e a detecção de iões pesados com afinidade para as biomoléculas.

O 5-Amino-1-Naftol foi polimerizado em platina e meio ácido por varrimento de potencial. A electroactividade dos filmes de poli(5-amino-1-naftol) aumenta linearmente com diminuição da velocidade de varrimento de potencial entre 50 e 2 mV s^{-1} e com o número de ciclos de potencial até cerca de 30, tendendo depois para um patamar. As condições seleccionadas de 30 ciclos a 50 mV s^{-1} permitiram obter filmes electroactivos e estáveis nesse meio. No entanto, a baixa electroactividade observada em meios compatíveis com as moléculas biológicas objecto de estudo, tampão fosfato e Tris-HCl, e a baixa actividade electrocatalítica na conversão de espécies electroactivas, que se verificou ser devida ao pH da solução, inviabilizou a sua aplicação no cumprimento do objectivo proposto.

O outro monómero seleccionado - Tionina - apresenta um comportamento redox reversível e bem definido em meio ácido. Quando electrodepositado, quer em condições potencioestáticas como potenciodinâmicas, a valores de potencial superiores a 1000 mV onde ocorre a oxidação irreversível do monómero, deu origem a filmes estáveis e electroactivos. A electroactividade dos filmes de politionina (PTN) obtidos depende das condições experimentais de polimerização.

Verificou-se que no crescimento potencioestático, a electroactividade do PTN aumenta com o tempo de polarização (entre 3600 e 21600 s) e com o potencial aplicado (entre 1000 e 1250 mV). A multiplicidade de processos redox observada para filmes obtidos para mais longos períodos de polarização e potencial anódico superior sugerem uma estrutura pouco homogénea destes.

Filmes crescidos potenciodinamicamente apresentaram electroactividade crescente com o número de ciclos até 80, o potencial anódico entre 1000 e 1150 mV e com a diminuição da velocidade de varrimento de potencial entre 100 e 20 mV s^{-1} . Sob as condições seleccionadas (80 ciclos a 20 mV s^{-1} entre 0 e 1150 mV) foi verificado por MECQ um aumento linear de massa com o número de ciclos de potencial usados na electropolimerização da TN embora a electroactividade do polímero tenda para um patamar, sugerindo alterações

estruturais no decorrer do espessamento do filme, tendo estas sido corroboradas pela análise morfológica por MFA. Para o filme fino, PTN 20/20, as imagens de MFA revelam a formação de uma camada compacta, sobre a qual crescem glóbulos com estrutura distinta. Estes, formam agregados com o espessamento do filme e o valor de rugosidade rms aumenta de 3,3 em filmes finos para 5,6 nm em filmes espessos.

Morfologicamente os filmes, com electroactividades similares, crescidos em modos potenciostático (PTN 1250/6000) e potenciodinâmico (PTN 80/20) apresentam estruturas distintas.

A conversão redox do PTN é sensível à espessura dos filmes, passando de um controle por transferência de carga em filmes finos para um controle por difusão em filmes espessos.

O PTN 80/20 apresentou electroactividade em meios compatíveis com moléculas biológicas, Tampão Fosfato, Tampão Acetato, Ácido Morfolinoetanossulfónico (MES) e Tris(hidroximetil)aminoetano (Tris-HCl).

O comportamento redox do PTN 80/20 em meios com diferentes valores de pH é complexo, envolvendo dois processos em soluções com pH entre 5,5 e 9 com distinta dependência de protões. Em meio alcalino, pH 12, apresenta menor electroactividade não sendo, no entanto, destruído.

As variações de massa observadas por MECQ em meio ácido e neutro sugeriram a participação de diferentes mecanismos na conversão redox do PTN, sendo esta influenciada pela espessura dos filmes, pela velocidade de varrimento de potencial e pelo meio. A inserção de iões fosfato no filme de PTN parece ser a causa mais provável para a baixa electroactividade nesse meio.

Os resultados preliminares obtidos por MVE mostraram a necessidade de adequar as condições experimentais às características do sistema em estudo. A influência da natureza do meio na condutividade do PTN foi evidenciada por esta técnica; em solução de KCl contendo o complexo de ferro $(\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-})$, o PTN 80/20 sofre degradação, apresentando baixa condutividade. Por outro lado, em MES, na presença do complexo de cobalto $(\text{Co}(\text{bpi})_3^{2+/3+})$, foi possível verificar que o filme PTN 80/20 no estado oxidado apresenta uma condutividade intermédia entre isolador (epoxi) e condutor (ouro).

O eléctrodo modificado PTN 80/20 apresentou actividade electrocatalítica para a redução do peróxido de hidrogénio. A transferência electrónica no eléctrodo modificado depende da sonda electroactiva e do pH da solução. Não foi detectada no intervalo de potencial em que o filme é electroactivo, na presença de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ a valores de pH 1,3 ou 7, sendo apenas observável a pH 8,5. Em solução de MES e tampão fosfato o complexo

$\text{Co}(\text{bpi})_3^{2+/3+}$ inibe a resposta do filme. Os resultados obtidos com o complexo de ruténio, $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$, em MES apontam para alterações irreversíveis no filme.

A estabilidade observada em meio biológico (MES), permitiu a utilização do PTN como suporte para a imobilização de biomoléculas e a existência de grupos amina livres na sua estrutura torna possível a ligação covalente de nucleótidos através do uso de agentes acoplantes. Devido ao tamanho, orientação na superfície do polímero e repulsões entre os oligonucleótidos, a quantidade de dG20-P imobilizada por ambos os procedimentos é inferior à observada para a dGTP. A resposta da conversão redox de espécies electroactivas em solução com afinidade para o ADN não permitiu a detecção da hibridação. Tal também não foi possível por MECQ devido ao aumento da viscoelasticidade com a hibridação.

O eléctrodo modificado com PTN 80/20 e cd-ADN permitiu, por voltametria cíclica, a detecção de iões pesados com afinidade para as biomoléculas.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- 1 - Inzelt, G., Pineri, M., Schultze, J. W., Vorotyntsev, M. A., *Electrochimica Acta* 45 (2000) 2403-2421.
- 2 - Gerard, M., Chaubey, A., Malhotra, B. D., *Biosensors and Bioelectronics* 17 (2002) 345-359.
- 3 - Cosnier, S., *Biosensors and Bioelectronics* 14 (1999) 443-456.
- 4 - Heinze, J., *Synthetic Metals* 41-43 (1991) 2805-2823.
- 5 - Blanchard, F., Carré, B., Bonhomme, F., Biensan, P., Pagès, H., Lemordant, D., *Journal of Electroanalytical Chemistry* 569 (2004) 203-210.
- 6 - Komura, T., Ishihara, M., Yamaguchi, T., Takahashi, K., *Journal of Electroanalytical Chemistry* 493 (2000) 84-92.
- 7 - Cintra, E. P., Torresi, R. M., Louarn, G., Córdoba de Torresi, S. I., *Electrochimica Acta* 49 (2004) 1409-1415.
- 8 - Hillman, A. R., Loveday, D. C., Swann, M. J., Eales, R. M., Hamnett, A., Higgins, S. J., Bruckenstein, S., Wilde, C. P., *Faraday Discussions Chemical Society* 88 (1989) 151-163.
- 9 - Oyama, N., Ohsaka, T., *Progresses in Polymer Science* 20 (1995) 761-818.
- 10 - Barbero, C., Haas, O., *Journal of Electrochemical Society* 142 (6) (1995) 1829-1833.
- 11 - Schlereth, D. D., Karyakin, A. A., *Journal of Electroanalytical Chemistry* 395 (1995) 221-232.
- 12 - Hamnett, A., Hillman, A. R., *Journal of Electroanalytical Chemistry* 195 (1985) 189-196.
- 13 - Hamnett, A., Hillman, A. R., *Journal of Electroanalytical Chemistry* 233 (1987) 125-146.
- 14 - Lee, C., Kwak, J., Kepley, L. J., Bard, A. J., *Journal of Electroanalytical Chemistry* 282 (1990) 239-252.
- 15 - Ohsaka, T., Ohba, M., Sato, M., Oyama, N., *Journal of Electroanalytical Chemistry* 300 (1991) 51-66.
- 16 - Cintra, E. P., Córdoba de Torresi, S. I., *Journal of Electroanalytical Chemistry* 518 (2002) 33-40.

-
- 17 - Mostefai, M., Pham, M.-C., Marsault, J. P., Aubard, J., Lacaze, P. C., *Journal of Electrochemical Society* 143 (7) (1996) 2116-2119.
 - 18 - Meneguzzi, A., Ferreira, C. A., Pham, M. C., Delamar, M., Lacaze, P. C., *Electrochimica Acta* 44 (1999) 2149-2156.
 - 19 - Chung, T. D., *Bull. Korean Chemical Society* 24 (3) (2003) 291-294.
 - 20 - Pham, M. C., Bouallala, S., Lé, L. A., Lacaze, P. C., *Electrochimica Acta* 42 (3) (1997) 439-447.
 - 21 - Zhao, Y.-Di, Pang, Dai-Wen, Hu, S., Wang, Z.-Li, Cheng, Jie-Ke, Dai, H.-P., *Talanta* 49 (1999) 751-756.
 - 22 - Schlereth, D. D., Schuhmann, W., Schmidt, H.-L., *Journal of Electroanalytical Chemistry* 381 (1995) 63-70.
 - 23 - Svetlicic, V., Clavilier, J., Zutic, V., Chevalet, J., *Journal of Electroanalytical Chemistry* 344 (1993) 145-160.
 - 24 - Clavilier, J., Svetlicic, V., Zutic, V., *Journal of Electroanalytical Chemistry* 386 (1995) 157-163.
 - 25 - Ohtani, M., Kuwabata, S., Yoneyama, H., *Journal of Electroanalytical Chemistry* 422 (1997) 45-54.
 - 26 - Xiao, Y., Ju, H.-X., Chen, H.-Y., *Analytica Chimica Acta* 391 (1999) 299-306.
 - 27 - Yang, R., Ruan, C., Dai, W., Deng, J., Kong, J., *Electrochimica Acta* 44 (1999) 1585-1596.
 - 28 - Saez, E., Corn, R. M., *Electrochimica Acta* 38 (12) (1993) 1619-1625.
 - 29 - Quickenden, T. I., Harrison, I. R., *Journal of Electrochemical Society* 132 (1) (1985) 81-88.
 - 30 - Gao, Q., Cui, X., Yang, F., Ma, Y., Yang, X., *Biosensors and Bioelectronics* 19 (3) (2003) 277-282.
 - 31 - Bruckenstein, S., Wilde, C. P., Hillman, A. R., *Journal of Physical Chemistry* 94 (1990) 6458-6464.
 - 32 - Bruckenstein, S., Wilde, C. P., Shay, M., Hillman, A. R., Loveday, D. C., *Journal of Electroanalytical Chemistry* 258 (1989) 457-462.
 - 33 - Karyakin, A.A., Karyakina, E.E., Schmidt, H.-L., *Electroanalysis* 11 (3) (1999) 149-155.
 - 34 - Karyakin, A.A., Strakhova, A. K., Karyakina, E. E., Varfolomeyev, S. D., Yatsimirsky, A. K., *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 32 (1993) 35-43.
 - 35 - Ding, J.Y., Shih, P.Y., Yin, C.K., *Materials Chemistry and Physics* 84 (2004) 263-272.
-

-
- 36 - Cai, C.-X., Xue, K.-H., *Journal of Electroanalytical Chemistry* 427 (1997) 147-153.
- 37 - Bruckenstein, S., Wilde, C. P., Shay, M., Hillman, A. R., *Journal of Physical Chemistry* 94 (1990) 787-793.
- 38 - Hillman, A.R., Loveday, D.C., Bruckenstein, S., Wild, C.P., *Journal Chemical Society - Faraday Communications* 86(2) (1990) 437-438.
- 39 - Hillman, A. R., Loveday, D. C., Swann, M. J., Bruckenstein, S., Wilde, C. P., *Journal of Chemical Society - Faraday Transactions* 87(13) (1991) 2047-2053.
- 40 - Lee, T.-Y., Shim, Y.-B., *Analytical Chemistry* 73 (2001) 5629-5632.
- 41 - Thompson, L., Kowalik, J., Josowicz, M., Janata, J., *Journal of American Chemical Society* 125 (2003) 324-325.
- 42 - Tenreiro, A., Cordas, C. M., Abrantes, L. M., *Portugaliae Electrochimica Acta* 21 (2003) 361-370.
- 43 - Tran, L. D., Piro, B., Pham, M. C., Ledoan, T., Angiari, C., Dao, L. H., Teston, F., *Synthetic Metals* 139 (2003) 251-262.
- 44 - Millan, K., Mikkelsen, S., *Analytical Chemistry* 65 (1993) 2317-2323.
- 45 - Pividori, M., Merkoçi, A., Alegret, S., *Biosensors and Bioelectronics* 15 (2000) 291-303.
- 46 - Palecek, E., *Talanta* 56 (2002) 809-819.
- 47 - Unsal, E., Bahar, T., Tuncel, M., *Journal of Chromatography A* 898 (2000) 167-177.
- 48 - Gooding, J. J., *Electroanalysis* 14 (17) (2002) 1149-1156.
- 49 - Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Palecek, E., Nielsen, P., Shiraishi, H., Dontha, N., Luo, D., Parrado, C., Chicharro, M., Farias, P. A. M., Valera, F. S., Grant, D. H., Ozsoz, M., Flair, M. N., *Analytica Chimica Acta* 347 (1997) 1-8.
- 50 - Watanabe, S., Kubo, I., *T. IEE Japan* 121E-10 (2001) 559-563.
- 51 - Fojta, M., *Electroanalysis* 14-21 (2002) 1449-1463.
- 52 - Zhu, N., Cai, H., He, P., Fang, Y., *Analytica Chimica Acta* 481 (2003) 181-189.
- 53 - Komatsu, M., Yamashita, K., Uchida, K., Kondo, H., Takenaka, S., *Electrochimica Acta* 51 (2006) 2023-2029.
- 54 - Turcu, F., Schulte, A., Hartwich, G., Schuhmann, W., *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2004) 925-932.
- 55 - Wang, J., Zhou, F., *Journal of Electroanalytical Chemistry* 537 (2002) 95-102.
- 56 - R.-Mozaz, S., López de Alda, M. J., Marco, M.-P., Barceló, D., *Talanta* 65 (2005) 291-297.
-

- 57 - Verma, N., Singh, M., *BioMetals* 18 (2005) 121-129.
- 58 - Bontidean, I., Ahlqvist, J., Mulchandani, A., Chen, W., Bae, W., Mehra, R. K., Mortari, A., Csoregi, E., *Biosensors and Bioelectronics* 18 (2003) 547-553.
- 59 - Gooding, J. J., Chow, E., Finlayson, R., *Australian Journal of Chemistry* 56 (2003) 159-162.
- 60 - Palecek, E., Fojta, M., *Analytical Chemistry* 73 (2001) 75A-83A.
- 61 - Drummond T. G., Hill M. G., Barton J. K. *Nature Biotechnology* 21 (2003) 1192-1199.
- 62 - Kerman K., Kobayashi M., Tamiya E. *Measurement Science and Technology* 15 (2004) R1-R11.
- 63 - Babkina, S. S., Ulakhovich, N. A., *Bioelectrochemistry* 63 (2004) 261-265.
- 64 - Lu, Y., Liu, J., Li, J., Bruesehoff, P. J., Pavot, C. M.-B., Brown, A. K., *Biosensors and Bioelectronics* 18 (2003) 529-540.
- 65 - Wettig, S. D., Wood, D. O., Lee, J. S., *Journal of Inorganic Biochemistry* 94 (2003) 94-99.
- 66 - Zhao, C., Yang, K., Liu, X., Nomizu, M., Nishi, N., *Desalination* 170 (2000) 263-270.
- 67 - Wood, D. O., Lee, J. S., *Journal of Inorganic Chemistry* 99 (2005) 566-574.
- 68 - Wood, D. O., Dinsmore, M. J., Bare, G. A., Lee, J. S., *Nucleic Acids Research* 30 (2002) 2244-2250.
- 69 - Aich, P., Labiuk, S. L., Tari, L. W., Delbaere, L. J. T., Roesler, W. J., Falk, K. J., Steer, R. P., Lee, J. S., *Journal of Molecular Biology* 294 (1999) 477-485.
- 70 - Long, Y.-T., Li, C.-Z., Kraatz, H.-B., Lee, J. S., *Biophysical Journal* 84 (2003) 3218-3225.
- 71 - Li, C.-Z., Long, Y.-T., Kraatz, H.-B., Lee, J. S., *Journal of Physical Chemistry B* 107 (2003) 2291-2296.
- 72 - Gomes, A., da Silva Pereira, M. I., *Electrochimica Acta* 51 (2006) 1342-1350.
- 73- Guilbault, G. G., O'Sullivan, C.K., *Biosensors and Bioelectronics* 14 (1999) 663-670.
- 74 - Deakin, M.R., Buttry, D.A., *Analytical Chemistry* 61(20) (1989) 1147A-1154A.
- 75- Bruckenstein, S., Shay, M., *Electrochimimica Acta* 30 (10) (1985) 1295-1300.
- 76 - Grden, M., Klimek, K., Czerwinski, A., *Electrochimica Acta* 51 (2006) 2221-2229.
- 77 - French, H.M., Henderson, M.J., Hillman, A.R., Vieil, E., *Journal of Electroanalytical Chemistry* 500 (2001) 192-207.
- 78 - Inzelt, G., Puskás, Z., *Electrochimica Acta* 49 (2004) 1969-1980.
- 79 - Varela, H., Malta, M., Torresi, R.M., *Química Nova* 23(5) (2000) 664-679.

-
- 80 - Lassale, N., Mailley, P., Vieil, E., Livache, T., Roget, A., Correia, J. P., Abrantes, L. M., *Journal of Electroanalytical Chemistry* 509 (2001) 48-57.
- 81 - Abrantes, L.M., Cordas, C.M., Vieil, E., *Electrochimica Acta* 47 (2002) 1481-1487.
- 82 - Lassale, N., Vieil, E., Correia, J.P., Abrantes, L.M., *Biosensors and Bioelectronics* 16 (2001) 295-303.
- 83 - Wang, J., Jiang, M., Mukherjee, B., *Bioelectrochemistry* 52 (2000) 111-114.
- 84 - Janshoff, A., Galla, H.-J., Steinem, C., *Angewandte Chemie International Edition* 39 (2000) 4004-4032.
- 85 - Friedbacher, G., Fuchs, H., *Pure and Applied Chemistry* 71 (1999) 1337.
- 86 - Mourato, A., Viana, A. S., Correia, J. P., Siegenthaler, H., Abrantes, L. M., *Electrochimica Acta* 49 (2004) 2249-2257.
- 87 - Innocenti, M., Loglio, F., Pigani, L., Seeber, R., Terzi, F., Udisti, R., *Electrochimica Acta* 50 (2005) 1497-1503.
- 88 - Bard, A. J., Mirkin, M. V., *Scanning Electrochemical Microscopy*, Marcel Dekker, New York, 2001.
- 89 - Kwak, J., Bard, A. J., *Analytical Chemistry* 61 (1989) 1794-1799.
- 90 - Rajendran, L., Ananthi, S. P., *Journal of Electroanalytical Chemistry* 561 (2004) 113-118.
- 91 - Mirkin, M. V., Horrocks, B. R., *Analytica Chimica Acta* 406 (2000) 119-146.
- 92 - Pyo, M., Bard, A. J., *Electrochimica Acta* 42 (1997) 3077-3083.
- 93 - Kwak, J., Lee, C., Bard, A. J., *Journal of Electrochemical Society* 137 (1990) 1481-1484.
- 94 - Borgwarth, K., Ricken, C., Ebling, D. G., Heinze, J., *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 356 (1996) 288-294.
- 95 - Chen, H.-Y., Zhou, D.-M., Xu, J.-J., Fang, H.-Q., *Journal of Electroanalytical Chemistry* 422 (1997) 21-25.
- 96 - Amphlett, J., Denuault, G., *Journal of Physical Chemistry B* 102 (1998) 9946-9951.
- 97 - Koster, O., Schuhmann, W., Vogt, H., Mokwa, W., *Sensors and Actuators B* 76 (2001) 573-581.
- 98 - Li, H., Xu, Z., Ji, L.-N., Li, W.-S., *Journal of Applied Electrochemistry* 35 (2005) 235-241.
- 99 - Yang, M., Yang, Y., Yang, Y., Shen, G., Yu, R., *Analytical Biochemistry* 334 (2004) 127-134.
-

- 100 - Long, X., Bi, S., Tao, X., Wang, Y., Zhao, H., *Spectrochimica Acta Part A* 60 (2004) 455-462.
- 101 - Fundo, A. M., Abrantes, L. M., *Journal of Electroanalytical Chemistry* (2006) (em publicação).
- 102 - Bakker, E., *Analytical Chemistry* 76 (2004) 3285-3298.
- 103 - Kelley, Boon, *Nucleic Acids Research* 27 (1999) 4830-4837.