Universidade de São Paulo

Instituto de Química de São Carlos

Departamento de Físico-Química

Membranas Eletroativas Nanoestruturadas: Estudo de Transporte de Carga e Imobilização Enzimática

Frank Nelson Crespilho

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências (Físico-Química).

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Nart
Co-Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr.

São Carlos
Janeiro de 2007

Dedicatória

Esta tese é dedicada ao orientador
Prof. Dr. Francisco Carlos Nart

Agradecimentos

- À minha família, em especial aos meus pais Nelson e Inez, minha irmã Joice, que com amor e dedicação acreditaram na minha educação.

- À Milene por me apoiar em todas as decisões, em especial, minha viagem à Portugal.

- Ao amigo e orientador Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr., que com caráter, paciência e determinação me ensinou as principais lições da vida científica, acadêmica e pessoal. Chu, você é um exemplo que pretendo passar adiante, obrigado!

- Ao orientador Prof. Dr. Francisco Carlos Nart (*in memoriam*), que depositou em mim confiança e perspectiva científica. Ainda lembro-me das tuas ideias e conversas proveitosas… obrigado Chico!

- Ao amigo e companheiro Prof. Dr Valtencir Zucolotto, que me passou o *background* em filmes finos e acreditou na minha vontade de trabalhar. Espero um dia retribuir à altura, obrigado!

- Ao Prof. Dr. Christopher M. A. Brett, por ser uma pessoa muito especial na minha carreira científica, aceitando-me em seu laboratório na Universidade de Coimbra, Portugal, para a realização do meu estágio de doutorado. Com o seu livro, aprendi os primeiros passos da eletroquímica na graduação… em seu laboratório, passos importantes do meu doutorado. Obrigado!

- Aos amigos do Grupo de Polímero Bernhard Gross (IFSC/USP), Laboratório de Eletroquímica (IQSC/USP) e Laboratório de Electroquímica (Universidade de Coimbra, Portugal) pelo companheirismo e excelente ambiente de trabalho. Não me atrevo aqui citar todos os inúmeros nomes que fizeram parte dessa minha caminhada. Obrigado a todos!

- Aos parceiros e colaboradores que cito a seguir, expresso toda a minha gratidão: Prof. Dr. Fritz Huguenin, Prof. Dr. Welter C. Silva, Prof. Dr. Paulo Olivi, Prof. Dr. Carlos J. L. Constantino, Prof. Dr. Antonio J. F. Carvalho, Prof. Dr. Edson R. Leite, M. Emilia Ghica, Monica Florescu, José R. Siqueira Jr., Luiz H. S. Gasparotto e Guilherme Bueno Christofoletti.

- Aos amigos de São Carlos e Jaú, pela convivência e altas discussões: Fábio H. B. de Lima, Flávio L. de Souza, Camilo A. Angelucci, Jackson D. M. Jr., Janildo Magalhães, Silmar, Cassandra Sanches, Janaína Garcia, Janaína F. Gomes, Melina DVilla, Juliana, Paulo Castro, Gusto, Eder Voltani, Mário Cândido, entre muitos outros.

- Aos colegas de Coimbra / Portugal, que dentre os quais incluem-se os brasileiros, portugueses, romenos, poloneses, canadenses, ingleses, suecos, espanhóis, alemães e lituanos. Vocês contribuíram significativamente para minha formação pessoal durante minha estadia em Portugal. Em especial, quero agradecer ao Edilson, Madalina, Pedro, Jorge e Sérgio com quem tive o prazer de morar em Coimbra.

- Aos professores que foram meus mestres e colegas, que de algum modo participaram da minha formação acadêmica: Profa. Dra. Maria Olímpia O.

Resende, Prof. Dra. Ubirajara P. Rodrigues, Wagner Luiz Polito, Profa. Dra. Ana M. G. Plepis e Profa. Dra. Ana Maria O. Brett.

- Ao IQSC-USP, IFSC-USP e UC-Portugal, pelas facilidades e infra-estruturas fornecidas.

- Ao CNPq pela bolsa de doutorado, CAPES pela bolsa de estágio no exterior e FAPESP pelos projetos financiados, os meus sinceros agradecimentos.

- À Biblioteca do IQSC e ao Serviço de Pós-graduação do IQSC, em especial à Andreia e Sílvia, pela competência, amizade e prontidão nas etapas decisivas do meu trabalho.

- Enfim, a todos que de certo modo contribuíram para que esses anos de doutorado fossem alegres e proveitosos. Obrigado!

Publicações Originadas no Período de Doutoramento

1. CRESPILHO, F. N.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N., BRETT C. M. A. Electroactive nanostructured membranes (ENM): Synthesis and electrochemical properties of redox mediator-modified gold nanoparticles using a dendrimer layer-by-layer approach. **Electroanalysis,** 2007. Special edition. In press.

2. CRESPILHO, F. N.; NART, F. C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; BRETT, C. M. A. Oxygen Reduction and diffusion in electroactive nanostructured membranes (ENM) using the layer-by-layer dendrimer-gold nanoparticles approach. **Electrochimica Acta**, 2007. In press.

3. CRESPILHO, F. N.; GHICA, M. E.; FLORESCU, M.; NART, F. C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; BRETT, C. M . A . A strategy for enzyme immobilization on Layer-by-Layer dendrimer-gold nanoparticle electrocatalytic membrane incorporating redox mediator. **Electrochemistry Communications**, v. 8, p. 1665-1670, 2006.

4. CRESPILHO, F. N.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; NART, F. C. Electrochemistry of Layer-by-Layer films: A review. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 1, p. 194-214, 2006.

5. CRESPILHO, F. N.; ZUCOLOTTO, V.; BRETT, C. M. A.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; NART, F. C. Enhanced charge transport and incorporation of redox mediators in layer-by-layer films containing PAMAM encapsulated-gold nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, p. 17478-17483, 2006.

6. CRESPILHO, F. N. ; ZUCOLOTTO, V. ; SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; CARVALHO, A. F. J. ; NART, F. C. ; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Using electrochemical data to obtain energy diagrams for layer-by-layer films from metallic phthalocyanines. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 1, p. 151-159, 2006.

7. CRESPILHO, F. N.; HUGUENIN, F.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVI, P.; NART, F. C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Dendrimers as nanoreactors to produce platinum nanoparticles embedded in Layer-by-Layer films for methanol-tolerant cathodes. **Electrochemistry Communications**, v. 8, p. 348-352, 2006.

8. CRESPILHO, F. N.; BORGES, T. F.; ZUCOLOTTO, V. ; LEITE, E. R. ; NART, F. C. ; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Synthesis of core-shell Au@polypyrrole nanocomposite using a dendrimer-template approach. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, p. 2588-2590, 2006.

9. SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; GASPAROTTO, L. H. S.; CRESPILHO, F. N.; CARVALHO, A. F. J.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Physicochemical Properties and Sensing Ability of Metallophthalocyanines/Chitosan Nanocomposites, **Journal of Physical Chemistry B,** v. 110, p. 22690-22694, 2006.

10. CRESPILHO, F. N.; ZUCOLOTTO, V. ; SIQUEIRA J. R, J. R.; CONSTANTINO, C. J. L. ; NART, F. C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Immobilization of humic acid in layer-by-layer nanostructured films: Film assembly and sensing applications. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 5385-5289, 2005.

Sumário

Lista de Figuras i

Lista de Tabelas vi

Lista de Abreviaturas e Siglas vii

Lista de Símbolos viii

Resumo ix

Abstract x

CAPÍTULO I: Apresentação 1

CAPÍTULO II: Objetivos 2

CAPÍTULO III: Introdução 4
3.1 Moléculas Biológicas Imobilizadas em Eletrodos: Estado da Arte 4
3.2 Mediadores Redox 6
3.3 Preparação de MENs por Automontagem: Química Supramolecular 8
3.4 MENs e suas Aplicações 9
3.5 MENs Contendo Dendrímero e Nanopartículas 11
3.6 Referências 17

CAPÍTULO IV – Experimental 22
4.1 Materiais e Reagentes: Aspectos Gerais 22
4.2 Técnicas de Caracterização 23
4.3 Sistema Eletroquímico 25
4.4 Referências 26

CAPÍTULO V: Síntese de Nanopartículas Metálicas Utilizando PAMAM 27
5.1 Síntese das Nanopartículas 27
5.2 Estabilidade das Nanopartículas em Suspensão Aquosa 28
5.3 Espectroscopia Eletrônica das Nanopartículas 30
5.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão das Nanopartículas 34
5.5 Espectroscopia de Infravermelho do Híbrido PAMAM-Au 38
5.6 Difração de Raios X 40
5.7 Evolução Temporal na Formação de PAMAM-Au 44
5.8 Conclusões 47
5.9 Referências 48

CAPÍTULO VI: Filmes Automontados com Nanopartículas de Ouro 51
6.1 Preparação de Filmes Automontados de PVS/PAMAM-Au 51
6.2 Tempo de Formação de PVS/PAMAM-Au em Substratos de Vidro e ITO 52
6.3 Crescimento das Multicamadas de PVS/PAMAM-Au em Quartzo e ITO 57
6.4 Conclusões 63
6.5 Referências 63

CAPÍTULO VII: Transporte de Carga e Imobilização de Mediadores Redox para Formação de Membranas Eletroativas Nanoestruturadas (MENs) 66
7.1 Mecanismo de Transporte de Carga e Cinética em Filmes de PVS/PAMAM-Au 67
7.2 Evidência da Formação de um Sistema *Core-Shell* Nanopartículas@Mediador 72
7.3 Preparação de MENs Utilizando Mediadores Redox de Hexacianoferrato de Cobre, Níquel, Ferro e Cobalto 75
7.4 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) dos Eletrodos Modificados com Mediadores Redox e Estudo das suas Propriedades Catalíticas 80
7.5 Conclusões 84
7.6 Referências 85

CAPÍTULO VIII: Imobilização Enzimática em MENs: Estudo de Biocatálise e Preparação de Biossensores 86

8.1 Imobilização Enzimática 87

8.2 Propriedades Biocatalíticas dos Eletrodos Modificados 92

8.3 Propriedades Biocatalíticas do Eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx 96

8.4 Imobilização de GOx no Eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF Utilizando *drop-coating* 98

8.5 Variação da Concentração de Enzima no Eletrodo 101

8.6 Utilizando o Eletrodo ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx como Biossensor 102

8.7 Conclusões 104

8.8 Referências 105

CAPÍTULO IX: Conclusões 107

CAPÍTULO X: Propostas para Trabalhos Futuros 110

Lista de Figuras

Figura 3.1 - Representação esquemática do processo de fabricação de filmes nanoestruturados por automontagem utilizando dois polieletrólitos genéricos. O substrato sólido é imerso em solução (1) de um polieletrólito com carga positiva durante determinado tempo. Logo após (a), o mesmo substrato é imerso em água para remover o excesso e moléculas fracamente adsorvidas, completando a formação de uma camada. Em seguida (b), o substrato é imerso em solução com polieletrólito com cargas negativas (3) e, subsequentemente (c), o excesso de moléculas é novamente removido em água (4). Após cada ciclo, completa-se a formação de uma bicamada. 9

Figura 3.2 – Estrutura molecular da poliamidoamina (PAMAM) geração 4. As cavidades na molécula servem como nano-reatores para estabilizar nanopartículas metálicas. Os grupamentos aminas (-NH_2) ao redor da molécula podem ser protonados em solução aquosa, tornando PAMAM carregada positivamente, e possibilitando que o híbrido PAMAM/nanopartículas possa ser automontado em um substrato sólido. 12

Figura 3.3 – Esquema da síntese de nanopartículas metálicas encapsuladas em PAMAM G4. Em solução aquosa, tem-se PAMAM e um sal metálico (por exemplo, $KAuCl_4$, $AgNO_3$, K_2PtCl_4, etc.). Com a adição de um agente redutor (ácido fórmico, por exemplo) os metais são reduzidos no interior das cavidades moleculares do PAMAM. Após a síntese, as nanopartículas ficam estabilizadas em suspensão aquosa. 13

Figura 3.4 - Representação esquemática proposta por Tomalia e colaboradores do processo de fabricação de filmes nanoestruturados de PSS/PAMAM-Au por automontagem (figura retirada da referência 31). Primeiramente, forma-se uma bicamada com polieletrólito positivo (PDAC) seguida da deposição de PSS. A última camada é representada pela adsorção do PAMAM-Au. 14

Figura 3.5 – Visualização do tamanho relativo entre a molécula de PAMAM G4 (4,5 nm) e nanopartículas (1,5 a 6,0 nm). 16

Figura 4.1 – Modelo de cela utilizada nos experimentos eletroquímicos. Em destaque, um eletrodo de ITO utilizado como eletrodo de trabalho, que consiste em um placa de vidro recoberta com um filme fino oxido de estanho e índio (ITO) cuja área de 1 cm^2 é delimitada com resina de poliepóxido. 25

Figura 5.1 – Fotografia das suspensões contendo PAMAM-Au, PAMAM-Ag e PAMAM-Pt, da esquerda para a direita respectivamente. 29

Figura 5.2 – Espectro de UV-Vis das suspensões de nanopartículas e seus respectivos sais em solução aquosa: (a) PAMAM-Ag, (B)PAMAM-Au e (c) PAMAM-Pt. 33

Figura 5.3 – Imagens de TEM em campo escuro para suspensão de PAMAM-Pt. 35

Figura 5.4 – Histograma com a contagem de 200 nanopartículas de Pt. 36

Figura 5.5 – Imagens de TEM em campo escuro para suspensão de PAMAM-Au. 36

Figura 5.6 – Histograma com a contagem de 200 nanopartículas de Au. 37

Figura 5.7 – Imagens de TEM em campo escuro para suspensão de PAMAM-Ag. 37

Figura 5.8 – Espectros de FTIR para o PAMAM puro (a). Após a formação do híbrido PAMAM-Au, as bandas da amida I e II são fortemente influenciadas, como destacado em (b). 39

Figura 5.9 – Ilustração da difração de raios X em um plano cristalino de uma nanopartícula metálica. Cada átomo de metal na estrutura cristalina age como espelho refletindo o feixe de raios X. O feixe refletido pode ser descrito pela lei de Bragg $2d\text{sen}\theta = \lambda$, onde λ é o comprimento de onda do feixe. 41

Figura 5.10 – Difração de raios X para filmes cast com PAMAM-Ag (a), PAMAM-Pt (b) e PAMAM-Au (c) depositados em vidro utilizando 0,5 mL de solução.

Figura 5.11 – Ilustração de uma cela unitária de um sistema cúbico de face centrada (a), onde o índice de Miller (111) é apresentado em destaque (b). Note que o difratograma teórico em (c) representa um sistema cúbico de face centrada. 43

Figura 5.12 – Espectro de UV-Vis do meio reacional contendo na proporção (v:v) 1:1:1 de PAMAM 0,1 mol L^{-1}, $KAuCl_4$ 0,1 mol L^{-1} e ácido fórmico 10%. T = 25 °C e *t* = 24 h. 46

Figura 6.1 – Espectro de UV-Vis do substrato de quartzo em diferentes tempos de imersão em suspensão de PAMAM-Au. 53

Figura 6.2 – Variação da absorbância em 550 nm com o tempo de imersão do substrato de quartzo. 54

Figura 6.3 – Voltametria cíclica em diferentes tempos de imersão. Eletrólito: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}. 56

Figura 6.4 – Variação da corrente de pico anódica com o tempo de imersão do substrato de ITO-PVS na suspensão de PAMAM-Au. 67

Figura 6.5 – Espectro eletrônico do substrato de quartzo contendo diferentes bicamadas de PVS/PAMAM-Au. 58

Figura 6.5 – **a)** Espectro eletrônico normalizado do substrato de quartzo contendo diferentes bicamadas de PVS/PAMAM-Au. **b)** Variação do comprimento (deslocamento batocrômico) de onda da banda plasmônica em função do número de bicamadas. 59

Figura 6.6 – Espectro eletrônico do substrato de quartzo contendo diferentes camadas de PVS/PAMAM -PVS/PAMAM-Au. 60

Figura 6.7 – Espectro eletrônico do substrato de quartzo contendo diferentes camadas de PSS/PAMAM-Au. 61

Figura 6.8 – Voltametria cíclica do eletrodo de ITO contendo diferentes números de bicamadas de PVS/PAMAM-Au. Eletrólito: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}. 62

Figura 7.1 – Voltametria cíclica do eletrodo de ITO-$(PVS/PAMAM\text{-}Au)_6$ em diferentes velocidades de varredura. No *inset*, mostra-se a corrente de pico anódica vs. velocidade de varredura. Eletrólito: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}. 67

Figura 7.2 – Voltametria cíclica do eletrodo de ITO e ITO-$(PVS/PAMAM\text{-}Au)_6$ em solução 5,0 mmol L^{-1} de hexacianoferrato de potássio. Eletrólito: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}. 69

Figura 7.3 – Voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura do eletrodo de ITO-$(PVS/PAMAM\text{-}Au)_6$ em solução 5,0 mmol L^{-1} de hexacianoferrato de potássio. Eletrólito: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}. No *inset*, tem-se a corrente de pico anódica variando linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura. 70

Figura 7.4 – Voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura do eletrodo de ITO em solução 5,0 mmol L^{-1} de hexacianoferrato de potássio. Eletrólito: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}. No *inset*, tem-se a variação da corrente de pico anódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura. 71

Figura 7.5 – Voltametria cíclica em diferentes estágios de formação de PB em solução 5,0 mmol L^{-1} de hexacianoferrato de potássio. Eletrólito: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}. **a)** primeiro ciclo voltamétrico. **b)** Voltamograma cíclico obtido após 10 ciclos consecutivos. **c)** Voltamograma cíclico após o sistema ser deixado em circuito aberto durante 2 horas. Do lado direito é ilustrado o processo de formação do sistema *core-shell* Au@PB. 73

Figura 7.6 – Voltametria cíclica (eletrodeposição) dos mediadores redox usando eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$. Os mediadores eletrodepositados são: (**a)** FeHCF, (**b)** NiHCF, **(c)** CoHCF e **(d)** CuHCF. 77

Figura 7.7 – Voltametria cíclica dos eletrodos ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@Me em tampão fosfato pH 6,7, onde Me= **(a)** FeHCF, (**b)** NiHCF, **(c)** CoHCF e **(d)** CuHCF. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}. 79

Figura 7.8 – Espectros de impedância no plano complexo para o eletrodo de ITO com 3 bicamadas de PVS/PAMAM-Au antes (-□-) e após (-○-) a eletrodeposição dos mediadores redox. (a) FeHCF, (b) NiHCF, (c) CoHCF and (d) CuHCF em potencial de circuito aberto (OCP). Variação de frequência: 65 kHz a 0.1 Hz. 81

Figura 7.9 – Voltametria cíclica dos eletrodos ITO-(PVS/PAMAM-Au)3@Me em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 6,7 (linha preta) e na presença de H_2O_2 1 mmol L^{-1} (linha azul) e 5 mmol L^{-1} (linha vermelha), onde Me= (a) FeHCF, (b) NiHCF, (c) CoHCF e (d) CuHCF. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}. 83

Figura 8.1 – Modelo estrutural do monômero de GOx . Em vermelho, mostra-se o cofator FAD. 87

Figura 8.2 – Esquema das estratégias utilizadas para imobilização de GOx. 89

Figura 8.3 – Entrecruzamento entre PAMAM e BSA/GOx utilizando glutaraldeído. 91

Figura 8.4 – Eletrodeposição do mediador redox CoHFC em três etapas diferentes (10 ciclos por etapa) para formar um eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au@CoHCF)$_3$. 92

Figura 8.5 – Efeito da adição de diferentes concentrações de glicose na corrente obtida por cronoamperometria utilizando como eletrodo de trabalho ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx (i), ITO-(PVS/PAMAM-Au@CoHCF)$_3$-Gox (ii) e ITO-(PVS/PAMAM-Au@CoHCF@Gox)$_3$ (iii). Eletrólito: solução tampão fosfato (pH 7,0) Potencial aplicado: 0,0 V (Ag/AgCl). 93

Figura 8.6 – Modelo esquemático para as reações de oxidação de glicose no eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx. 95

Figura 8.7 – Preparação e caracterização do eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx. Em (a) tem-se 30 ciclos voltamétricos da deposição de CoHCF em ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$, onde a deposição ocorreu linearmente com as correntes de pico e o número de ciclos (b). O eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$CoHCF foi transferido para um cela contendo tampão fosfato (pH 7,0) e submetido a ciclos com diferentes velocidades de varredura (c), onde linearidade entre as correntes de pico e a velocidade de varredura foi obtida (d). A variação entre a concentração de peróxido de hidrogênio e a corrente está apresentado em (e). Após a imobilização de GOx, o eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx apresentou comportamento típico de um dispositivo enzimático frente à adição de glicose(f). 99

Figura 8.8 – Variação da corrente de redução de peróxido de hidrogênio obtida em função da concentração de glicose utilizando o eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx preparado por dois métodos distintos de imobilização enzimática: *dip-coating* e *drop-coating*. 100

Figura 8.9 – Resposta à variação de glicose para um eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx utilizando diferentes quantidades de enzima depositada por *drop-coating*. 101

Figura 8.10 – Típica resposta à variação de glicose para um biossensor do tipo ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx. 103

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 – Pesquisas recentes envolvendo imobilização enzimática em eletrodo sólido 5

Tabela 4.1 – Técnicas utilizadas 24

Lista de Abreviaturas e Siglas

BSA *(bovine serum albumin*) – albumina de soro bovino

CV (*cyclic voltammetry)* – voltametria cíclica

DENs *(dendrimer-stabilized nanoparticles)* – nanopartículas estabilizadas em dendrímeros

EIS (*electrochemical impedance spectroscopy*) – espectroscopia de impedância eletroquímica

FTIR (*Fourier transform Infrared spectroscopy*) – espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

G4 – geração quatro

GA – glutaraldeído

GOx – glicose oxidase

ITO – oxido de estanho e índio

Me – mediador redox

MENs – membranas eletroativas nanoestruturadas

Nps – nanopartíclulas

OCP (*open circuit potential*) – potencial de circuito aberto

PAMAM – poliamidoamina

PAMAM-Ag – nanopartícula de prata encapsulada em PAMAM

PAMAM-Au – nanopartícula de ouro encapsulada em PAMAM

PAMAM-Pt – nanopartícula de platina encapsulada em PAMAM

PB (*Prussian blue*) – azul da Prússia

PSS – poliestireno sulfonado

PVS – poli(ácido vinilssulfônico)

SPAB *(surface plasmon absorption band*) – banda de absorção de plasmom

TEM *(transmission electronic microscopy)* – microscopia eletrônica de transmissão

UV-Vis – espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível

Lista de Símbolos

A – área do eletrodo

a_n e b_n - coeficientes de Mie, onde *n* é a ordem da excitação do multipolo esférico das nanopartículas

C – concentração em solução

d - distância entre os planos cristalinos

D_{app} – coeficiente de difusão aparente

E_{pa} – potencial de pico anódico

E_{pc} – potencial de pico catódico

I – corrente

I_a- corrente de pico anódica

I_{max} – corrente máxima

I_p- correntes de pico catódica

I_{ss} – corrente de estado estacionário

$K_0 = 2\pi/\lambda$

K_m - constante de Michaelis-Menten

t – tempo

v - velocidade

λ - comprimento de onda da radiação eletromagnética

ε_m - função dielétrica

ν - velocidade de varredura

Resumo

Esta tese aborda quatro tópicos fundamentais para o desenvolvimento e aplicação de membranas eletroativas nanoestruturadas (MENs): (i) síntese e caracterização de nanopartículas (Nps) de prata, ouro e platina encapsuladas em moléculas de dendrímero poliamidoamina geração 4 (PAMAM); (ii) preparação de filmes automontados contendo PAMAM e Nps de ouro (PAMAM-Au); (iii) preparação de MENs utilizando sistema *core-shell* PAMAM-Au@Me, onde Me é um mediador redox; (iv) imobilização enzimática em MENs e estudos biocatalíticos associados a processos eletroquímicos. As Nps foram caracterizadas observando-se a banda plasmônica em espectros na região do UV-Vis. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão revelaram que PAMAM-Au e PAMAM-Pt possuem morfologias esféricas, enquanto o PAMAM-Ag forma grandes cristais com estruturas fractais. Estruturas cúbicas de face centrada caracterizaram os cristais formados de Au e Pt, sendo possível estimar os diâmetros (3,0 nm) das Nps pela equação de Scherrer em difratogramas de raios X, confirmados posteriormente por microscopia eletrônica por transmissão (TEM). Um indício de estabilização por encapsulamento do híbrido PAMAM-Au foi obtido de espectros de infravermelho (FTIR), a partir de modificações nas bandas das amidas. A cinética de reação para formação de PAMAM-Au também foi estudada. Filmes de PVS/PAMAM-Au (onde PVS é o poli(ácidovinilssulfônico)) foram preparados com 5 minutos de imersão, com a mesma quantidade de material sendo adsorvida em cada camada, segundo medidas de espectroscopia UV-Vis e voltametria cíclica (CV). No caso do eletrodo ITO-(PVS/PAMAM-Au), saltos de elétrons foram considerados o mecanismo de transporte de carga ao longo do filme. Um novo sistema *core-shell* Au@PB foi preparado, formando um sistema ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_6$@PB, em que a eletrodeposição de PB (azul da Prússia) foi monitorada medindo-se as correntes faradaicas durante os ciclos potenciodinâmicos. Outros mediadores de hexacianoferratos de metais de transição (Fe, Ni, Co e Cu) foram obtidos sobre eletrodos de ITO-(PVS/PAMAM-Au). De resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), verificou-se que a resistência de transporte de carga decresce na sequência CuHCF > FeHCF > NiHCF > CoHCF e todos os eletrodos apresentaram atividade catalítica para o peróxido de hidrogênio. Uma nova configuração de eletrodo, ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx, pôde ser aplicada como dispositivo enzimático, com a glicose oxidase (GOx) sendo imobilizada por *drop-coating* na superfície do eletrodo e aplicada em experimentos de biocatálise. A glicose pôde ser detectada a 0,0 V (Ag/AgCl), com resposta linear até 100 μmol L^{-1} de glicose, sensibilidade de 115 nA mmol L^{-1}, limite de detecção de 5,5 μmol L^{-1} e K_M^{app} de 0,24 mmol L^{-1}, mostrando que o sistema aqui proposto cria um ambiente propício para a enzima operar com alta atividade catalítica.

Abstract

This thesis addresses four fundamental topics for producing and applying electroactive nanostructured membranes (ENMs): (i) synthesis of Au, Pt and Ag nanoparticles (Nps) using polyamidoamine (PAMAM generation 4) dendrimers as template/stabilizers; (ii) fabrication of layer-by-layer (LbL) films comprising PAMAM with AuNps (PAMAM-Au) and poly(vinylsulfonic acid) (PVS); (iii) preparation of a new core-shell system with Prussian blue (PB) around the Au nanoparticles (PAMAM-Au@PB); (iv) enzyme immobilization on ENMs and bioelectrochemistry studies. The formation of the Nps inside PAMAM was monitored by measuring the plasmonic band of NPs via UV-Vis spectroscopy. Images from transmission electron microscopy (TEM) showed well-organized Au and Pt spherical particles, with average diameter of 3 nm and narrow size distribution. In addition, X-ray diffraction of Nps enabled easy identification of the Nps atomic planes (face-centered cubic arrangements). However, PAMAM-Ag growth showed fractals structures. In order to confirm Au NPs encapsulation inside the PAMAM dendrimer, FTIR spectra in the transmission mode for neat PAMAM and PAMAM-Au were compared. The kinetics of formation of PAMAM-Au was studied by UV-Vis spectroscopy. The deposition of individual PAMAM-Au layers was examined in detail: the adsorption kinetics was determined by CV to be first-order and that 5 min of adsorption was sufficient for maximum coverage. Formation of PVS/PAMAM-Au multilayers showed a linear increase in anodic and cathodic peak currents, indicating that the same amount of material was adsorbed in each deposition step. Electron-hopping was inferred as the charge transport mechanism between PAMAM-Au layers. Using hexacyanoferrate (III) to probe the electrochemical reaction at the electrode surface, the charge transport in the PAMAM-Au layers was shown to be faster than for non-modified electrodes. A new system based on PAMAM-Au@PB was prepared by simple potential cycling electrodeposition after ITO-PVS/PAMAM-Au LbL film preparation. New systems are described based on ENM membranes of ITO-PVS/PAMAM-Au LbL electrodes, with a redox mediator (Me) electrodeposited around Au nanoparticles. The resulting ITO-PVS/PAMAM-Au@Me system was then characterised electrochemically using cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. We demonstrated that the concept of ENM can be generalized to a wider variety of redox mediators. All electrodes modified with hexacyanoferrates showed electrocatalytic activity towards hydrogen peroxide, which is promising for the preparation of nanodevices requiring redox mediators. An electrochemical enzyme device with glucose oxidase (GOx) immobilized at ITO-$(PVS/PAMAM\text{-}Au)_3$@CoHCF ENM was developed. Using CoHCF as redox mediator, hydrogen peroxide (the enzymatic reaction product) was determined at 0.0 V (vs. SCE), with linear range up to 100 μmol L^{-1} of glucose, sensitivity of 115 nA mmol L^{-1}, detection limit of 5.5 μmol L^{-1} and K_M^{app} of 0.24 mmol L^{-1}. Such a performance indicates that this system promotes a friendly environment for enzyme immobilization.

CAPÍTULO I:
APRESENTAÇÃO

Inserido num contexto multidisciplinar, este trabalho lida com nanomateriais e materiais biológicos aplicados em filmes automontados, com a eletroquímica exercendo papel fundamental na compreensão dos sistemas investigados. A escrita desta tese de doutorado baseou-se em quatro principais objetivos das atividades de pesquisa, que estão logo apresentados no capítulo II. Na Introdução (cap. III), serão abordados os principais tópicos ligados ao estado da arte e uma análise crítica da bibliografia pertinente. Em seguida, alguns aspectos experimentais gerais são apresentados no capítulo IV. Os capítulos subsequentes estão organizados em Resultados e Discussão (cap. V, VI, VII e VIII). Em cada um desses, estão também inseridos os detalhamentos experimentais. Por fim, tem-se as Conclusões (cap. IX) e Propostas para Trabalhos Futuros (cap. X). A organização e distribuição dos capítulos estão feitas de forma independente. Porém, os quatros capítulos em Resultados e Discussão respeitam um cronograma lógico e são complementares.

CAPÍTULO II:
Objetivos

Os principais objetivos deste trabalho foram:

1. ***Síntese e caracterização de nanopartículas metálicas encapsuladas em dendrímero:*** sintetizar e caracterizar nanopartículas de ouro, prata e platina em meio aquoso utilizando o dendrímero poliamidoamina (PAMAM G4) como estabilizador.

2. ***Preparação e caracterização de filmes automontados com nanopartículas de ouro e dendrímero poliamidoamina (PAMAM-Au):*** preparar e caracterizar filmes nanoestruturados de PAMAM-Au juntamente com polieletrólito poli(ácido vinilssufônico), PVS. Estudar o transporte de carga nas multicamadas de PVS/PAMAM-Au utilizando eletroquímica.

3. ***Preparação e caracterização de membranas eletroativas nanoestruturadas (MENs) por meio de eletrodeposição de mediadores redox em filmes automontados de PVS/PAMAM-Au:*** eletrodepositar os mediadores hexacianoferrato de cobre, ferro, níquel e cobalto e estudar as propriedades catalíticas dos mesmos.

4. ***Estudo da Imobilização enzimática em MENs:*** imobilizar e caracterizar a enzima glicose oxidase em eletrodo contendo membranas eletroativas. Verificar possíveis aplicações em biossensores e dispositivos enzimáticos.

CAPÍTULO III:
INTRODUÇÃO

3.1 Moléculas Biológicas Imobilizadas em Eletrodos: O Estado da Arte

Moléculas biológicas como enzimas, DNA, oligonucleotídeos e aminoácidos passaram a despertar interesse em cientistas não ligados à área da biologia, como físicos, químicos e engenheiros de materiais[1-12]. Tal interesse está ligado ao avanço da nanociência e nanotecnologia, que possibilitou compreender fenômenos em escala nanométrica. O grande desafio, no que tange à química de superfícies e à engenharia molecular, é conseguir reproduzir efeitos biológicos de forma mais realista possível, com biomoléculas fora do seu ambiente natural. Por exemplo, ao retirar uma enzima de seu meio natural e imobilizá-la em um substrato sólido, propriedades relacionadas aos sítios catalíticos, estrutura molecular e atividade enzimática podem ficar comprometidas. Isso ocorre por ser muito difícil reproduzir o ambiente biológico, devido à complexidade de parâmetros físicos e químicos do sistema.

Uma grande contribuição para entender processos ligados às moléculas biológicas vem da área de *bioeletroquímica*[12]. Influenciada pelo advento da nanociência, a bioeletroquímica ou a chamada *bionanoeletroquímica*[9], passou a

se ocupar dos processos de transferência de carga entre moléculas biológicas e nanoestruturas (nanopartículas, nanotubos, etc.). Além disso, mostrou-se que estudar a interação entre nanopartículas e biomoléculas auxilia a compreensão das propriedades das enzimas imobilizadas no estado sólido[9,10], e do controle de reações de troca de carga envolvendo DNA[2,11].

Novos modelos de imobilização de enzimas geraram novas tecnologias para biossensores[6,10-12] e células a combustível biológicas[8] (*bio-fuel cell*), para as quais é essencial compreender processos eletroquímicos de transferência de carga entre a enzima e o eletrodo (substrato sólido). Nos biossensores, a enzima é responsável por catalisar reações químicas que, por sua vez, geram substâncias que podem ser estudadas e/ou detectadas em processos de redução e oxidação na superfície do eletrodo. Transferência eletrônica direta enzima-eletrodo também pode ocorrer nesses sistemas[11,12].

Antecedendo o processo de imobilização enzimática, é preciso desenvolver eletrodos que facilitem transferências eletrônicas e não interfiram nas propriedades biológicas da enzima a ser imobilizada. Esta meta tem guiado pesquisadores na busca de um sistema ideal. Na tabela 3.1, apresentamos um sumário de pesquisas recentes focalizadas na preparação de eletrodos e imobilização enzimática.

Tabela 3.1 – Pesquisas recentes envolvendo imobilização enzimática em eletrodo sólido

Enzima	Tipo de eletrodo	Mediador de elétrons	Referência
Glicose Oxidase	Eletrodo de ouro modificado com ditiol	Nanopartículas de ouro	4
Mioglobina	Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono	nanotubos de carbono (*Multi-walled)*	5
Catalase	Eletrodo de diamante modificado via ligação covalente com a enzima	Diamante nanocristalino com terminações de hidrogênio	6
Glicose Oxidase	Eletrodo de ouro	Multicamadas de azul da Prússia	7
Glicose Oxidase	Fibra de carbono	Hidrogel condutor	8

3.2 Mediadores Redox

Um grande avanço na preparação de sistemas com transferência de carga eficiente entre enzima e eletrodo ocorreu com o uso de mediadores redox[10-14]. Neste caso, a modificação da superfície de eletrodos sólidos visa a aumentar a velocidade da transferência heterogênea de carga para certas espécies químicas. A idéia envolve imobilização de mediadores apropriados na superfície do eletrodo de forma que o processo eletroquímico ocorra com menor sobrepotencial. Neste sentido, a interação química entre a enzima imobilizada e o substrato sólido (eletrodo) influencia diretamente o mecanismo catalítico[10,12]. Um eletrodo modificado é geralmente preparado para funcionar num processo dinâmico no qual camadas imobilizadas reduzem perdas de

energia, melhoram a seletividade e muitas vezes a sensibilidade do eletrodo. A modificação da superfície do eletrodo também visa a melhorar a estabilidade química e mecânica do filme, características básicas para garantir durabilidade do dispositivo e reprodutibilidade dos experimentos. Os sistemas tradicionais de preparação de mediadores redox imobilizados em substratos condutores utilizam dois procedimentos de obtenção: por síntese química e por eletrodeposição[9,10]. Na eletrodeposição, o mediador redox é imobilizado ou pela aplicação de um potencial constante em um eletrodo de trabalho ou pela aplicação de vários ciclos voltamétricos, pela técnica de Voltametria Cíclica (CV). Ressalte-se que as técnicas de automontagem[14,15], Langmuir-Blodgett[16] e de produção de nanoarquiteturas com química supramolecular[17,18] também vêm sendo utilizadas na imobilização de mediadores redox.

Um dos problemas da imobilização enzimática em eletrodos é a estabilidade desses mediadores em água e soluções iônicas. Outro fator importante é preparar um sistema biocompatível com mediadores redox, pois em biossensores a enzima é imobilizada após uma camada muito fina do mediador redox e nem sempre as moléculas biológicas mantêm sua atividade em contato com os mediadores. Para contornar esses problemas, novos sistemas nanoestruturados têm sido aplicados[1,4,10,17,18]. Um exemplo é a imobilização de nanopartículas metálicas (Np) na superfície do eletrodo e subsequentemente a deposição de um mediador[9,10.14,18]. Após a imobilização das Nps, um mediador redox pode ser imobilizado ao redor das mesmas, formando um sistema contendo núcleo metálico e uma "casca" com mediador (*core-shell*)[18]. Este conceito é o tema central desta tese de doutorado, onde

membranas eletroativas nanoestruturadas (MENs)[9] foram desenvolvidas para posterior imobilização enzimática. Para preparar as MENs, utilizou-se a técnica de automontagem, também chamada de *layer-by-layer* (LBL)[19]. Essa técnica apresenta diversas vantagens, como a simplicidade dos aparatos experimentais utilizados na fabricação dos filmes. Os conceitos da automontagem estão descritos a seguir.

3.3 Preparação de MENs por Automontagem: Química Supramolecular

A técnica de automontagem, descrita por Decher[19], baseia-se em interações eletrostáticas de camadas moleculares com cargas de sentido contrário. Desta forma, podem-se adsorver alternadamente polieletrólitos aniônicos e catiônicos sobre substratos sólidos sem a formação de ligação covalente (química supramolecular), com bicamadas controladas no nível molecular. A química supramolecular envolvida nesse processo utiliza abordagem centrada na associação de espécies moleculares, visando à obtenção de uma determinada propriedade ou funcionalidade. Na fabricação do filme automontado, um substrato sólido é imerso em solução contendo moléculas catiônicas, de maneira que uma camada do policátion se adsorva na superfície do substrato. Em seguida, o mesmo substrato é imerso na solução aniônica, promovendo a adsorção do poliânion na camada de policátion previamente adsorvida. Obtém-se assim uma bicamada, sendo que a repetição do processo permite a fabricação de filmes finos compostos por quantas camadas forem desejadas. Em vários casos, um dos polieletrólitos pode ser trocado por uma molécula de interesse[14], sendo essa molécula positiva ou negativamente

carregada quando em solução aquosa. A Figura 1 mostra o esquema de preparação dos filmes automontados.

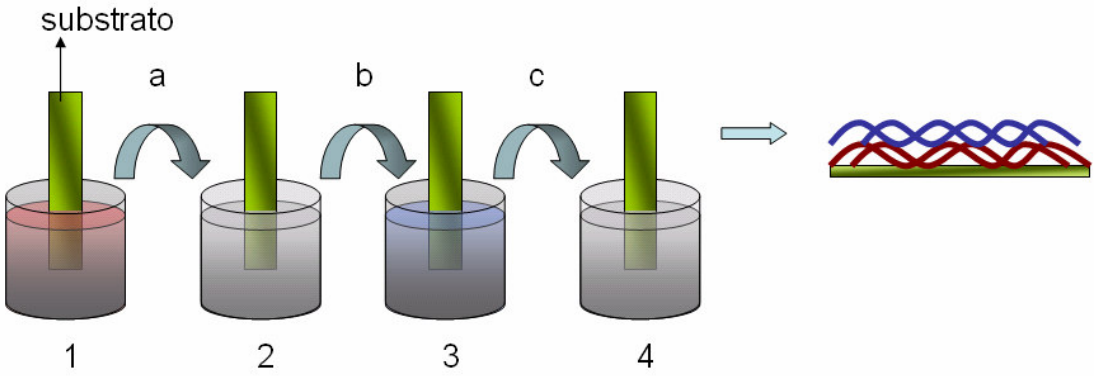


Figura 3.1 - Representação esquemática do processo de fabricação de filmes nanoestruturados por automontagem utilizando dois polieletrólitos genéricos[14,19]. O substrato sólido é imerso em solução (1) de um polieletrólito com carga positiva durante determinado tempo. Logo após (a), o mesmo substrato é imerso em água para remover o excesso e moléculas fracamente adsorvidas, completando a formação de uma camada. Em seguida (b), o substrato é imerso em solução com polieletrólito com cargas negativas (3) e, subsequentemente (c), o excesso de moléculas é novamente removido em água (4). Após cada ciclo, completa-se a formação de uma bicamada.

3.4 MENs e suas Aplicações

Filmes automontados nanoestruturados contendo dendrímero e nanopartículas têm sido preparados com várias finalidades, como síntese de catalisadores, preparação de dispositivos mediadores de elétrons e biossensores[14]. Por exemplo, cátodos para células a combustível foram obtidos por automontagem[20]. Neste caso, o cátodo é responsável pela redução de oxigênio, ao passo que o ânodo da célula oxida metanol. A combinação desses dois sistemas gera energia elétrica a partir de reações eletroquímicas catalisadas geralmente por nanopartículas de platina e/ou liga de platina. Um problema dessas células é que o metanol também pode ser oxidado no cátodo

quando o mesmo está polarizado no potencial de redução de oxigênio, o que faz a célula perder potência. Surpreendentemente, quando se utilizam filmes automontados de platina suportada em dendrímero e poli(ácido vinilssulfônico), as moléculas de metanol não são oxidadas pelo cátodo, enquanto ocorre a redução de oxigênio. Outros exemplos de utilização de MENs são em biossensores e membranas catalíticas com atividades específicas[10].

A fabricação de MENs para biossensores merece atenção especial pelo grande número de trabalhos publicados na última década[4-7,10-15,17], com destaque para o uso de técnicas eletroquímicas na detecção[14]. Por exemplo, eletrodos modificados com filmes automontados com ftalocianinas e quitosana foram empregados na determinação de dopamina em meio aquoso[21]. Mesmo utilizando uma técnica linear de varredura de potencial (voltametria cíclica) é possível quantificar a dopamina em concentrações semelhantes àquelas presentes nos fármacos, além de eliminar o efeito de compostos interferentes (ácido ascórbico, por exemplo), que poderiam vir a comprometer o sinal eletroquímico. Além de aumentar o sinal por transdução eletroquímica, esses filmes apresentam seletividade na determinação da dopamina. Além disso, os compostos de ftalocianinas imobilizados em filmes LbL permitiram que modelos de níveis de energia pudessem ser propostos, o que até então só era conseguido com polímeros condutores utilizando eletroquímica[21]. Além da utilização de ftalocianinas, outros compostos com propriedades específicas podem ser imobilizados na forma de MEN, como os ácidos húmicos, empregados em sensores de moléculas organocloradas[22].

3.5 MENs Contendo Dendrímero e Nanopartículas

Nanocompósitos híbridos incluindo partículas inorgânicas no interior de uma matriz orgânica vêm sendo investigados devido às propriedades químicas únicas exibidas por estes materiais[18,20,24-28]. Os nanocompósitos são sintetizados por complexação de íons metálicos dentro de dendrímeros, onde são reduzidos a valência zero (metal) de maneira controlada, formando nanopartículas estabilizadas pelos dendrímeros. As nanopartículas encapsuladas em dendrímeros (*dendrimer-stabilized nanoparticles* - DENs) combinam propriedades físicas e químicas desejáveis das nanopartículas com a solubilidade ajustável e reatividade do molde da superfície do dendrímero[28]. Além disso, o tamanho, a composição, e a estrutura das nanopartículas podem ser controlados pela estrutura do dendrímero e maneira pela qual os íons do metal são introduzidos no dendrímero. Crooks e colaboradores[24-28] relatam que dendrímeros agem não somente como estabilizadores, mas também como filtro molecular. Muitas classes de dendrímeros foram investigadas desde a primeira síntese do dendrímero poli(propilenoimina) (PPI) por Vögtle[29] em 1978. Dendrímeros vêm sendo aplicados em química de superfícies, liberação controlada de fármacos e síntese de nanopartículas.

Atualmente destaca-se o dendrímero poliamodoamina (PAMAM) pelo grande número de aplicações[18,20,24-28,30]. Os dendrímeros têm estrutura bem definida e versatilidade química, controladas pela modificação do núcleo, tipo e número de unidades repetitivas dos ramos, e os grupos funcionais terminais. As moléculas de PAMAM possuem um núcleo de etilenodiamina que pode estar

ligado a unidades de poliamidas (ramificações). O número de ramificações a partir do núcleo determina a geração do dendrímero (Figura 3.2).

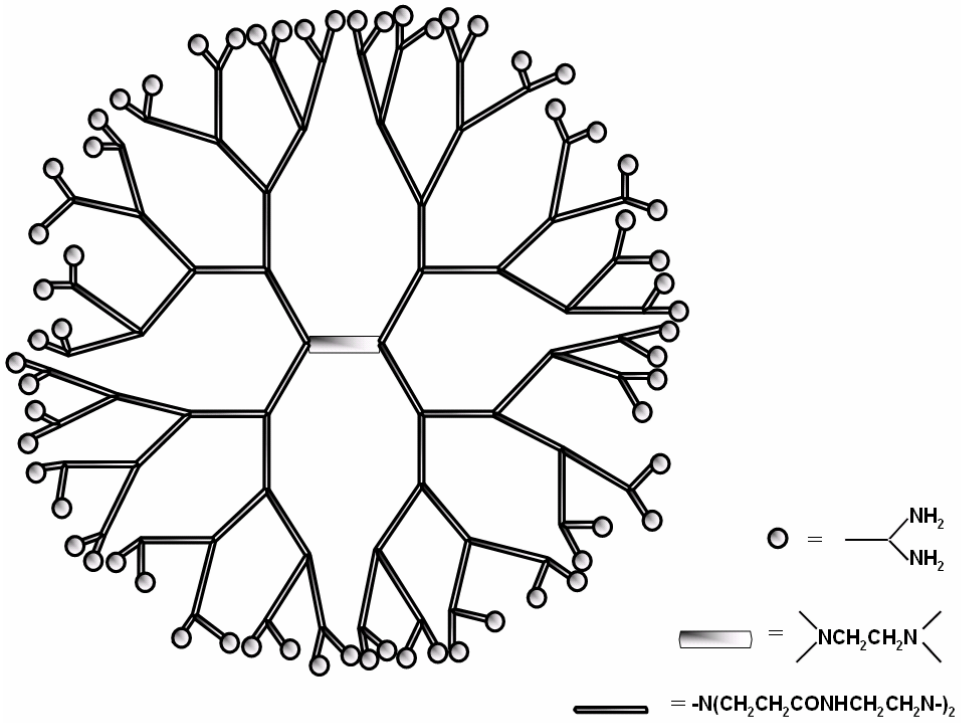


Figura 3.2 – Estrutura molecular da poliamidoamina (PAMAM) geração 4. As cavidades na molécula servem como nano-reatores para estabilizar nanopartículas metálicas. Os grupamentos aminas ($-NH_2$) ao redor da molécula podem ser protonados em solução aquosa, tornando PAMAM carregada positivamente, e possibilitando que o híbrido PAMAM/nanopartículas possa ser automontado em um substrato sólido[18,20].

As moléculas de PAMAM geração 4 (G4) possuem quatro unidades de poliamidas ligadas ao núcleo de etilenodiamina. Essas ramificações fazem com que a molécula possua cavidades intramoleculares, possibilitando seu uso como nano-reator na preparação de nanopartículas metálicas. A síntese das nanopartículas metálicas se dá pela redução de um sal metálico na presença de PAMAM em solução aquosa. A Figura 3 ilustra o processo de obtenção de nanopartículas de ouro encapsuladas em PAMAM.

Figura 3.3 – Esquema da síntese de nanopartículas metálicas encapsuladas em PAMAM G4. Em solução aquosa, tem-se PAMAM e um sal metálico (por exemplo, $KAuCl_4$, $AgNO_3$, K_2PtCl_4, etc.). Com a adição de um agente redutor (ácido fórmico, por exemplo) os metais são reduzidos no interior das cavidades moleculares do PAMAM. Após a síntese, as nanopartículas ficam estabilizadas em suspensão aquosa[18,20,24-28,30].

As moléculas de PAMAM G4 possuem aproximadamente 4,5 nm de diâmetro e contêm 32 grupos interiores de amina terciária e 64 grupos funcionais periféricos. O diâmetro do dendrímero aumenta de maneira praticamente linear com a geração, enquanto o número de grupos funcionais na periferia aumenta exponencialmente. Uma consequência importante deste fato é que a distância entre grupos funcionais na superfície do dendrímero, e consequentemente a flexibilidade dos grupos periféricos, diminuem com o aumento da geração. A distância entre grupos periféricos é importante pois pode ser usada para controlar o acesso de nanopartículas aos catalisadores encapsulados.

Além da capacidade de estabilizar nanopartículas metálicas, a molécula de PAMAM G4 possui 64 grupos aminas na periferia, tornando-a altamente solúvel em água. Uma vez protonadas, as aminas ficam carregadas positivamente, permitindo que a molécula de PAMAM seja utilizada em filmes automontados juntamente com um polieletrólito de carga contrária, como poli(ácido vinilssulfônico) (PVS)[18,20].

O primeiro trabalho relatado na literatura com PAMAM-nanopartículas em filmes automontados foi descrito por He[31] e colaboradores em 1999. Utilizando o poliestireno sulfonado (PSS) como polieletrólito aniônico e um compósito de PAMAM e ouro (PAMAM-Au), multicamadas de PSS/PAMAM-Au foram construídas em diversos substratos sólidos e caracterizadas por técnicas microscópicas e espectroscópicas. Nesse trabalho, os autores obtiveram nanopartículas entre 5-20 nm de diâmetro, uma dispersão de tamanho muito grande, o que compromete os estudos das propriedades em escala nanométricas. Vale ressaltar que nenhum resultado de transferência de carga nesses filmes foi apresentado até o presente momento, o que passa a ser motivação a mais deste doutorado. A Figura 3.4 ilustra o processo de automontagem utilizando multicamadas de PSS/PAMAM-Au desenvolvidas por He e colaboradores[31].

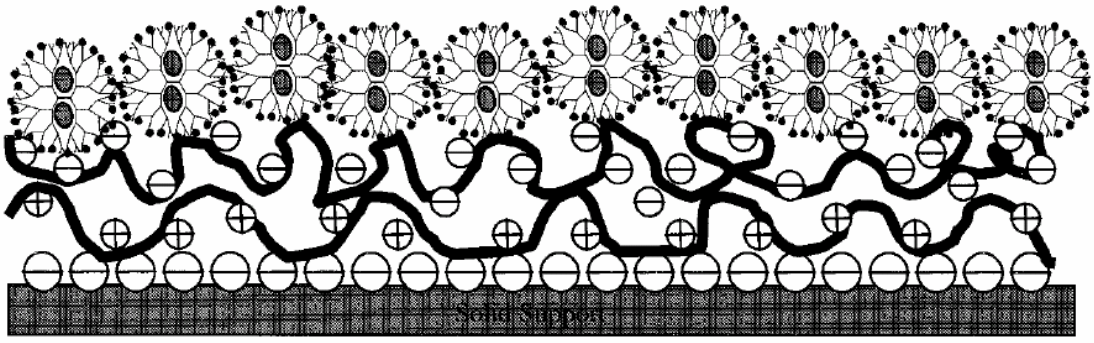


Figura 3.4- Representação esquemática proposta por Tomalia e colaboradores do processo de fabricação de filmes nanoestruturados de PSS/PAMAM-Au por automontagem (figura retirada da referência 31). Primeiramente, forma-se uma bicamada com polieletrólito positivo (PDAC) seguida da deposição de PSS. A última camada é representada pela adsorção do PAMAM-Au.

A representação do filme de PAMAM-Au e PSS da Figura 3.5 não é realista, pois o PAMAM G4 tem cerca de 4,5 nm de diâmetro. Assim, espera-se que uma nanopartícula encapsulada em dendrímero tenha um diâmetro relativo menor. Esse fato é verificado por Crooks[24-28], onde nanopartículas de platina foram sintetizadas com diâmetro médio de 1,5 nm. Dessa forma, a configuração de encapsulamento proposta por He fica comprometida, uma vez que partículas maiores que 5,0 nm de diâmetro foram obtidas[31]. A Figura 6 mostra os tamanhos relativos entre nanopartículas de variados diâmetros e a molécula de PAMAM-G4. Apenas partículas com diâmetros menores que 4,5 nm podem realmente ser encapsuladas pelas moléculas PAMAM G4. Porém, outros modelos de estabilização de nanopartículas são propostos na literatura, o que faz com que a discussão sobre esse tema esteja em aberto[24-31].

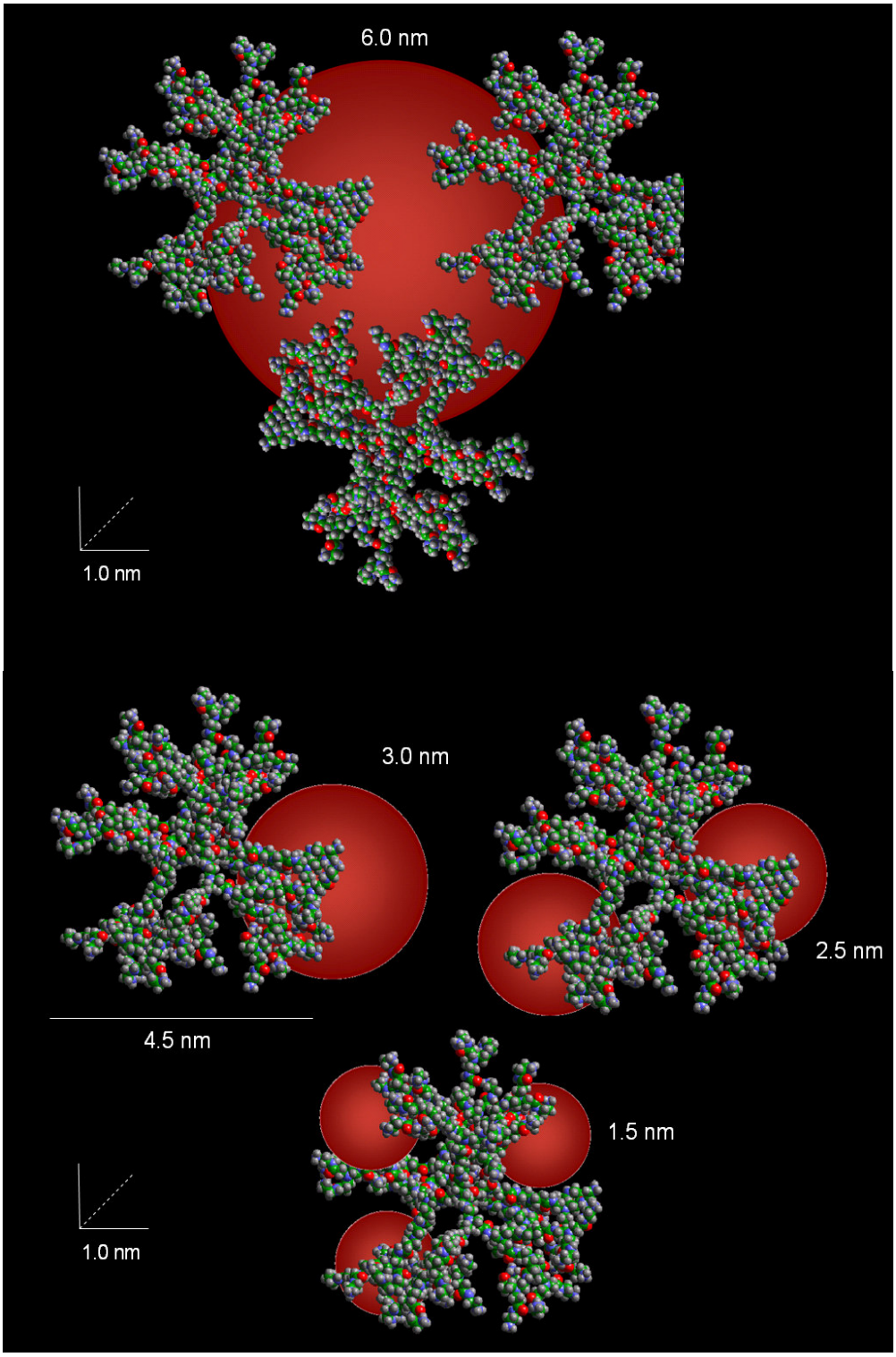


Figura 3.5 – Visualização do tamanho relativo entre a molécula de PAMAM G4 (4,5 nm) e nanopartículas (1,5 a 6,0 nm).

3. 6 Referências

1. NIEMEYER, C. M. Functional hybrid devices of proteins and inorganic nanoparticles. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 42, p. 5796-5800, 2003.

2. TRIBUTSCH, H; POHLMANN, L. Electron transfer: Classical approaches and new frontiers. **Science**, v. 279, p. 1891-1895, 1998.

3. SARASTE, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. **Science**, v. 283, p. 1488-1493, 1999.

4. XIAO, Y.; PATOLSKY, F.; KATZ, E.; HAINFELD, J. F.; WILLNER, I. "Plugging into enzymes": Nanowiring of redox enzymes by a gold nanoparticle. **Science**, v. 299, p. 1877-1881, 2003.

5. ZHAO, G. C.; ZHANG, L.; WEI, X. W.; YANG, Z. S. Myoglobin on multi-walled carbon nanotubes modified electrode: direct electrochemistry and electrocatalysis. **Electrochemistry Communications**, v. 5, p. 825-829, 2003.

6. HARTL, A.; SCHMICH, E.; GARRIDO, J. A.; HERNANDO, J.; CATHARINO, S. C. R.; WALTER, S.; FEULNER, P.; KROMKA, A.; STEINMULLER, D.; STUTZMANN, M. Protein-modified nanocrystalline diamond thin films for biosensor applications. **Nature Materials**, v. 3, p. 736-742, 2004

7. ZHANG, D.; ZHANG, K.; YAO, Y. L.; XIA, X. H.; CHEN, H. Y. Multilayer assembly of Prussian blue nanoclusters and enzyme-immobilized poly(toluidine blue) films and its application in glucose biosensor construction. **Langmuir**, v. 20, p. 7303-7307, 2004.

8. HELLER, A. Miniature biofuel cells. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 6, p. 209-216, 2004.

9. CRESPILHO, F. N.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Electroactive Nanostructured Membranes (ENM): Synthesis and electrochemical properties of redox mediator-modified gold nanoparticles using a dendrimer Layer-by-Layer approach. **Electroanalysis,** Jan. 2007. Special Edition. In Press.

10. CRESPILHO, F. N.; GHICA, M. E.; FLORESCU, M.; NART, F. C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; BRETT, C M A . A strategy for enzyme immobilization on Layer-by-Layer dendrimer-gold nanoparticle electrocatalytic membrane incorporating redox mediator. **Electrochemistry Communications**, v. 8, p. 1665-1670, 2006.

11. DRUMOND, T. G.; HILL, M. G.; BARTON J. K. Electrochemical DNA sensor. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 1192-1199, 2003.

12. MURPHY, L. Biosensors and bioelectrochemistry. **Bioinorganic Chemistry**, v. 10, p. 177 – 184, 2002.

13. CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Mediated biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 17, p. 441 – 456, 2002.

14. CRESPILHO, F. N.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; NART, F. C. Electrochemistry of Layer-by-Layer films: A review. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 1, p. 194-214, 2006.

15. ZHAO, W.; XU,J-J.; CHEN, H-Y. Electrochemical biosensors based on Layer-by-Layer assemblies. **Electroanalysis**, v. 18, p. 1737 – 1748, 2006.

16. TORRES, G. R.; DUPART, E.; MINGOTAUD, C.; RAVAINE, S. Electrochemical and photoelectrochemical properties of new hybrid Langmuir-Blodgett films containing prussian blue and a tris(Bipyridine) ruthenium derivative. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, p. 9487-9490, 2000.

17. ALVES, W. A; FIORITO P. A; DE TORRESI, S. I. C.; TORRESI, R. M. Design of molecular wires based on supramolecular structures for application in glucose biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 22, p. 298-305, 2006.

18. CRESPILHO, F. N.; ZUCOLOTTO, V.; BRETT, C M A; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; NART, F. C. Enhanced charge transport and incorporation of redox mediators in Layer-By-Layer films containing PAMAM encapsulated-gold nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, p. 17478-17483, 2006.

19. DECHER, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. **Science**, v. 277, p.1233-1237, 1997.

20. CRESPILHO, F. N.; HUGUENIN, F.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVI, P.; NART, F. C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Dendrimers as nanoreactors to produce platinum nanoparticles embedded in Layer-by-Layer films for methanol-tolerant cathodes. **Electrochemistry Communications**, v. 8, p. 348-352, 2006.

21. SIQUEIRA JR, J. R.; GASPAROTTO, L. H. S. ; CRESPILHO, F. N.; CARVALHO, A. F. J.; ZUCOLOTTO, V. ; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Physicochemical properties and sensing ability of metallophthalocyanines/chitosan nanocomposites. **Journal of Physical Chemistry B**, 2006. In press.

22. CRESPILHO, F. N.; ZUCOLOTTO, V.; SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; CARVALHO, A. F. J. ; NART, F. C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; Using electrochemical data to obtain energy diagrams for Layer-By-Layer films from metallic phthalocyanines. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 1, p. 151-159, 2006.

23. CRESPILHO, F. N.; ZUCOLOTTO, V.; SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; CONSTANTINO, C. J. L.; NART, F. C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Immobilization of humic acid in Layer-by-Layer nanostructured films: Film assembly and sensing applications. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 5385-5289, 2005.

24. CROOKS, R. M; ZHAO, M. Q.; SUN, L.; CHECHIK, V.; YEUNG L. K. Dendrimer-encapsulated metal nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications to catalysis. **Accounts of Chemical Research**, v. 34, p. 181-190, 2001.

25. ZHAO M. Q.; SUN, L; CROOKS, R. M. Preparation of Cu nanoclusters within dendrimer templates. **Journal of the American Chemical Society,** v. 120, p. 4877-4878, 1998.

26. ZHAO M. Q.; CROOKS, R. M. Homogeneous hydrogenation catalysis with monodisperse, dendrimer-encapsulated Pd and Pt nanoparticles. **Angewandte Chemie-International Edition** , v. 38, p. 364-366, 1999.

27. WELLS, M; CROOKS, R. M. Interactions between organized, surface-confined monolayers and vapor-phase probe molecules .10. Preparation and properties of chemically sensitive dendrimer surfaces. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, p. 3988-3989, 1996.

28. ZHAO M. Q.; CROOKS, R. M. Dendrimer-encapsulated Pt nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications to catalysis. **Advanced Materials**, v. 11, p. 217-220, 1999.

29. BUHLEIER, E.; WEHNER, W.; VOGTLE, F. Cascade-chain-like and nonskid-chain-like syntheses of molecular cavity topologies. **Synthesis-Stuttgart**, v. 2, p. 155-158, 1978.

30. CRESPILHO, F. N.; BORGES, T. F.; ZUCOLOTTO, V. ; LEITE, E. R. ; NART, F. C. ; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Synthesis of core-shell Au@polypyrrole nanocomposite using a dendrimer-template approach. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, p. 2588-2590, 2006.

31. HE, J. A.; VALLUZZI, R.; YANG, K.; DOLUKHANYAN, T.; SUNG, C. M.; KUMAR, J.; TRIPATHY, S. K.; SAMUELSON, L.; BALOGH, L.; TOMALIA, D. A. Electrostatic multilayer deposition of a gold-dendrimer nanocomposite. **Chemistry of Materials**, v.11, p. 3268-3274, 1999.

CAPÍTULO IV – EXPERIMENTAL

4.1 Materiais e Reagentes: Aspectos Gerais

Toda vidraria utilizada nos procedimentos experimetais passou por um minucioso processo de limpeza, que envolveu a utilização de solução sulfonítrica, solução de permanganato de potássio ($KMnO_4$) e solução piranha ($3H_2SO_4$:$1H_2O_2$). Como essas soluções são extremamente oxidantes, o manuseio deve ser feito com muito cuidado. Após a limpeza da vidraria, todas as soluções foram preparadas com água bidestilada e desionizada , purificada por um sistema Millipore (Milli-Q), cuja resistividade não era menor que 18 MΩ cm.

Após preparo das soluções contendo nanopartículas, os filmes automontados foram preparados em diferentes substratos, como vidro, vidro recoberto com ouro ou ITO (oxido de estanho e índio), entre outros. A limpeza desses substratos, também chamada de "processo de hidrofilização" ou *RCA method*, foi desenvolvida por Kern[1] em 1984 e adaptada pelo nosso Grupo[2]. Neste processo os substratos sólidos são colocados em uma solução oxidante ácida ($5H_2O$:$1HCl$:$1H_2O_2$) e aquecido por 10min a 70°C. Em seguida, os substratos são lavados e transferidos para uma solução oxidante básica ($6H_2O$:$1NH_4OH$:$1H_2O_2$) onde o mesmo procedimento é realizado. Por fim, os substratos passam por mais dois processos de lavagem, com álcool isopropílico e

acetona. Todos os materiais que serão descritos na parte experimental dos capítulos de V a VIII passaram por esses procedimentos. Todo resíduo gerado durante os experimentos foi devidamente armazenado e encaminhado para o Laboratório de Tratamento de Resíduos Químicos da USP/São Carlos.

4.2 Técnicas de Caracterização

Várias técnicas foram utilizadas neste trabalho com intuito de caracterizar as nanopartículas formadas, além de acompanhar o crescimento e aplicação dos filmes automontados em eletrodos sólidos. Por exemplo, a microscopia eletrônica de transmissão (TEM) forneceu parâmetros importantes sobre a morfologia, dispersão e diâmetro médio das nanopartículas sintetizadas. Utilizando a espectroscopia eletrônica (UV-Vis), foi possível estudar a interação da radiação luminosa com os elétrons da superfície das nanopartículas, além dos estudos cinéticos de crescimento de filmes. A interação entre as nanopartículas e as moléculas de dendrímero pôde ser estudada por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR). Já as técnicas eletroquímicas trouxeram informações sobre propriedades de transferência de carga nos filmes. Por meio da voltametria cíclica (CV), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e cronoamperometria, foi possível também estudar o comportamento enzimático dos dispositivos preparados com a enzima glicose oxidase imobilizada nas MENs. Optou-se neste capítulo por não se estender nas descrições das técnicas utilizadas, que já são empregadas rotineiramente em muitos laboratórios. Apresenta-se apenas a tabela 4.1 com as especificações dos equipamentos utilizados.

Tabela 4.1 – Técnicas utilizadas

Técnica	Equipamento	Observação/Determinação
Espectroscopia eletrônica (UV-Vis)	Hitachi U-2001 Spectrophotometer; San Jose, CA, USA	- Formação de nanopartículas - Cinética de deposição dos filmes - Crescimento das bicamadas
Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR)	Bomem (Hartmann & Braun), MB-102, com resolução de 4 cm^{-1}	- Interação entre dendrímero e nanopartículas
Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	200-kV transmission electron microscope (TEM, Model CM200; Philips, Eindhoven, the Netherlands)	- Tamanho médio e morfologia das nanopartículas
Difração de Raio X (XRD)		- Caracterização cristalográfica das nanopartículas
Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS)	Solartron 1250 Frequency Response Analyzer, acoplado com Solartron 1286 Electrochemical Interface: Zplot software	- Resistência e capacitância em estudos de transferência de carga em filmes automontados
Voltametria cíclica (CV) e Cronoamperometria	CV-50 W Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN	- Processos redox em nanopartículas e nos dispositivos enzimáticos - Correntes em processos enzimáticos

4.3 Sistema Eletroquímico

Para experimentos eletroquímicos, a VC, EIS e a cronoamperometria foram as técnicas empregadas. Para tal, utilizou-se uma cela eletroquímica com capacidade para 50 mL de solução e um sistema convencional de 3 eletrodos: com Ag/AgCl saturado como eletrodo de referência, um fio em espiral de platina como contra eletrodo e ITO ou ITO modificado (1 cm^2 de área) como eletrodo de trabalho. Quando necessário, submeteu-se a solução eletrolítica à passagem de gás nitrogênio para a remoção de oxigênio. Um esquema da cela está representado na figura 4.1.

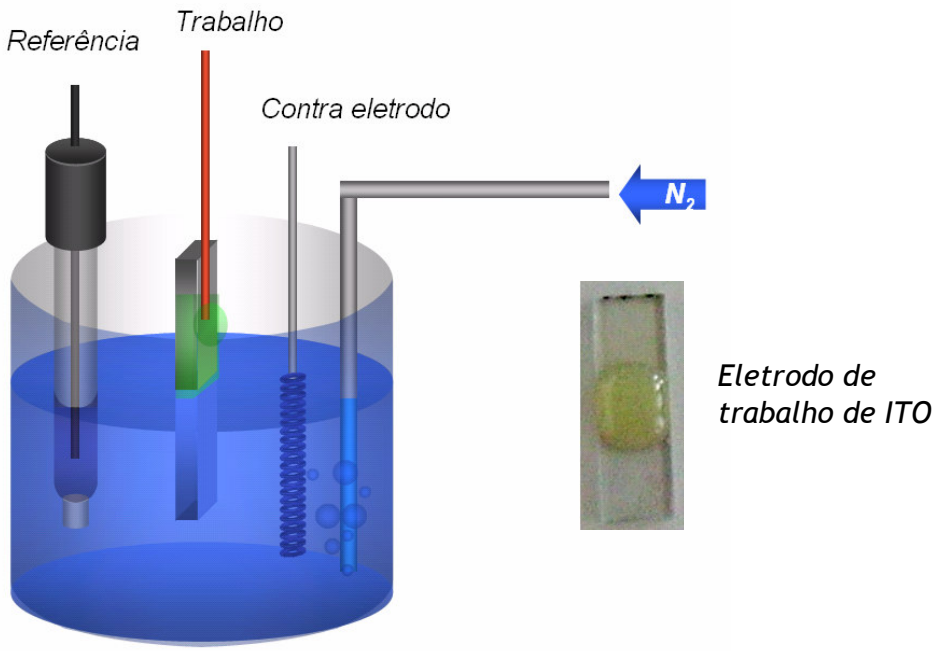


Figura 4.1 - Modelo de cela utilizada nos experimentos eletroquímicos. Em destaque, um eletrodo de ITO utilizado como eletrodo de trabalho, que consiste em uma placa de vidro recoberta com um filme fino oxido de estanho e índio (ITO) cuja área de 1 cm^2 é delimitada com resina de poliepóxido.

4.4 Referências

1. KERN, W. Purifying Si and SiO_2 surfaces with hydrogen peroxide. **Semiconductor International,** v. april, p. 94-99, 1984.

2. ZUCOLOTTO, VALTENCIR. **Compósitos Poliméricos Nanoestruturados de Azocorantes, Ftalocianinas e Polímeros Luminescentes**. 2003. 111 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos/Instituto de Física de São Carlos/Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

3. SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; GASPAROTTO, L. H. S.; CRESPILHO, F. N.; CARVALHO, A. F. J.; ZUCOLOTTO, V. ; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Physicochemical properties and sensing ability of metallophthalocyanines/chitosan nanocomposites. **Journal of Physical Chemistry B**, in press, 2006.

4. CRESPILHO, F. N.; ZUCOLOTTO, V.; SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; CONSTANTINO, C. J. L.; NART, F. C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Immobilization of humic acid in Layer-by-Layer nanostructured films: Film assembly and sensing applications. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 5385-5289, 2005.

CAPÍTULO V: SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS UTILIZANDO DENDRÍMERO PAMAM

A síntese e caracterização das nanopartículas de ouro, prata e platina serão apresentadas neste capítulo. Como visto na figura 3.2, as moléculas de PAMAM possuem cavidades intramoleculares que podem auxiliar na estabilização de nanopartículas em solução aquosa. Assim, um material híbrido contendo dendrímero e metal é obtido, cuja designação se dará por PAMAM-Pt, PAMAM-Au e PAMAM-Ag para os materiais contendo dendrímero poliamidoamina e nanopartículas de platina, ouro e prata, respectivamente.

5.1 Síntese das Nanopartículas

A síntese das nanopartículas metálicas com PAMAM consiste em adicionar em um mesmo meio homogênio (solução aquosa) uma certa quantidade de sal metálico, dendrímero e um agente redutor. A concentração das espécies pode variar de acordo com as propriedades desejadas, como tamanho de partícula. Realizou-se um estudo prévio para otimizar as concentrações dos reagentes. Os fatores considerados *a priori* foram tempo de estabilização, homogeneidade da suspensão, verificação visual de precipitados e aglomeração de material nas

paredes dos recipientes de armazenamento. Outro fator importante foi o tipo de agente utilizado para reduzir os sais metálicos a metal com valência zero. Vários agentes redutores podem ser usados, como ácido cítrico e boroidreto de sódio. Neste caso, preferiu-se utilizar uma solução de ácido fórmico (Aldrich®) 10% (v/v). Após avaliados esses parâmetros, fixaram-se os valores de concentração para cada reagente.

Realizou-se a síntese de PAMAM-Pt em um béquer de 10 mL, onde misturou-se 2 mL de uma solução 1,0 mmol L^{-1} de ácido cloroplatínico (Aldrich®), H_2PtCl_6, com uma solução 0,7 mmol L^{-1} de G4 PAMAM (Aldrich®). A solução foi agitada vigorosamente por 2 minutos e, em seguida, adicionaram-se 2 mL do agente redutor. A solução foi então guardada na ausência da luz durante 24 horas. Para a síntese de PAMAM-Au, utilizou-se o mesmo procedimento e concentrações de reagentes, sendo $KAuCl_4$ (tetracloroaurato de potássio, Aldrich®) o sal metálico. Na síntese de PAMAM-Ag, a diferença foi uma diminuição na concentração do sal de prata utilizado, $AgNO_3$ (nitrato de prata, Merck®), para 0,1 mmol L^{-1}.

5.2 Estabilidade das Nanopartículas em Suspensão Aquosa

Observou-se que as nanopartículas sintetizadas sob as condições descritas anteriormente permanecem estabilizadas por um longo período de tempo, sendo que precipitados ou aglomerados só aparecem após 2 meses. Se as nanopartículas forem expostas diretamente a luz visível, esse tempo diminui para cerca de um mês e meio. Quando maiores concentrações de sal metálico foram utilizadas na síntese das nanopartículas, em pouco mais de 3 dias já

havia o aparecimento de precipitados, indicando formação de aglomerados. Por outro lado, para concentração inferiores das utilizadas, uma cinética de formação lenta e uma baixa concentração de nanopartículas foram observadas. No caso do PAMAM-Ag, observou-se o aparecimento de pequenos cristais adsorvidos na parede do frasco, mesmo que visualmente a suspensão ainda se apresentasse homogênea. A figura 5.1 apresenta uma fotografia das suspensões contendo nanopartículas com a coloração característica para cada tipo de nanopartícula. As cores surgem devido aos plasmons de superfície[1], característicos de cada tipo nanopartícula. Esse efeito da interação entre a luz e os elétrons da superfície das nanopartículas é discutido a seguir.

Figura 5.1 – Fotografia das suspensões contendo PAMAM-Au, PAMAM-Ag e PAMAM-Pt, da esquerda para a direita respectivamente.

5.3 Espectroscopia Eletrônica das Nanopartículas

Um tipo especial de absorção de luz ocorre nas nanopartículas, diferentemente de moléculas cromóforas. Por exemplo, a absorção de fótons por um sistema qualquer que exige presença do campo de radiação é sempre denominada absorção induzida. A absorção do fóton de radiação excita as moléculas para um estado eletrônico de energia maior e para os diversos níveis vibracionais e rotacionais deste estado eletrônico. Este espectro de absorção, portanto, é composto por um conjunto de bandas associadas às diversas transições vibracionais e rotacionais possíveis dos dois estados eletrônicos envolvidos na transição e depende das regras de seleção espectroscópicas para cada caso[2]. Como o espaçamento entre os estados rotacionais é muito pequeno, normalmente estas transições não aparecem na forma de bandas resolvidas. A intensidade de absorção está definida a partir de uma grandeza chamada transmitância. A transmitância e a concentração de uma amostra estão intimamente correlacionadas e podem ser descritas pela Lei de Beer-Lambert[2-4].

Quando nanopartículas interagem com a radiação luminosa, prevalecem as leis de Mie para interpretação dos espectros eletrônicos[1]. Num sistema ideal, pode-se dizer que os elétrons das nanopartículas metálicas podem se mover livremente em um "mar eletrônico", com o sistema tratado como um "gás" de elétrons. Assim, as partículas negativamente carregadas são "misturadas" com os núcleos, dando formato de gases de um estado contínuo. A frequência de ressonância deste plásmon é relacionada diretamente à densidade dos elétrons no sólido. Na prática, a oscilação do plásmon foi proposta porque uma lei

universal descreve a excitação de elétrons de valência nos sólidos, embora fosse definida primeiramente para metais livres de elétron: a estrutura da camada de valência é determinada unicamente pela estrutura do estado contínuo do material.

A teoria de Mie foi desenvolvida a partir das leis do eletromagnetismo clássico de Maxwell e tem sido utilizada em excelente concordância com resultados experimentais[1]. Embora grande parte dos autores considere o termo absorção (A) de luz, a teoria de Mie trata dessa unidade como extinção (σ_{ext} ou Q_{ext}), ou seja, a quantidade de luz que chega ao detector de um espectrofotômetro após a mesma passar através de uma suspensão diluída de nanopartícula é uma contribuição da radiação absorvida pela nanopartícula (σ_{abs}) e da radiação espalhada (dispersada) (σ_{sca}), onde a extinção (absorbância total) é dada por $\sigma_{ext} = \sigma_{abs} + \sigma_{sca}$. Em alguns casos a extinção é descrita como a atenuação da onda propagada em um meio contendo nanopartículas. A extinção está intimamente relacionada com a secção transversal das nanopartículas esféricas, logo σ_{ext} pode ser calculado em função do tamanho da nanopartícula. Considerando a intensidade de luz medida absorvida por uma amostra, pode-se escrever

$$\sigma = \frac{2\pi}{\varepsilon_m k_0^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1)\mathrm{Re}(a_n + b_n) \qquad \text{(eq. 4.1)}$$

onde $K_0=2\pi/\lambda$, ε_m é a função dielétrica, a_n e b_n são os coeficientes de Mie e n é a ordem da excitação do multipolo esférico das nanopartículas. Os coeficientes

de Mie estão relacionados com a parte real das funções de Riccati-Bessel, em que são considerados o tamanho da partícula e constante dielétrica do meio. Uma dedução completa dos termos de a_n e b_n pode ser encontrada na literatura[1].

Assim, as propriedades ópticas das nanopartículas podem ser caracterizadas por UV-Vis, pois exibem uma faixa de absorção intensa nesta região. A figura 5.2 mostra os espectros eletrônicos das suspensões de nanopartículas. Para o PAMAM-Au e PAMAM-Ag, após a redução do íon metálico a metal, aparecem bandas de absorção, conhecidas como *surface plasmon absorption band* (SPAB). Essas bandas são produzidas pelo movimento dos elétrons da banda de condução nas partículas em consequência do campo elétrico da luz incidente, que resulta em deslocamento das cargas negativas e positivas no metal. Este deslocamento dá a origem à polarização da partícula, porque a carga positiva age com uma força restaurando as oscilações dos elétrons. As propriedades de SPAB das nanopartículas dependem do tamanho, forma, meio dielétrico circunvizinho, acoplamento dos colóides e adsorção de solutos[1]. O SPAB pode ser usado também para monitorar a evolução do tamanho de partícula e predizer os mecanismos do crescimento e formação dos nanopartículas.

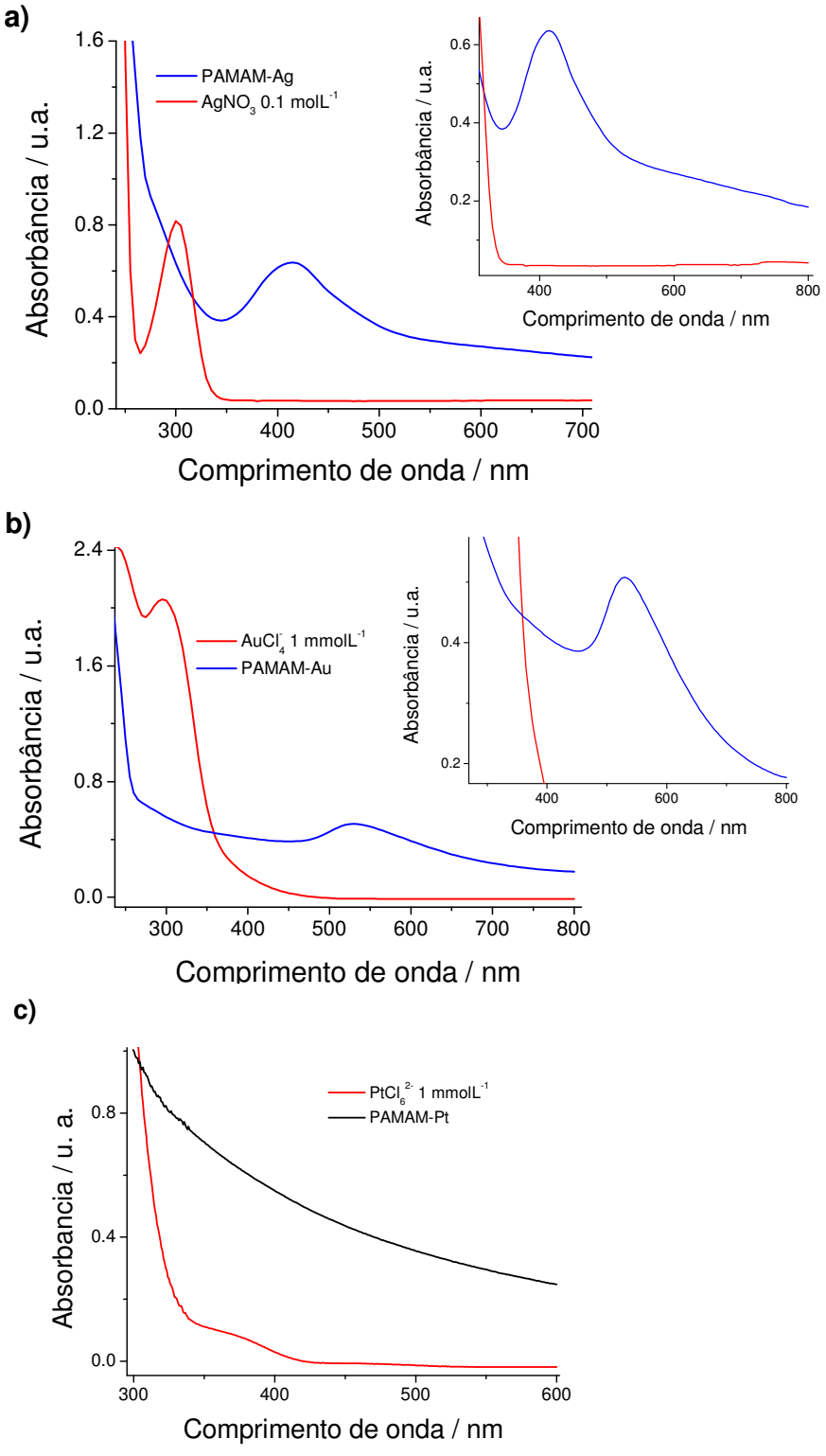


Figura 5.2 - Espectro de UV-Vis das suspensões de nanopartículas e seus respectivos sais em solução aquosa: (a) PAMAM-Ag, (B)PAMAM-Au e (c) PAMAM-Pt.

Todos os espectros da figura 5.2 foram obtidos após 10 dias de reação. Para PAMAM-Pt, há mais espalhamento de luz que para PAMAM-Au e PAMAM-Ag. O espalhamento de luz também é visível para esses dois últimos sistemas, uma vez que é nítido um aumento da absorção da linha de base do espectro. Antes da formação do híbrido PAMAM-Ag, observa-se uma banda em 300 nm referente à absorção dos íons Ag^{+} hidratados. Após a redução dos íons prata, uma banda intensa aparece em 410 nm, demonstrando a presença de nanopartículas de prata. No entanto, há um grande aumento da linha de base que pode estar relacionado a efeitos de espalhamento de luz de agregados formados. Esse fato foi verificado nas imagens de TEM, discutido a seguir.

No caso do PAMAM-Au, o espalhamento não é tão pronunciado e uma banda bem definida em 550 nm é evidente. A redução dos íons Au^{3+} a partir do complexo metálico $AuCl_3^-$ pode ser acompanhado pelo decréscimo da banda em 330 nm referente à absorção de troca de carga metal-ligante. Esta banda desaparece após a total redução dos íons metálicos, que é estudado em detalhe no item 5.8. O mesmo efeito ocorre com a absorção de $PtCl_6^{2-}$ (350 nm) que desaparece após a formação de nanopartículas de platina. Isso evidencia que o agente redutor utilizado reduz eficazmente os íons metálicos.

5.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão das Nanopartículas

Após a síntese das nanopartículas, as suspensões foram submetidas à análise microscópica. O preparo das amostras baseou-se na imersão de uma grande de cobre contendo microporos recobertos com um filme polimérico na suspensão contendo nanopartículas. A figura 5.3 mostra as imagens obtidas para

a suspensão de PAMAM-Pt, indicando morfologia esférica, distribuição homogênea e com pouca dispersão de tamanho.

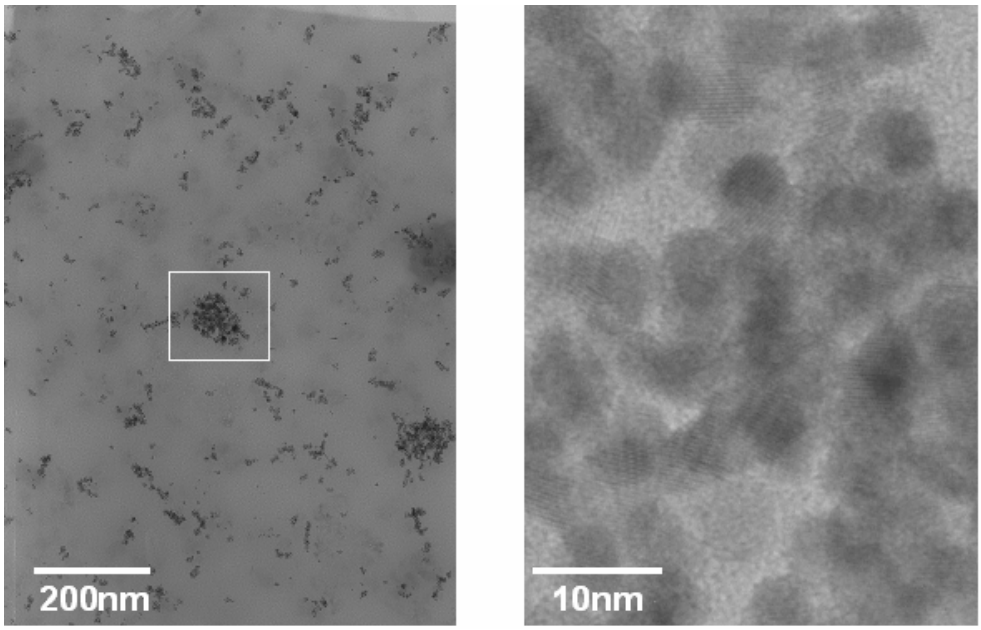


Figura 5.3 – Imagens de TEM em campo escuro para suspensão de PAMAM-Pt.

Realizou-se a contagem do diâmetro de 200 nanopartículas, gerando o histograma da figura 5.4. O diâmetro médio foi de 3,0 nm revelando que o PAMAM estabiliza a formação de nanopartículas com diâmetros muito reduzidos. Esse valor está de acordo com alguns resultados obtidos na literatura, onde nanopartículas entre 1,5 e 3,0 nm foram obtidas utilizando moléculas de dendrímero como molde.

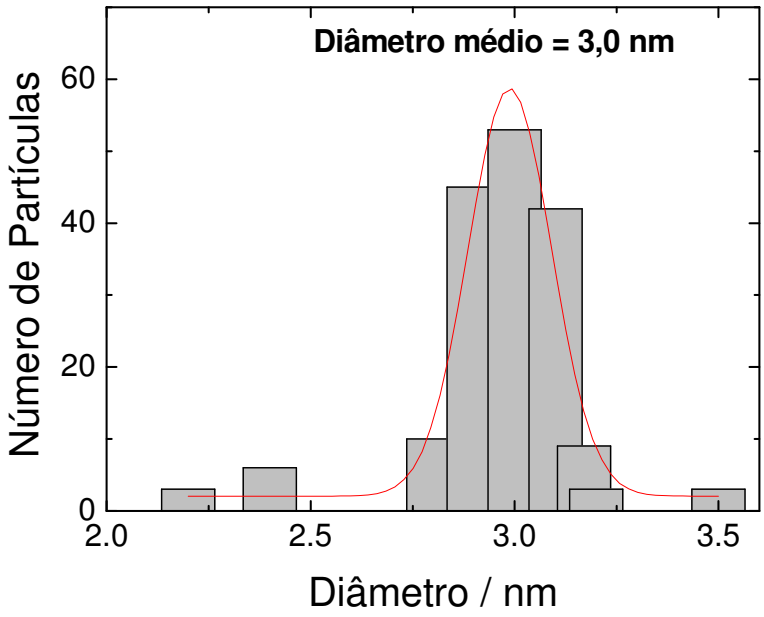


Figura 5.4 – Histograma com a contagem de 200 nanopartículas de Pt.

A figura 5.5 mostra as imagens para a suspensão de PAMAM-Au. Similarmente às nanopartículas de platina, nanopartículas de ouro foram obtidas com diâmetro médio de 3,0 nm. A distribuição gaussiana apresentada no histograma da figura 5.6 revela que a dispersão no diâmetro foi baixa, fato positivo em termos do controle da arquitetura do híbrido PAMAM-Au.

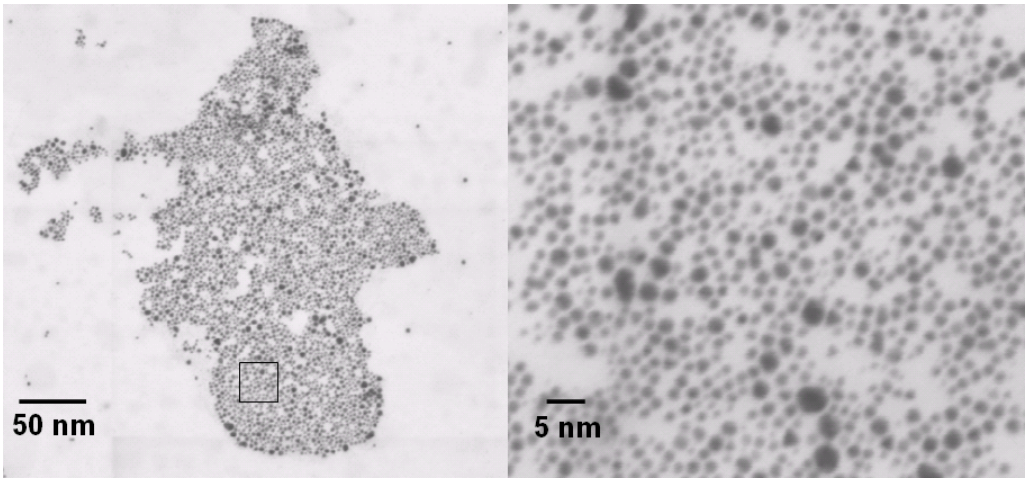


Figura 5.5 – Imagens de TEM em campo escuro para suspensão de PAMAM-Au.

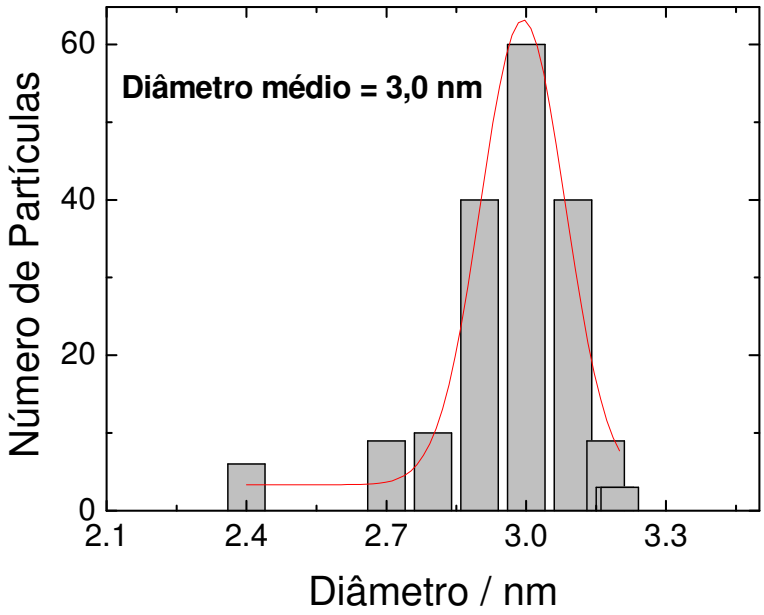


Figura 5.6 – Histograma com a contagem de 200 nanopartículas de Au.

Com relação à síntese de PAMAM-Ag, os resultados obtidos por TEM foram completamente diferentes, pois apareceram estruturas fractais, como pode ser observado na figura 5.7.

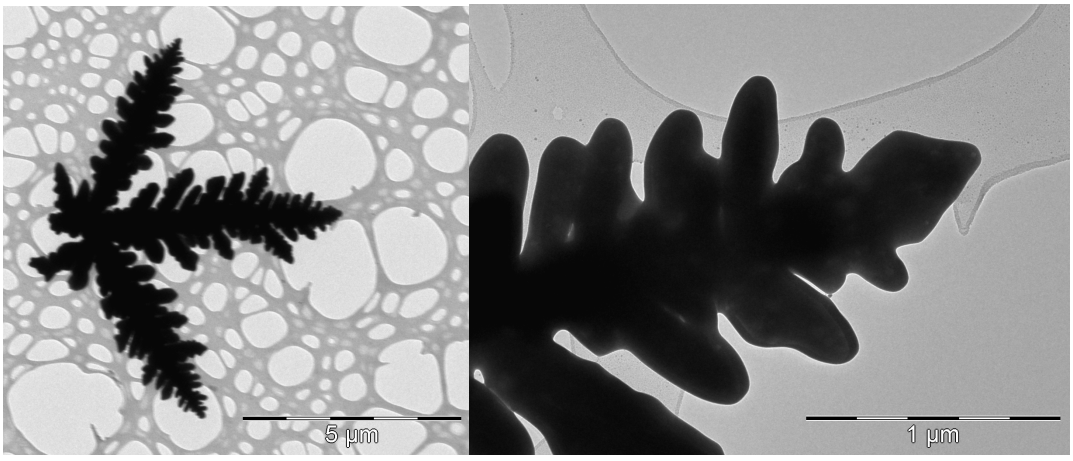


Figura 5.7 – Imagens de TEM em campo escuro para suspensão de PAMAM-Ag.

5.5 Espectroscopia de Infravermelho do Híbrido PAMAM-Au

Como visto para o caso do PAMAM-Ag, não há controle para a formação de nanopartículas esféricas nas condições descritas e ocorre preferencialmente o crescimento de microestruturas fractais, de modo que o dendrímero pode estar atuando apenas como molde para a formação dessas partículas. No entanto, para a platina e ouro ocorre a estabilização do material particulado, além de morfologia e distribuição de tamanhos bem definidos. Há muitos modelos para explicar a estabilização. Um dos mais citados é o de Crooks[5], que propõe partículas sintetizadas dentro das moléculas de PAMAM. Para isso, dois fatores são importantes: i) as partículas sintetizadas têm que ser menores que o diâmetro do dendrímero; ii) se realmente as nanopartículas estão sendo influenciadas pelas cavidades internas das moléculas PAMAM, alguma observação deste efeito nos grupos funcionais internos à molécula de dendrímero seria uma possível explicação do encapsulamento e/ou estabilização[5-9]. Dessa forma, um estudo nos modos vibracionais dos grupamentos amida internos na molécula de PAMAM pode auxiliar na identificação dos efeitos de encapsulamentos.

Este efeito foi investigado por meio experimentos de FTIR com o sistema PAMAM-Au (figura 5.8).

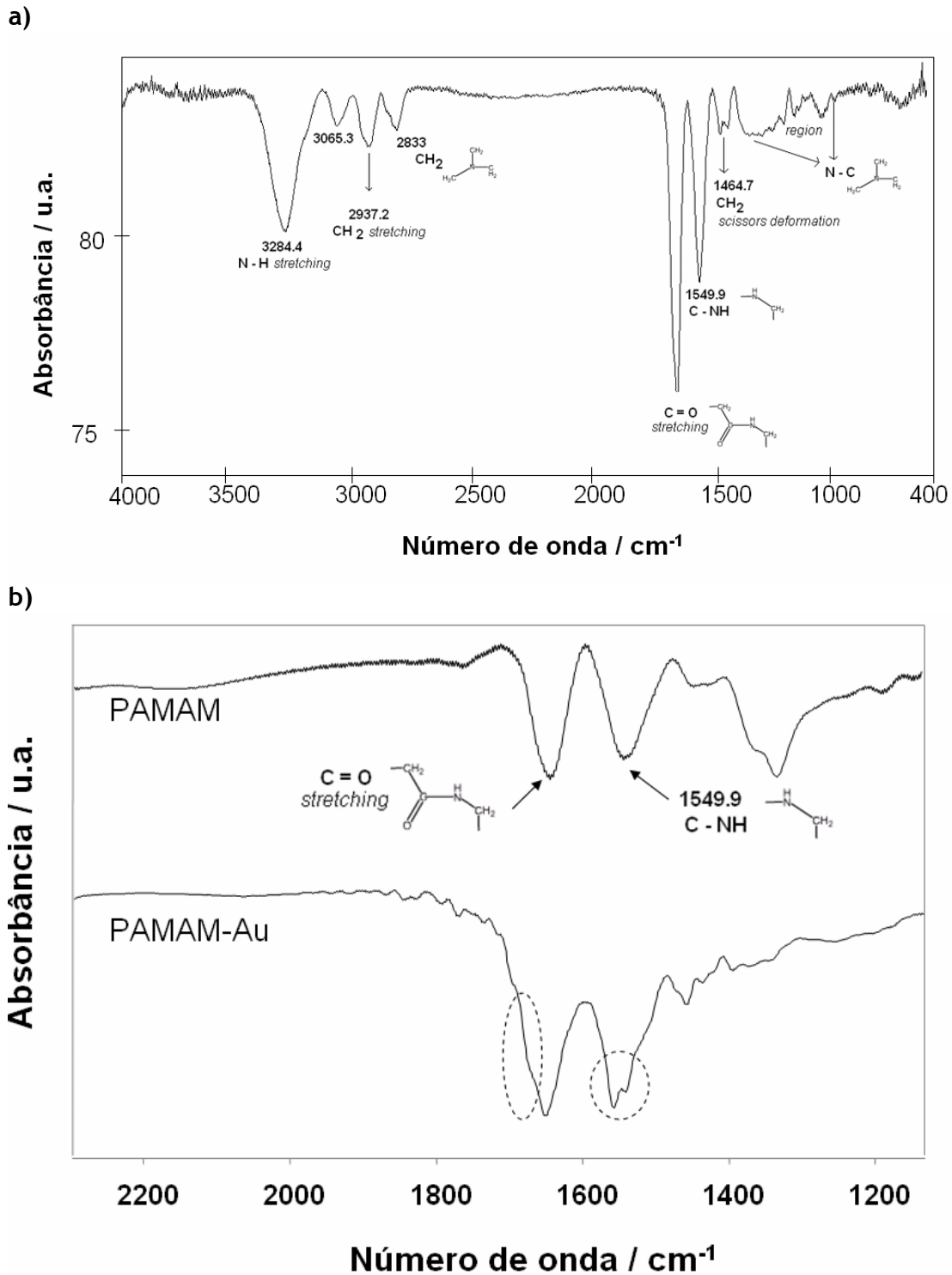


Figura 5.8 – Espectros de FTIR para o PAMAM puro (a). Após a formação do híbrido PAMAM-Au, as bandas da amida I e II são fortemente influenciadas, como destacado em (b).

Preparou-se um filme *cast* com as suspensões de PAMAM-nanopartículas depositado em substrato de silício, ou seja, uma lâmina fina (1 mm) e polida de silício com 1 cm^2. Assim, o substrato foi submetido ao feixe de radiação infravermelha no modo transmissão e os dados foram coletados após o feixe atravessar a amostra. A figura 5.8 mostra os espectros obtidos, onde os dois picos de maior intensidade do espectro do PAMAM estão relacionados aos grupamentos amida. Em 1549 cm^{-1} tem-se o pico referente ao estiramento C-NH, denominado grupamento amida II, enquanto que em 1642 cm^{-1} C=O (-CH_2-**CO**-N-CH_2-) aparece o pico referente à amida I. A presença desses dois grupamentos revela ramificações no dendrímero, responsáveis pela geração do mesmo[3,5-9]. Após a formação de nanopartículas de ouro, observa-se que os dois picos da amida são influenciados, como pode ser visto na figura 5.8b. O pico da amida I divide-se em dois novos picos e um ombro aparece por volta de 1690 cm^{-1} muito próximo do pico da amida II. Efeito similar foi observado para PAMAM-Pt, em que houve apenas um deslocamento do grupo amida I.

5.6 Difração de Raios X

Por difração de raios X é possível estudar a estrutura cristalina, composição e o tamanho das nanopartículas[10]. Para isso, filmes de PAMAM-nanopartículas foram depositados em substrato de vidro de 1,0 cm^2 e em seguida submetidos ao um feixe de raios X gerado a partir de uma fonte monocromática de CuKα (1,5406 Å). A técnica consiste em incidir um feixe de raios X com ângulo de incidência θ sobre o conjunto de planos cristalinos das nanopartículas, cuja distância interplanar é *d*. Os feixes refletidos por dois

planos subsequentes apresentam difração. Caso a diferença entre seus caminhos óticos for um número inteiro de comprimentos de onda, haverá interferência construtiva e um sinal será observado. Caso contrário haverá interferência destrutiva, onde não se observará qualquer sinal de raios X. A figura 5.9 mostra um esquema do processo de difração de raios X.

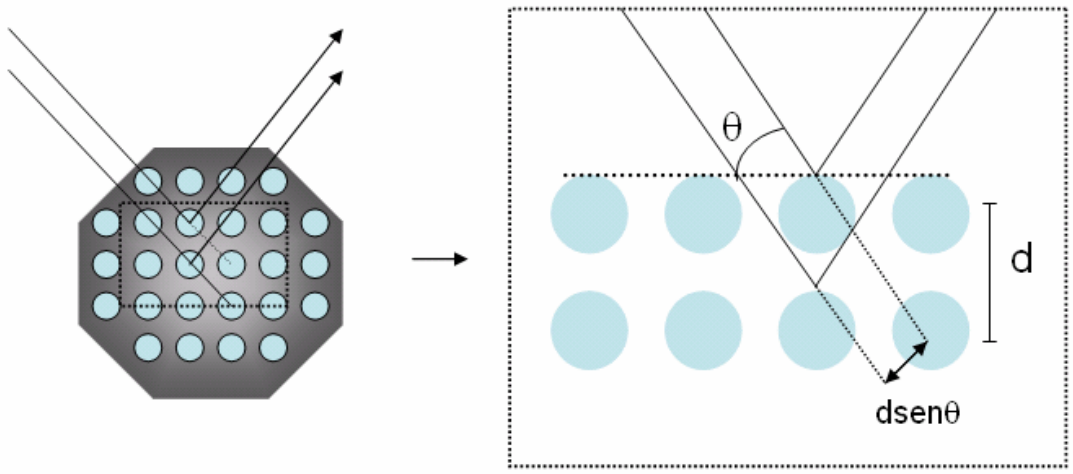


Figura 5.9 – Ilustração da difração de raios X em um plano cristalino de uma nanopartícula metálica. Cada átomo de metal na estrutura cristalina age como espelho refletindo o feixe de raios X. O feixe refletido pode ser descrito pela lei de Bragg $2d\text{sen}\theta = \lambda$, onde λ é o comprimento de onda do feixe.

Os difratogramas para os compósitos PAMAM-Au, PAMAM-Pt e PAMAM-Ag são mostrados na figura 5.10. Os difratogramas apresentaram bandas largas de difração para o PAMAM-Au e PAMAM-Pt indicando partículas de tamanho reduzido. Pode-se identificar os planos (111), (200) e (220) que revelam a geometria cúbica de face centrada, tipicamente obtida para cristais de Au e Pt[10-14].

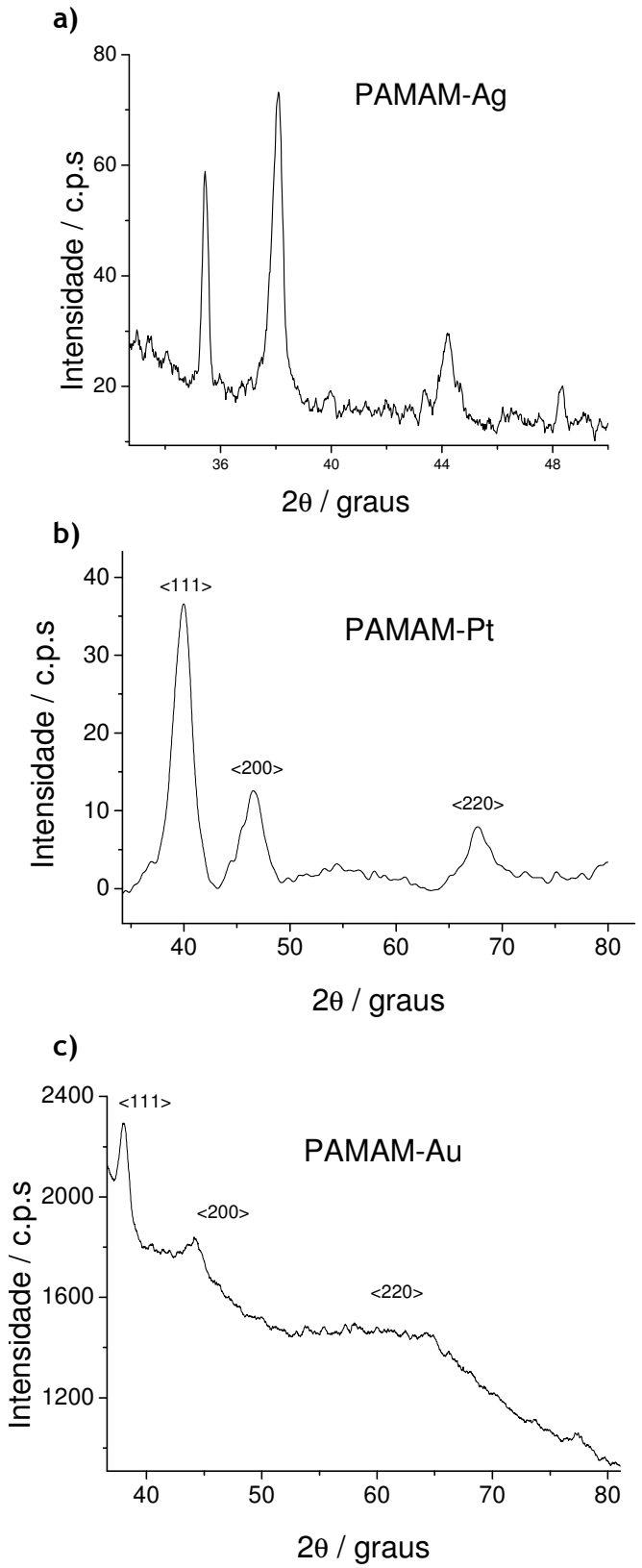


Figura 5.10 – Difração de raios X para filmes cast com PAMAM-Ag (a), PAMAM-Pt (b) e PAMAM-Au (c) depositados em vidro utilizando 0,5 mL de solução.

A figura 5.11 ilustra o formato de uma cela unitária, o plano (111) e os picos teóricos para sistemas cúbicos (2θ = 80°).

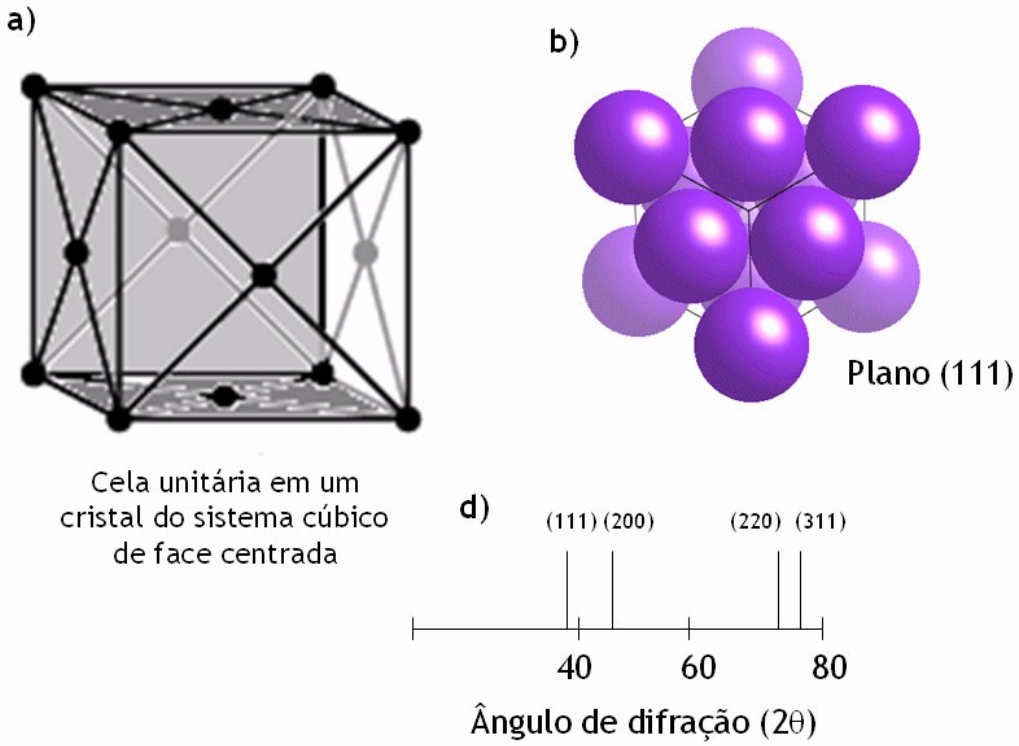


Figura 5.11 - Ilustração de uma cela unitária de um sistema cúbico de face centrada (a), onde o índice de Miller (111) é apresentado em destaque (b). Note que o difratograma teórico em (c) representa um sistema cúbico de face centrada[10].

A representação das faces de Miller (111) no sistema cúbico de face centrada prevê um pico em 2θ = 39°, como ocorreu nos difratogramas de PAMAM-Au e PAMAM-Pt. O modelo de esferas rígidas foi utilizado para representar a distribuição atômica correspondente à orientação cristalográfica superficial (111). Com a equação de Scherrer[10,15] é possível estimar o tamanho do cristal formado, ou seja, se aproximarmos a forma das nanopartículas como esféricas, pode-se determinar o diâmetro médio das nanopartículas. Embora

não muito preciso, este método serve para comparação com os dados obtidos por TEM. Além disso, a aproximação para forma esférica não acrescenta grandes erros, pois tal forma foi observada por TEM. Utilizando a equação de Scherrer (eq. 4.2) e os parâmetros do pico (111), estimou-se o diâmetro médio das nanopartículas de Pt e Au.

$$t = \frac{0{,}9\lambda}{B\cos\theta_B} \qquad \text{(eq. 4.2)}$$

onde t é o tamanho médio das partículas em Å, λ é o comprimento de onda dos raios X (1.5406 Å), B é a largura do pico de difração na meia altura (111) em radianos e θ_B é o ângulo do pico (111).

O diâmetro médio foi de 3,0 nm para Pt e Au, o que corresponde aos valores obtidos por TEM. Para o PAMAM-Ag, nota-se do difratograma (fig. 5.8a) que os picos são muitos agudos, ou seja, indicando que as partículas possuem tamanhos relativamente grandes. Esse fato confirma as características das micrografias da figura 5.5.

5.7 Evolução Temporal na Formação de PAMAM-Au

A síntese do híbrido PAMAM-Au é estudada em detalhe neste tópico, uma vez que este composto foi selecionado para preparação de filmes automontados e aplicação em dispositivos enzimáticos nos capítulos subsequentes. Vários modelos de formação de nanopartículas vêm sendo propostos na literatura, com abordagens bastantes diferentes de um modelo para outro. Para isso,

destacam-se alguns trabalhos[16-17], com a descrição de vários processos de crescimento[16] e modelos para formação de nanopartículas metálicas[17].

No caso da formação de nanopartículas metálicas como o ouro, há uma primeira etapa em que ocorre redução do íon metálico Au^{3+} em solução e a nucleação, seguido de coalescência e, por fim, a formação de agregados. Em resumo, com redução do íon a um átomo metálico, este se une a outros num processo de nucleação, formando as primeiras estruturas do cristal. Em seguida, o choque entre duas estruturas pode ocorrer, com coalescência e formação de uma nanopartícula. A união entre várias nanopartículas pode ocorrer, o que dá origem aos grandes aglomerados.

Para o PAMAM-Au não há, em princípio, formação de grandes aglomerados, uma vez que as nanopartículas são estabilizadas pelas moléculas de PAMAM. Crooks[9] propõe que antes da redução dos íons metálicos ocorre um estágio de complexação entre sal metálico e as amidas da estrutura interna dos dendrímeros. Assim pode-se dizer que ocorre estabilização estérica das nanopartículas em suspensão, onde há adsorção da molécula orgânica na nanopartícula de modo a evitar aglomeração.

Utilizando espectroscopia eletrônica, estudou-se a evolução da banda plasmônica em função do tempo de formação das nanopartículas de ouro. A figura 5.12 mostra os espectros coletados durante a formação de PAMAM-Au. Há duas bandas, caracterizadas por A e B, analogamente à figura apresentada em 5.2. Ao plotar os valores de absorbância máxima das bandas A e B em função do tempo, obtém-se o gráfico apresentado na figura 5.13.

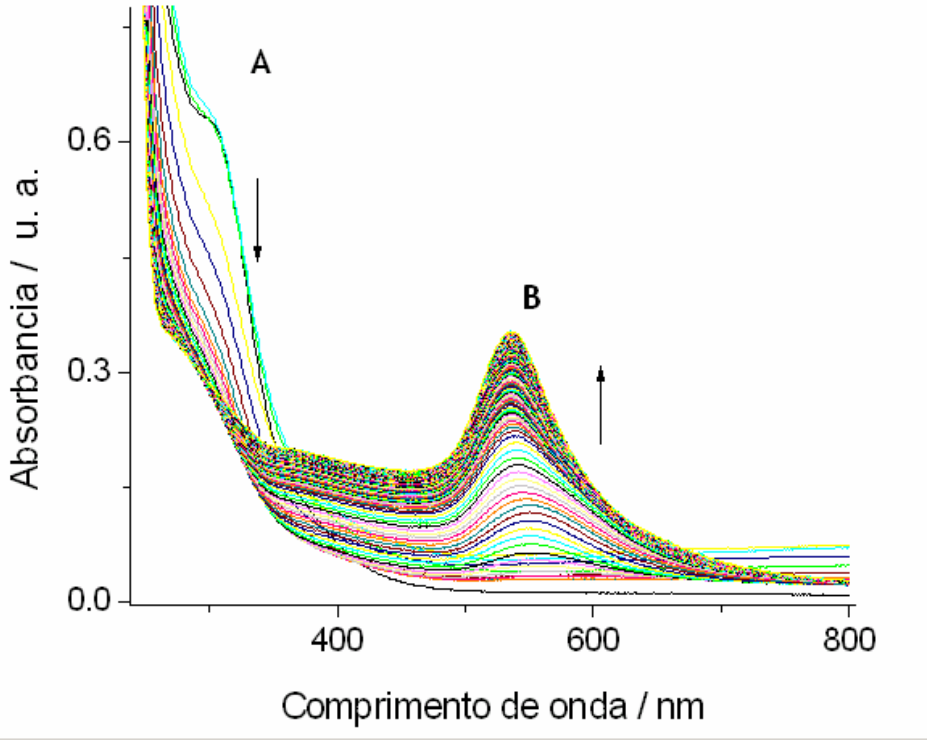


Figura 5.12 – Espectro de UV-Vis do meio reacional contendo na proporção (v:v) 1:1:1 de PAMAM 0,1 mol L^{-1}, $KAuCl_4$ 0,1 mol L^{-1} e ácido fórmico 10%. T = 25 °C e *t* = 24 h.

A etapa de redução dos íons Au^{3+} ocorre até 83 minutos de reação, após o qual aparece a banda B, indicativo do híbrido PAMAM-Au. Até 220 minutos de reação, o crescimento da absorbância da banda B em função do tempo é linear. A partir desse tempo, a absorbância cresce mais lentamente até cerca de 1100 minutos. Da figura 5.13 identificam-se três estágios de formação das nanopartículas. O primeiro é governado exclusivamente pela redução do íon metálico, sendo que os outros podem estar ligados à nucleação dos cristais seguido da coalescência e a limites difusionais, respectivamente.

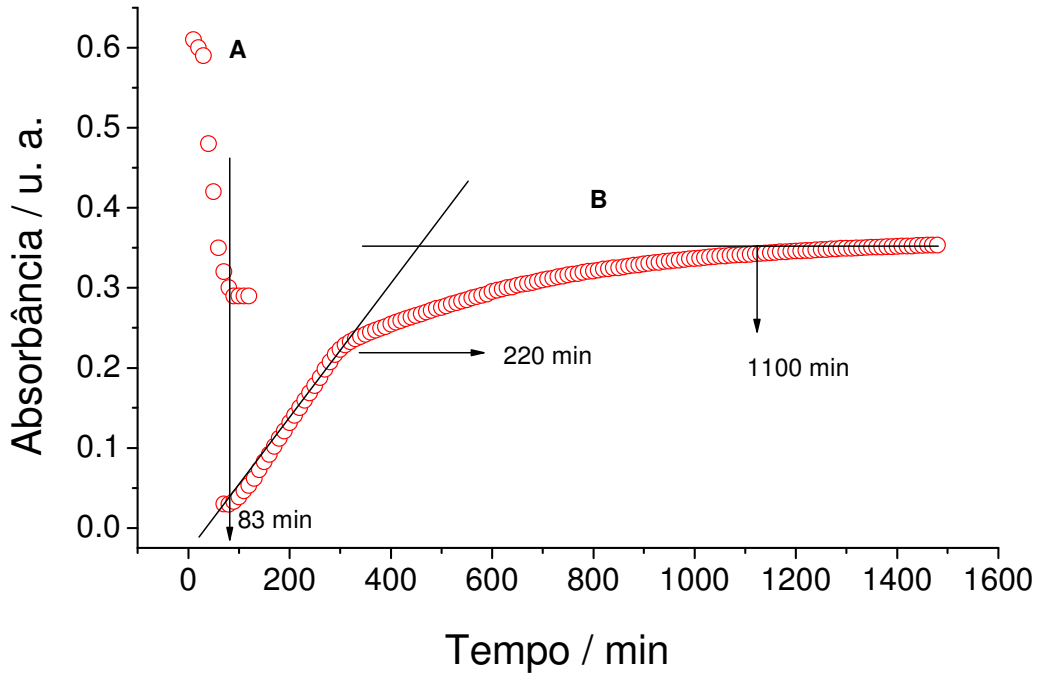


Figura 5.13 - Gráfico da absorbância das bandas A e B e função do tempo de reação. Dados extraídos do espectro eletrônico da figura 5.12.

5.8 Conclusões

Neste capítulo, abordaram-se os principais aspectos da síntese do híbrido PAMAM-nanopartícula. Por meio do espectro eletrônico, caracterizou-se as nanopartículas com base nas bandas de plásmon. Resultados de TEM revelaram que PAMAM-Au e PAMAM-Pt possuem morfologias esféricas, enquanto o PAMAM-Ag forma grandes cristais com estruturas fractais. Esses resultados foram observados também por difração de raios X, onde a estrutura cúbica de face centrada caracterizou os cristais formados e, pela largura do pico referente ao plano (111) do retículo cristalino de Au e Pt, foi possível estimar os diâmetros das nanopartículas pela equação de Scherrer. Obteve-se 3,0 nm de diâmetro para Au e Pt, os mesmos encontrados por TEM. Indício de estabilização por

encapsulamento do híbrido PAMAM-Au foi observado por FTIR. Por último, determinou-se o tempo total de formação de PAMAM-Au e mostrou-se a evolução da reação de formação das nanopartículas em função do tempo. Esses parâmetros são fundamentais, uma vez que nanopartículas de PAMAM-Au podem ser utilizadas em filmes automontados, como apresentado nos capítulos a seguir.

5.9 Referências

1. BOHREN, C. **Absorption and scattering of light by small particles.** New York: John Wiley, 1983. 530 p.

2. NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman spectroscopy of inorganic coordination Compounds.** 3. ed., New York: John Wiley, 1978. 338 p.

3. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F.X; KIEMLE, D.;. KIEMLE, D.J. **Spectrometric identification of organic compounds.** 7. ed. New York: John Wiley, 2003. 340 p.

4. SKOOG, D.A., HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental** 5. ed. Porto Alegre/São Paulo: Artmed – Bookman, 2002, 836 p.

5. CROOKS, R. M; ZHAO, M. Q.; SUN, L.; CHECHIK, V.; YEUNG L. K. Dendrimer-encapsulated metal nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications to catalysis. **Accounts of Chemical Research**, v. 34, p. 181-190, 2001.

6. ZHAO, M. Q.; SUN, L; CROOKS, R. M. Preparation of Cu nanoclusters within dendrimer templates. **Journal of the American Chemical Society,** v. 120, p. 4877-4878, 1998.

7. ZHAO, M. Q.; CROOKS, R. M. Homogeneous hydrogenation catalysis with monodisperse, dendrimer-encapsulated Pd and Pt nanoparticles. **Angewandte Chemie-International Edition** , v. 38, p. 364-366, 1999.

8. WELLS, M.; CROOKS, R. M. Interactions between organized, surface-confined monolayers and vapor-phase probe molecules .10. Preparation and properties of chemically sensitive dendrimer surfaces. **Journal of the American Chemical Society**, V. 118, p. 3988-3989, 1996.

9. ZHAO, M. Q.; CROOKS, R. M. Dendrimer-encapsulated Pt nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications to catalysis. **Advanced Materials**, v. 11, p. 217-220, 1999.

10. SURYANARAYANA, C.; NORTON, M.G. **X-ray diffraction:** a pratical approach. New York: Plenum Press, 1998. 273 p.

11. CRESPILHO, F. N.; GHICA, M. E.; FLORESCU, M.; NART, F. C.; OLIVEIRA JR., O. N.; BRETT, C M A . A strategy for enzyme immobilization on Layer-by-Layer dendrimer-gold nanoparticle electrocatalytic membrane incorporating redox mediator. **Electrochemistry Communications**, v. 8, p. 1665-1670, 2006.

12. CRESPILHO, F. N.; ZUCOLOTTO, V.; BRETT, C. M. A.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; NART, F. C. Enhanced charge transport and incorporation of redox mediators in Layer-By-Layer films containing PAMAM encapsulated-gold nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, p. 17478-17483, 2006.

13. CRESPILHO, F. N.; HUGUENIN, F.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVI, P.; NART, F. C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Dendrimers as nanoreactors to produce platinum nanoparticles embedded in Layer-by-Layer films for methanol-tolerant cathodes. **Electrochemistry Communications**, v. 8, p. 348-352, 2006.

14. CRESPILHO, F. N.; BORGES, T. F.; ZUCOLOTTO, V. ; LEITE, E. R. ; NART, F. C; OLIVEIRA JR., O. N. Synthesis of core-shell Au@polypyrrole nanocomposite using a dendrimer-template approach. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, p. 2588-2590, 2006.

15. WEST, A.R. **Solid State Chemistry and its Applications.** New York: Wiley, 1984. 320 p.

16. LEE, E.J.H. **Síntese e caracterização de nanocompósitos de estanho (SnO_2) a partir de suspensões coloidais**. 2003. 98 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

17. SCHEEREN, C.W. **Líquidos iônicos na síntese e estabilização de nanopartículas Pt(0), Pd/Pt(0), caracterização e estudo de hidrogenação catalítica** . 2003. 212 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

CAPÍTULO VI: FILMES AUTOMONTADOS COM NANOPARTÍCULAS DE OURO

A síntese e caracterização de filmes automontados com nanopartículas de ouro serão apresentadas neste capítulo. Como mencionado no capítulo anterior, a suspensão contendo PAMAM-Au foi caracterizada por TEM e partículas com diâmetro médio de 3,0 nm podem ser facilmente obtidas. Devido aos grupos aminas da estrutura do PAMAM, essa molécula pode apresentar carga positiva em solução, uma vez que as aminas protonadas apresentam a estrutura – NH_3^+. Utilizando o polieletrólito negativo, o poli(ácido vinilssulfônico) (PVS), multicamadas de PVS/PAMAM-Au foram obtidas e caracterizadas como mostrado a seguir.

6.1 Preparação de Filmes Automontados de PVS/PAMAM-Au

As multicamadas contendo PVS/PAMAM-Au foram automontadas em substratos sólidos de ITO, vidro, silício e quartzo. Primeiramente mergulhou-se o substrato em solução PVS 0,5 mol L^{-1} e logo em seguida em água para remover as moléculas em excesso fracamente adsorvidas. Em seguida, mergulhou-se o substrato com uma camada de PVS em solução contendo PAMAM-Au, obtida de

acordo com a síntese apresentada no capítulo anterior. Em seguida, retirou-se o excesso de PAMAM-Au pela imersão do substrato em água. Contempla-se, assim, a formação de uma bicamada de PVS/PAMAM-Au. Várias bicamadas foram depositadas nos substratos sólidos para diferentes estudos. Otimizou-se o tempo de deposição necessário para recobrimento da superfície utilizando CV e UV-Vis.

6.2 Tempo de Formação de PVS/PAMAM-Au em Substratos de Vidro e ITO

Para determinar o tempo necessário para a formação de uma bicamada de PVS/PAMAM-Au, geralmente mergulha-se um substrato por um determinado tempo na solução contendo o polieletrólito e em seguida determina-se a presença do material adsorvido[1-3]. Variando-se o tempo de imersão, pode-se estimar o tempo necessário para o recobrimento da superfície e, assim, otimizar a preparação das multicamadas. A figura 6.1 apresenta os espectros eletrônicos para diferentes tempos de imersão de um substrato de quartzo contendo uma monocamada de PVS (quartzo-PVS) em solução de PAMAM-Au, onde se observa um aumento da banda do plásmom em função do tempo de imersão. Com os valores do máximo de absorção em 550 nm versus tempo de imersão do substrato na solução de PAMAM-Au obteve-se um gráfico com ajuste exponencial, como mostra a figura 6.2. O perfil deste gráfico sugere que existe um tempo cuja deposição seja máxima (t_{max}), alcançada quando a superfície do substrato fica saturada de PAMAM-Au adsorvido. Após esse tempo, nenhum acréscimo significativo na quantidade de material adsorvido foi observado.

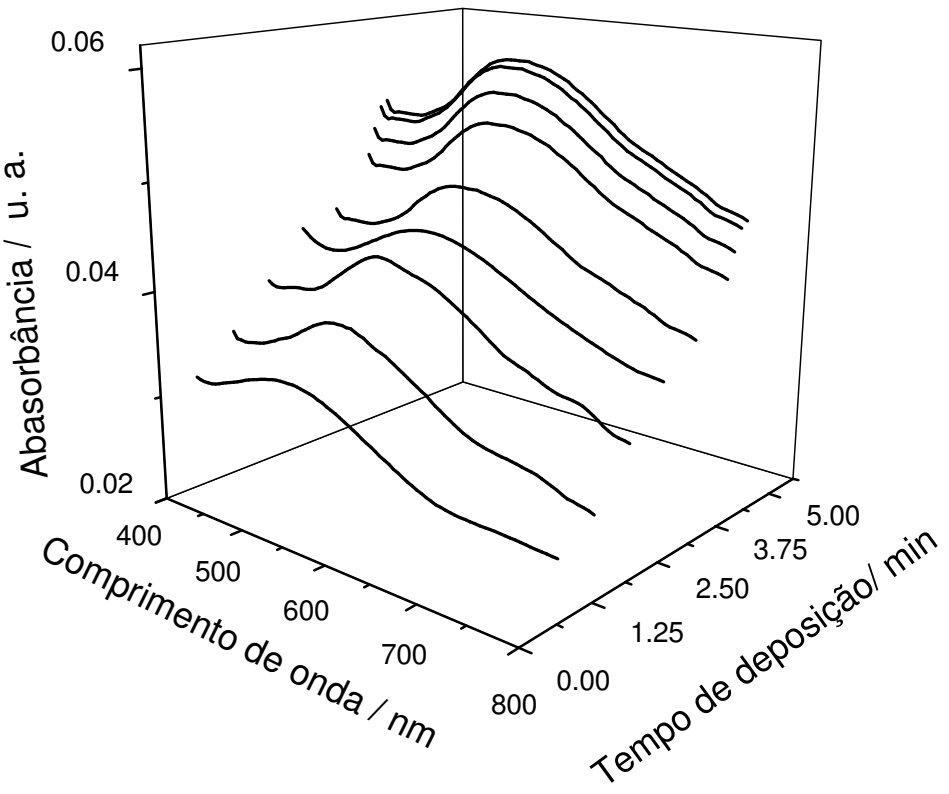


Figura 6.1 – Espectro de UV-Vis do substrato de quartzo em diferentes tempos de imersão em suspensão de PAMAM-Au.

Modelos de cinética de deposição de polieletrólitos têm sido propostos na literatura[4,5], sendo que os primeiros estudos sugeriram que nos primeiros 3 minutos a adsorção é governada por uma cinética do tipo Langmuir-Schaefer. Espera-se para esse caso que a quantidade de material adsorvido varie com $t^{1/2}$. No entanto, Raposo e colaboradores propuseram a existência de duas etapas na deposição de polieletrólitos, sendo uma difusional (etapa rápida) que ocorre nos primeiros segundos e outra estrutural, onde ocorre um rearranjo das moléculas na superfície do substrato (etapa lenta)[5]. Baseado nisso, Zucolotto[6]

cita que embora a interpretação cinética no nível molecular não seja trivial, uma analogia dos polieletrólitos com materiais metálicos pode ser empregada, em que na primeira etapa da adsorção ocorrerá basicamente nucleação, ao passo que a segunda etapa é controlada pelo crescimento dos domínios poliméricos. No caso do sistema híbrido PAMAM-Au espera-se que a primeira etapa (difusional) seja mais lenta que para os polieletrólitos convencionais (PVS, por exemplo). Aqui sugerimos que a alta massa molecular do PAMAM e a presença das nanopartículas na cavidade interna do dendrímero contribuam para um movimento lento de migração dessas espécies do seio da solução à superfície do substrato. Esse fato corrobora os resultados de UV-Vis, já que com t_{max} igual a 300 segundos de deposição observa-se que a superfície está praticamente toda recoberta com PAMAM-Au.

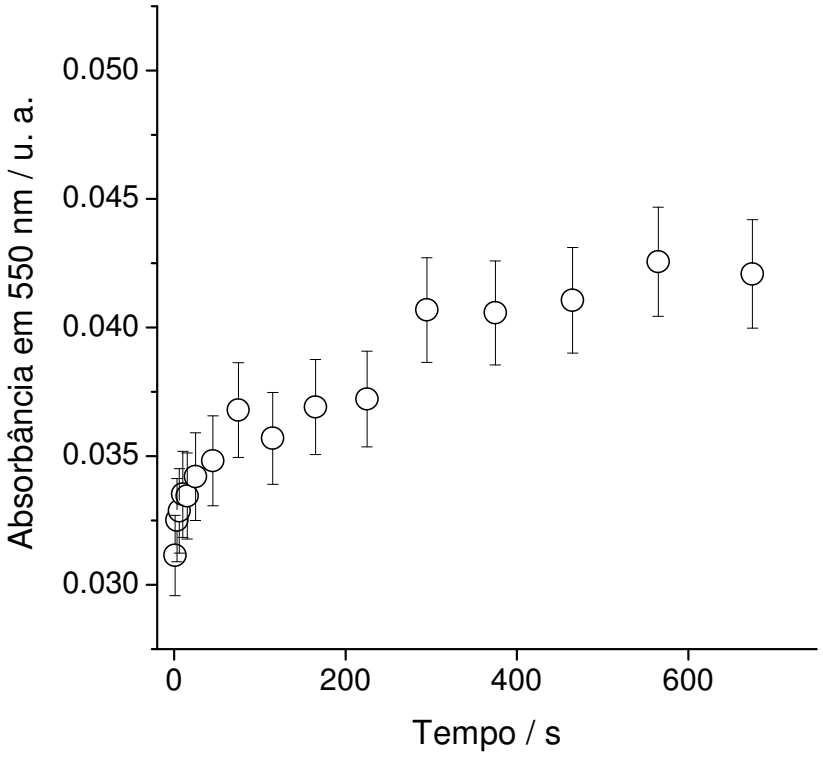


Figura 6.2 – Variação da absorbância em 550 nm com o tempo de imersão do substrato de quartzo.

Resultados similares aos de espectroscopia UV-Vis foram obtidos utilizando CV. A voltametria cíclica do filme de PVS/PAMAM-Au apresentou um pico anódico em 1,2 V (Ag/AgCl) atribuído à formação de óxidos na superfície das nanopartículas e outro pico de redução em 1,0 V atribuído à redução dos óxidos previamente formados. Esses picos são característicos de reações de superfícies de ouro policristalino[1] em meio ácido (H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}). A figura 6.3 apresenta os voltamogramas cíclicos para diferentes tempos de imersão, em que a formação de uma bicamada de PVS/PAMAM-Au é descrita basicamente por uma cinética de primeira ordem monitorando o pico anódico (ver figura 6.4) de acordo com a equação 6.1.

$$I = I_{max} [1 - \exp(-t/t_1)] \qquad 6.1$$

onde I é a corrente de pico anódica no tempo t, I_{max} é a corrente máxima obtida no tempo t_1. Ressalte-se que essa equação também vale para a corrente de pico catódica.

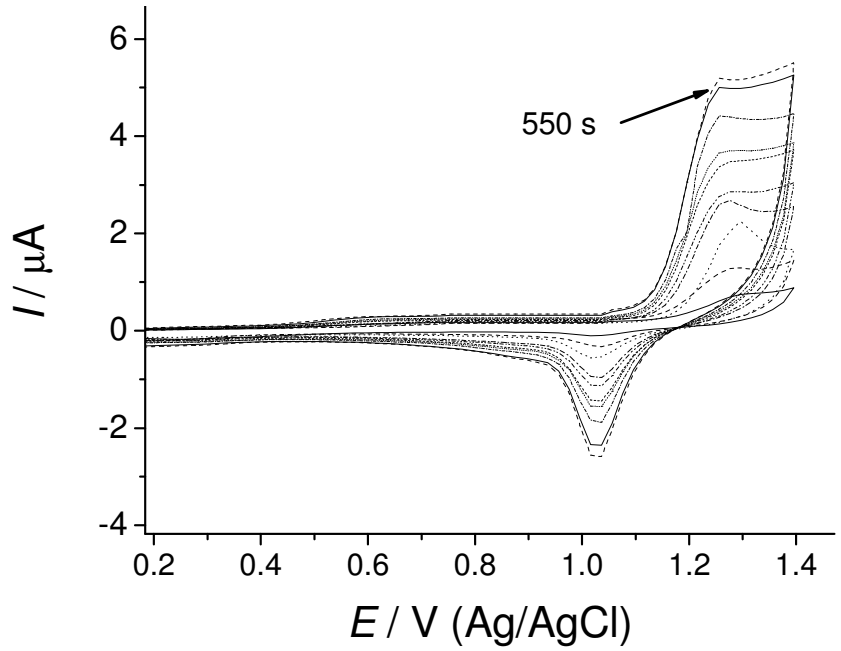


Figura 6.3 – Voltametria cíclica em diferentes tempos de imersão. Eletrólito: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}.

Aplicando-se a equação 6.1, infere-se que para 300 segundos de deposição a quantidade de PAMAM-Au depositada corresponde a 95% da corrente de pico anódica total, sendo que acima desse tempo, nenhum aumento significativo é observado. Isso é consistente com os resultados obtidos por UV-Vis.

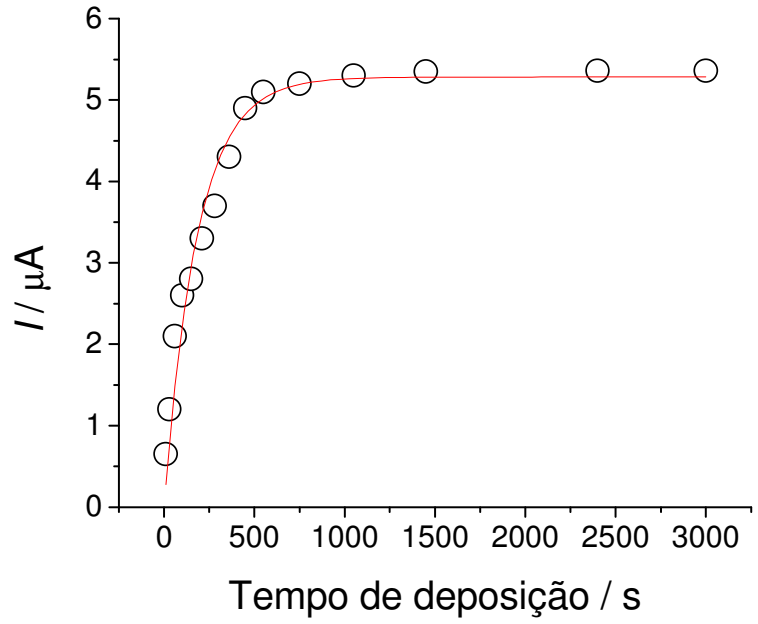


Figura 6.4 - Variação da corrente de pico anódica com o tempo de imersão do substrato de ITO-PVS na suspensão de PAMAM-Au.

6.3 Crescimento das Multicamadas de PVS/PAMAM-Au em Quartzo e ITO

Sabe-se até então que com 300 s, ou seja, com 5 minutos de deposição, as multicamadas de PVS/PAMAM-Au podem ser depositadas de modo a se obter filmes nanoestruturados. Utilizando esse tempo, camada por camada de PVS/PAMAM-Au foram preparadas e seu crescimento monitorado por UV-Vis e CV. Como mostra a figura 6.5, a absorbância aumenta linearmente com o número de bicamadas, indicando que a mesma quantidade de material foi depositada em cada etapa. Também se observa um aumento na linha de base dos espectros relacionado ao aumento no espalhamento de luz em função do número de bicamadas.

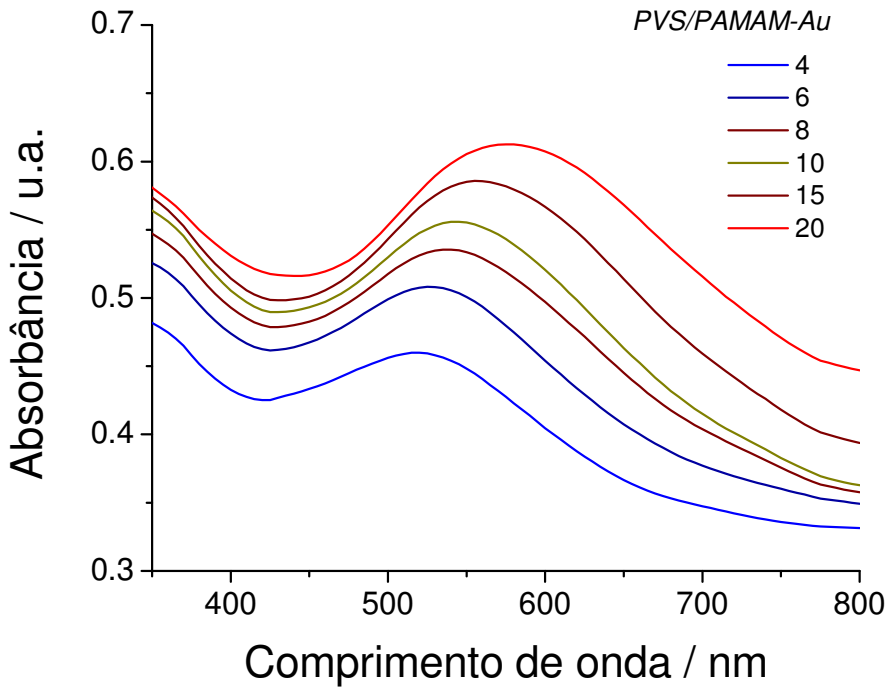
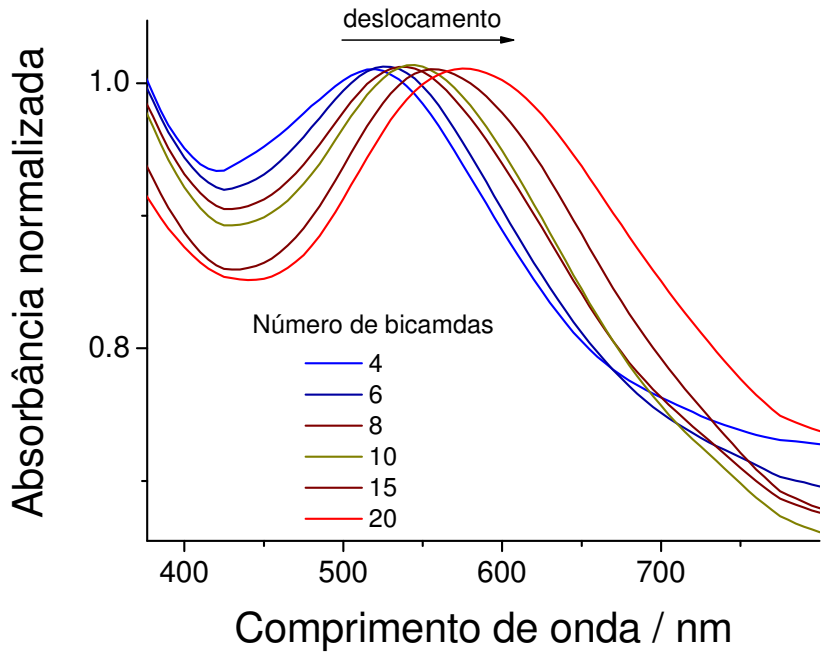


Figura 6.5 - Espectro eletrônico do substrato de quartzo contendo diferentes bicamadas de PVS/PAMAM-Au.

Um fato interessante é o deslocamento batocrômico da banda plasmônica à medida que se aumenta o número de bicamadas. Isso é mais bem evidenciado na figura 6.6, onde a absorbância foi normalizada. Uma das explicações para esse fenômeno seria atribuir um efeito de aglomeração das nanopartículas, fazendo com que as mesmas aumentem o seus diâmetros e, como previsto pela teoria de Mie (equação 5.1), quanto maior o tamanho da partícula maior será o comprimento de onda da banda de plásmom. No entanto, há evidência de que as nanopartículas estejam encapsuladas nas moléculas de PAMAM, o que evitaria aglomeração das nanopartículas[9-13]. Uma outra hipótese é a possível interação entre as camadas depositadas, levando a um efeito sinérgico assim como uma interação química entre o PVS e as nanopartículas.

a)



b)

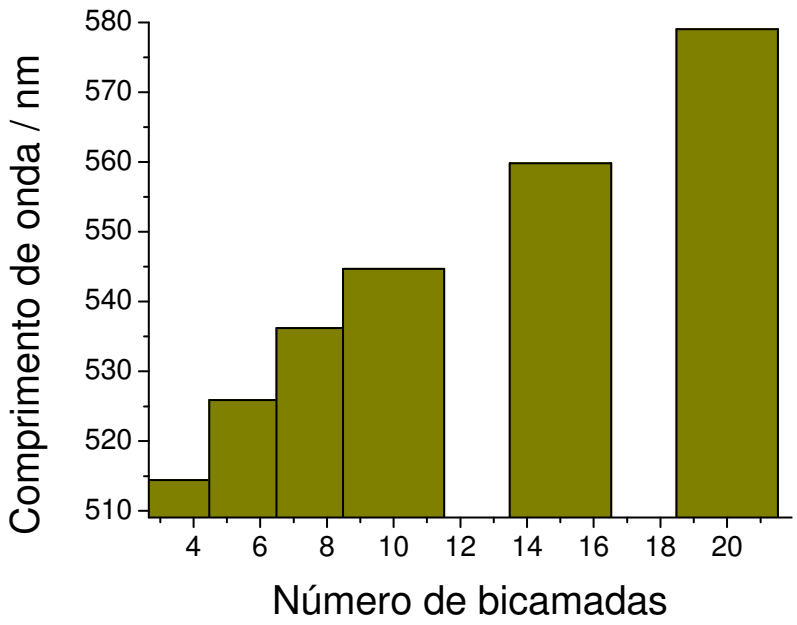


Figura 6.5 - **a)** Espectro eletrônico normalizado do substrato de quartzo contendo diferentes bicamadas de PVS/PAMAM-Au. **b)** Variação do comprimento (deslocamento batocrômico) de onda da banda plasmônica em função do número de bicamadas

Para verificar a validade dessas hipóteses, dois experimentos foram realizados, um primeiro levando em conta a distância entre as multicamadas e outro o ambiente químico. Para variar a distância entre as camadas, utilizaram-se espaçadores de PAMAM nos filmes de PVS/PAMAM-AU. Assim, a nova configuração do filme passa a ser quartzo-$(PVS/PAMAM\text{-}Au/PVS/PAMAM)_n$, onde n é o número de quadricamadas formadas. Pelos resultados da figura 6.6 o espaçamento entre as multicamadas realmente interfere no deslocamento da banda plasmônica.

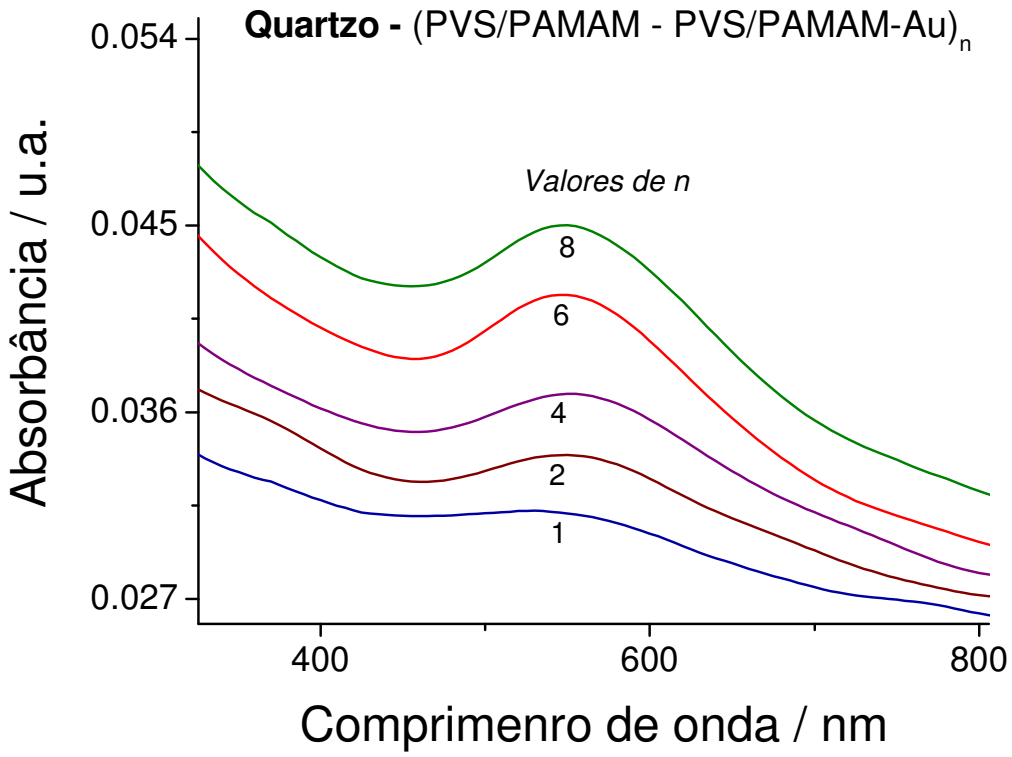


Figura 6.6 – Espectro eletrônico do substrato de quartzo contendo diferentes camadas de PVS/PAMAM -PVS/PAMAM-Au.

Outro experimento realizado para verificar se o ambiente químico interfere no espectro eletrônico foi substituir o PVS pelo ácido poliestireno

sulfonado (PSS). Como pode ser observado na figura 6.7, as bicamadas de PSS/PAMAM-Au apresentam crescimento linear, sem alteração no comprimento de onda da banda plasmônica. Utilizando o espaçador de PVS/PAMAM e substituindo o PVS pelo PSS pode-se notar que possivelmente um efeito associado à presença do PVS faz com que ocorra o deslocamento da banda plasmônica.

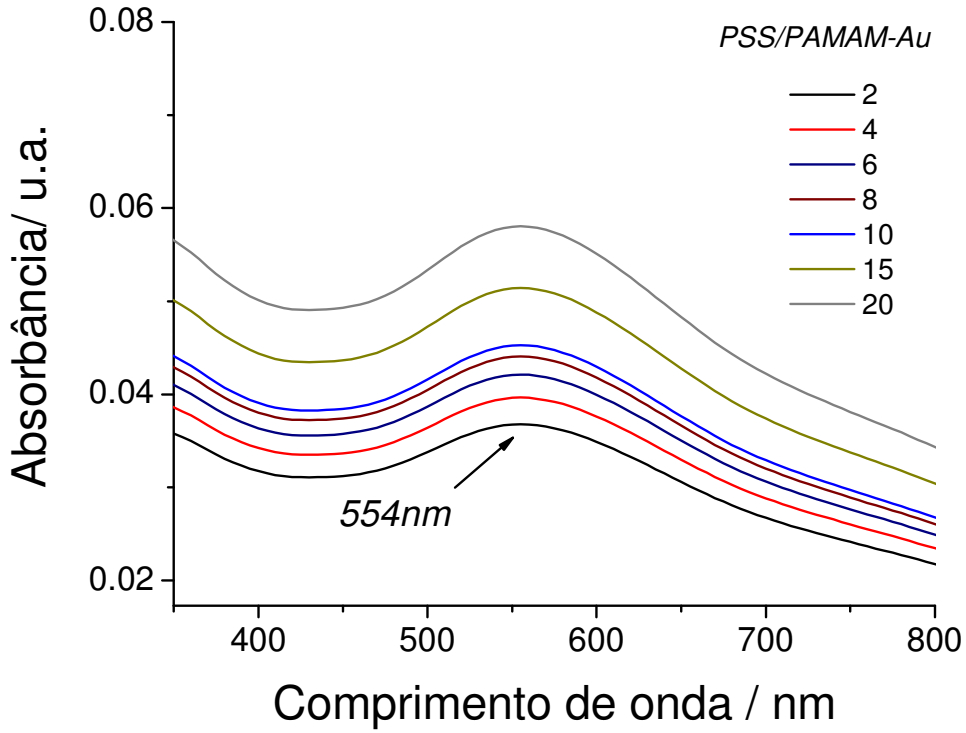


Figura 6.7 – Espectro eletrônico do substrato de quartzo contendo diferentes camadas de PSS/PAMAM-Au.

O crescimento do filme de PVS/PAMAM-Au também foi monitorado por CV (figura 6.8) utilizando um eletrodo de ITO como substrato, onde os picos catódicos e anódicos apresentaram crescimento linear com o aumento do número de bicamadas. Isso indica que a mesma quantidade de PAMAM-Au foi

depositada em cada etapa e que as nanopartículas de ouro são eletroativas nessas condições.

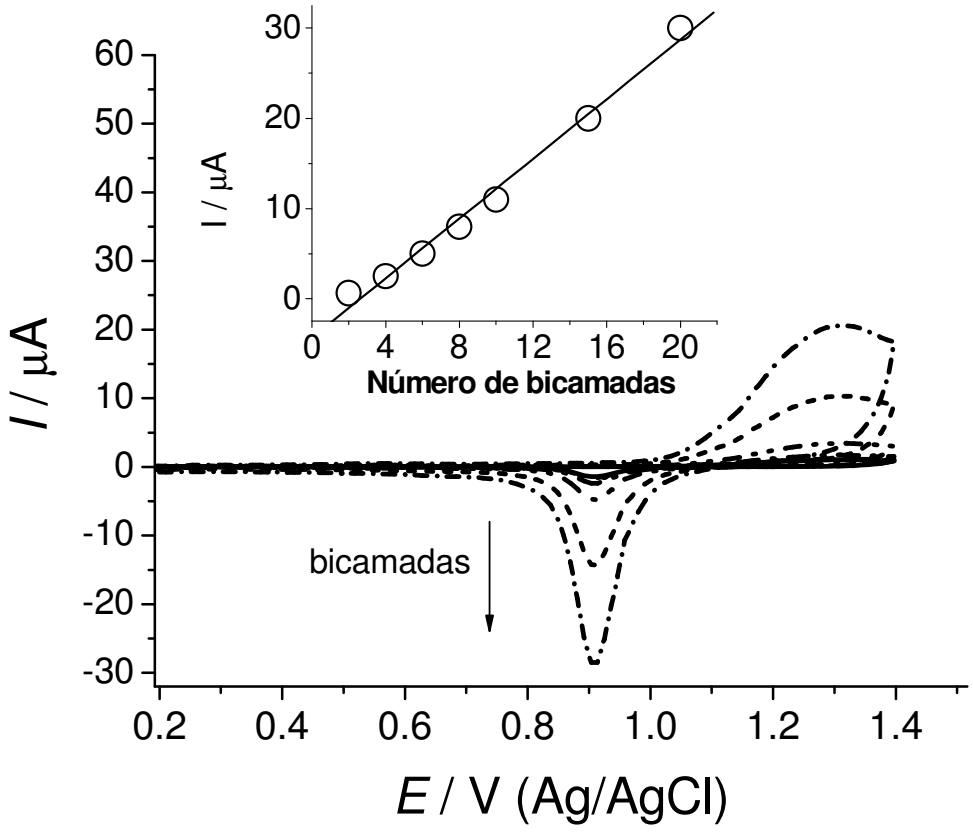


Figura 6.8 – Voltametria cíclica do eletrodo de ITO contendo diferentes números de bicamadas de PVS/PAMAM-Au. Eletrólito: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}.

Aqui, pode-se considerar o eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au) como sendo um eletrodo modificado e seu comportamento é muito semelhante aos eletrodos modificados com polímeros redox, com mecanismo de transporte de carga entre o filme e a superfície condutora do ITO consistindo de salto de elétrons (*electron hopping mechanism*)[7]. Esses resultados são consistentes com os trabalhos de Schlenoff[7], em que se demonstrou que polieletrólitos eletroquimicamente ativos podem ser incorporados em filmes automontados e

que seus respectivos sítios redox participam de reações eletroquímicas via saltos de elétrons de um sítio ao seu vizinho mais próximo.

6.4 Conclusões

Filmes automontados com PVS/PAMAM-Au foram preparados em substratos de quartzo e ITO. Os resultados revelaram que com 5 minutos de imersão é possível adsorver multicamadas de PVS/PAMAM-Au. Utilizando UV-Vis e CV, mostrou-se que o crescimento desses filmes é linear, indicando que a mesma quantidade de material é adsorvida em cada etapa. No caso do eletrodo ITO-(PVS/PAMAM-Au), saltos de elétrons foram considerados o mecanismo de transporte de carga ao longo do filme.

6.5 Referências

1. CRESPILHO, F. N.; ZUCOLOTTO, V.; BRETT, C. M. A.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; NART, F. C. Enhanced charge transport and incorporation of redox mediators in Layer-By-Layer films containing PAMAM encapsulated-gold nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, p. 17478-17483, 2006.

2. DECHER, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. **Science**, v. 277, p.1233-1237, 1997.

3. CRESPILHO, F. N.; HUGUENIN, F.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVI, P.; NART, F. C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Dendrimers as nanoreactors to produce platinum nanoparticles embedded in Layer-by-Layer films for methanol-tolerant cathodes. **Electrochemistry Communications**, v. 8, p. 348-352, 2006.

4. FERREIRA, M.; RUBNER M.F. Molecular-level processing of conjugated polymers .1. layer-by-layer manipulation of conjugated polyions. **Macromolecules,** v. 28, p. 7107-7114**,** 1995.

5. RAPOSO, M.; PONTES, R. S.; MATTOSO, L. H. C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Kinetics of adsorption of poly(o-methoxyaniline) self-assembled films. **Macromolecules,** v. 30, p. 6095-6101**,** 1997.

6. ZUCOLOTTO, Valtencir. **Compósitos Poliméricos Nanoestruturados de Azocorantes, Ftalocianinas e Polímeros Luminescentes**. 2003. 111 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos/Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

7. LAURENT, D.; SCHLENOFF, J.B. Multilayer assemblies of redox polyelectrolytes. **Langmuir,** v.13, p.1552-1557, 1997.

8. CRESPILHO, F. N.; GHICA, M. E.; FLORESCU, M.; NART, F. C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; BRETT, C. M. A. A strategy for enzyme immobilization on Layer-by-Layer dendrimer-gold nanoparticle electrocatalytic membrane incorporating redox mediator. **Electrochemistry Communications**, v. 8, p. 1665-1670, 2006.

9. CRESPILHO, F. N.; ZUCOLOTTO, V.; BRETT, C M A; OLIVEIRA JR., O. N.; NART, F. C. Enhanced charge transport and incorporation of redox mediators in Layer-By-Layer films containing PAMAM encapsulated-gold nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, p. 17478-17483, 2006.

10. CRESPILHO, F. N.; HUGUENIN, F.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVI, P.; NART, F. C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Dendrimers as nanoreactors to produce platinum nanoparticles embedded in Layer-by-Layer films for methanol-tolerant cathodes. **Electrochemistry Communications**, v. 8, p. 348-352, 2006.

11. CRESPILHO, F. N.; BORGES, T. F.; ZUCOLOTTO, V. ; LEITE, E. R.; NART, F. C; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Synthesis of core-shell Au@polypyrrole nanocomposite using a dendrimer-template approach. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, p. 2588-2590, 2006.

12. ZHAO, M. Q.; SUN, L; CROOKS, R. M. Preparation of Cu nanoclusters within dendrimer templates. **Journal of the American Chemical Society,** v. 120, p. 4877-4878, 1998.

13. ZHAO, M. Q.; CROOKS, R. M. Homogeneous hydrogenation catalysis with monodisperse, dendrimer-encapsulated Pd and Pt nanoparticles. **Angewandte Chemie-International Edition** , v. 38, p. 364-366, 1999.

CAPÍTULO VII:
TRANSPORTE DE CARGA E IMOBILIZAÇÃO DE MEDIADORES REDOX PARA FORMAÇÃO DE MEMBRANAS ELETROATIVAS NANOESTRUTURADAS (MENs)

No capítulo VI, demonstrou-se que o mecanismo de salto de elétrons entre nanopartículas de ouro deve ocorrer quando um filme de PVS/PAMAM-Au é submetido a reações eletroquímicas. Isto é importante para o desenvolvimento de eletrodos modificados, uma vez que as propriedades eletroquímicas são bem definidas ao longo do crescimento do filme. Além disso, eletrodos de ITO-(PVS/PAMAM-Au) são altamente estáveis, como será demonstrado neste capítulo. Nesta etapa do trabalho, a ênfase foi colocada no entendimento das propriedades eletroquímicas desse sistema, além da preparação das membranas eletroativas nanoestruturadas (MEN). As MENs representam grande avanço científico e tecnológico[1], pois mediadores redox podem ser imobilizados via sistema *core-shell*, com propriedades apropriadas para aplicações, como será mostrado a seguir.

7.1 Mecanismo de Transporte de Carga e Cinética em Filmes de PVS/PAMAM-Au

Quando um eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_6$ é submetido à varredura de potenciais em diferentes velocidades em uma solução eletrolítica de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}, observa-se comportamento típico de eletrodos modificados com alta estabilidade eletroquímica, como mostra a figura 7.1.

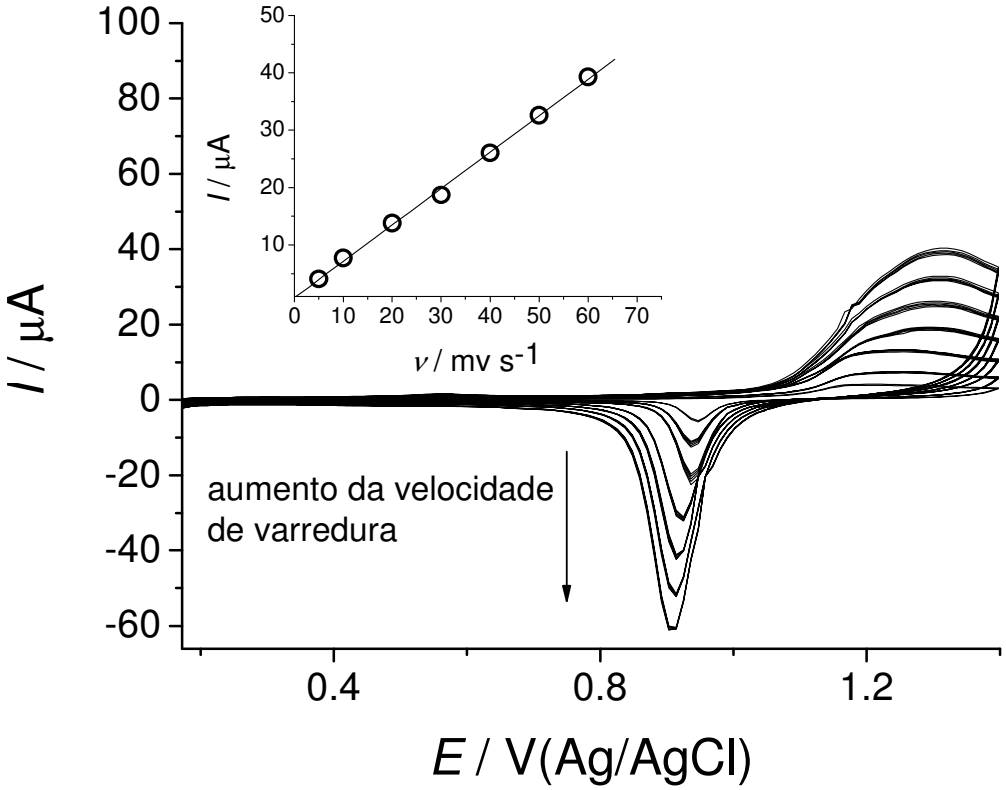


Figura 7.1 – Voltametria cíclica do eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_6$ em diferentes velocidades de varredura. No *inset*, mostra-se a corrente de pico anódica vs. velocidade de varredura. Eletrólito: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}.

Os voltamogramas obtidos em cada velocidade (20 ciclos) não apresentam decaimento de corrente, evidenciando que as nanopartículas estão fortemente imobilizadas na superfície do ITO e que os sítios eletroquímicos são acessíveis para as reações redox. Além disso, a corrente de pico anódica

aumenta linearmente com a velocidade de varredura, indicando que a reação é limitada pelo transporte de carga e não por difusão, como esperado para eletrodos com a superfície modificada[2,3].

Para verificar o comportamento eletroquímico do eletrodo de ITO-$(PVS/PAMAM\text{-}Au)_6$ frente a uma espécie eletroativa em solução, submeteu-se o mesmo a uma varredura de potencial nas condições anteriormente citadas, só que agora na presença de hexacianoferrato de potássio (K_3FeCN_6). A janela de potencial aplicada foi de 0,0 a 0,6 V, em que o par redox $FeCN_6^{3-}$/ $FeCN_6^{4-}$ possui eletroatividade bem definida, como apresentado na figura 7.2. Quando se comparam os voltamogramas obtidos com ITO e ITO-$(PVS/PAMAM\text{-}Au)_6$ observa-se que o eletrodo modificado apresenta correntes de pico anódica e catódica maiores, assim como menor corrente capacitiva residual, com um voltamograma melhor definido que para o eletrodo de ITO. Mais espécies eletroativas estão participando das reações, o que deve ser atribuído à presença das nanopartículas de ouro no filme. Ambos os voltamogramas correspondem a sistemas reversíveis[2], onde $|I_{pa} / I_{pc}| = 1$ e $\Delta E = E_{pa}\text{-}E_{pc} = 57/n$ mV.

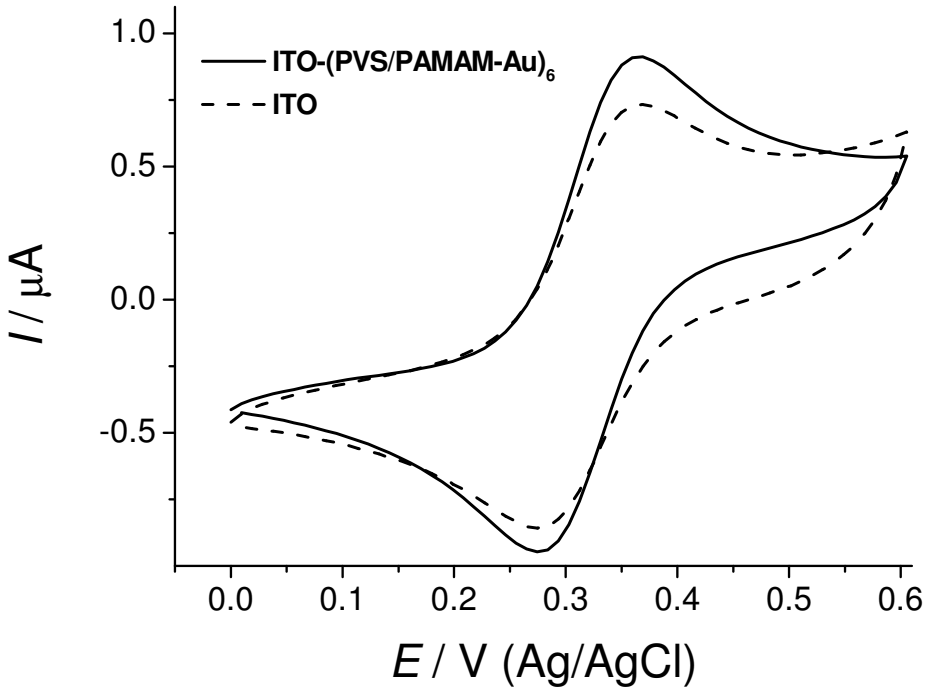


Figura 7.2 - Voltametria cíclica do eletrodo de ITO e ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_6$ em solução 5,0 mmol L^{-1} de hexacianoferrato de potássio. Eletrólito: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}.

Para averiguar se o aumento da corrente não é devido somente a um aumento de área, sem participação efetiva das nanopartículas de ouro, variou-se a velocidade de varredura (ν) para o eletrodo ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_6$. A figura 7.3 mostra correntes de pico crescendo linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, o que demonstra que as espécies de hexacianoferrato estão limitadas por difusão, como esperado para espécies eletroativas em solução[2,3].

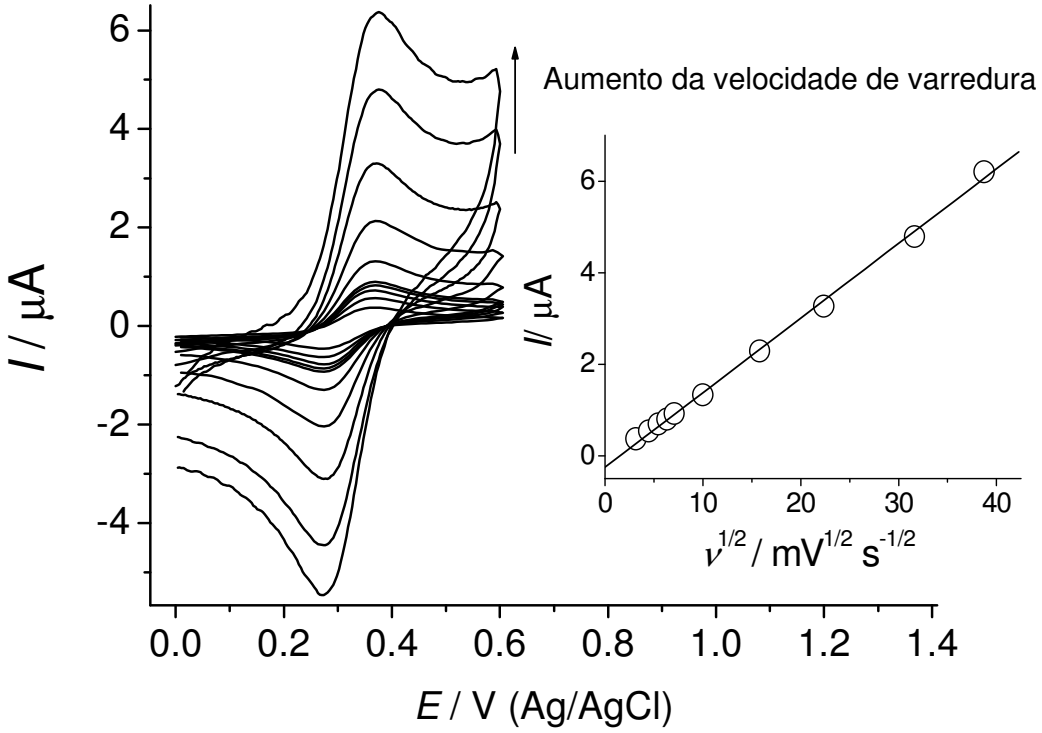


Figura 7.3 - Voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura do eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_6$ em solução 5,0 mmol L^{-1} de hexacianoferrato de potássio. Eletrólito: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}. No *inset*, tem-se a corrente de pico anódica variando linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura.

Um fato interessante é que esse sistema continua reversível a altas velocidades de varredura (1500 mV s^{-1}), indicando que as nanopartículas intensificam o transporte de carga. Ao comparar esses resultados com aqueles em eletrodo de ITO não modificado, observa-se um comportamento diferente. Neste último caso, as reações eletroquímicas do par redox $FeCN_6^{3-}$/ $FeCN_6^{4-}$ são limitadas por difusão até 200 mV s^{-1}, sendo que acima desse valor não há linearidade para o gráfico de *I* vs. $\nu^{1/2}$ (figura 7.4). Os valores de ΔE também

começam a aumentar gradualmente, indicando uma cinética lenta e perda de linearidade.

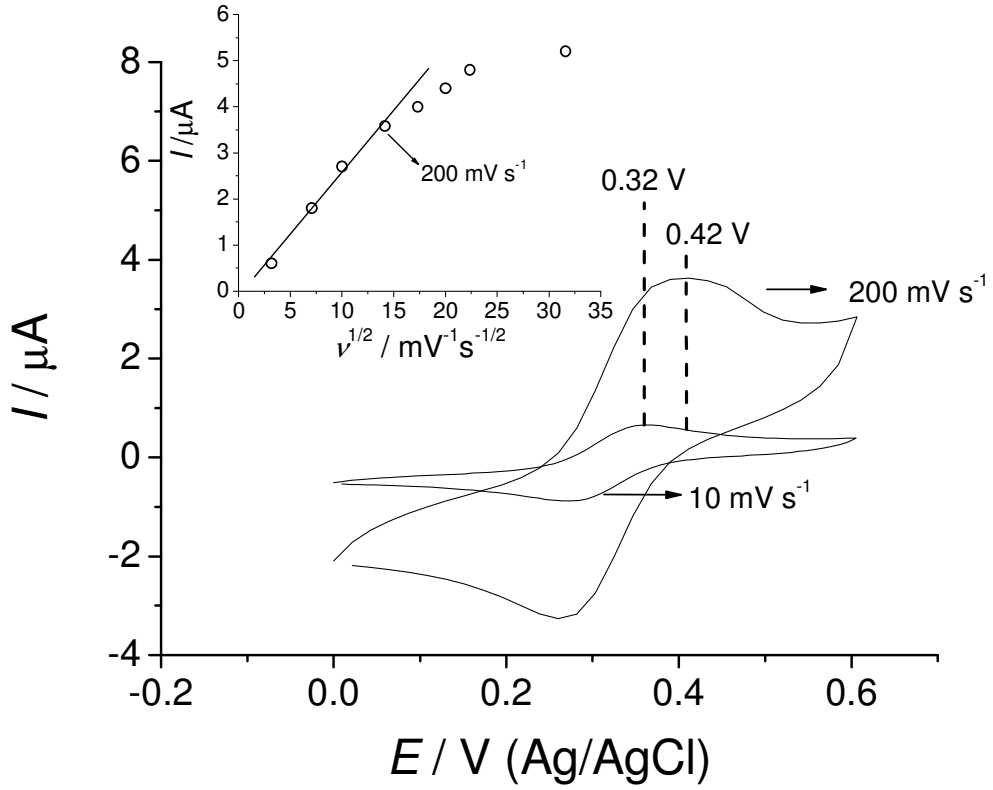


Figura 7.4 – Voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura do eletrodo de ITO em solução 5,0 mmol L^{-1} de hexacianoferrato de potássio. Eletrólito: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}. No *inset*, tem-se a variação da corrente de pico anódica com a raiz quadrada da velocidade de varredura.

A influência das nanopartículas pode ser verificada também quando se calcula o coeficiente de difusão aparente para o $FeCN_6^{4-}$, utilizando a relação de Randles-Sevcik[2]:

$$I_p = (2.687 \times 10^5)\, n^{3/2}\, \nu^{1/2}\, D_{app}{}^{1/2}\, A\, C \qquad (7.1)$$

onde I_p é a corrente de pico, n é o número de elétrons transferidos, ν é a velocidade de varredura (V s^{-1}), A é a área do eletrodo (cm^2), D_{app} é o coeficiente de difusão aparente para o $FeCN_6^{4-}$ (cm^2 s^{-1}) e C é a concentração de $FeCN_6^{4-}$ (mol cm^{-3}).

Nas mesmas condições experimentais foram obtidos os valores de D_{app} para o $FeCN_6^{4-}$ de 4.9 x 10^{-6} e 5.6 x 10^{-6} cm^2 s^{-1} para o ITO e ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_6$, respectivamente. Esses valores são indicação de que as nanopartículas realmente exercem papel fundamental na eletroquímica do par redox $FeCN_6^{3-}$/ $FeCN_6^{4-}$, o que pode abrir novos caminhos para preparação de novos materiais à base de mediadores redox, como será mostrado a seguir.

7.2 Evidência da Formação de um Sistema *Core-Shell* Nanopartículas@Mediador

Ao utilizar um eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_6$ em uma solução de hexacianoferrato de potássio nas condições citadas acima, porém ampliando a janela de potencial aplicado (0,0 a 1,2 V), pôde-se eletrodepositar o mediador azul da Prússia (*Prussian blue*) (PB). O PB é um complexo inorgânico com estrutura química $Fe_4(Fe(CN)_6)_3$, embora outros modelos estruturais têm sido mencionados na literatura (ver referência 4). O método de eletrodeposição de PB consiste em varrer o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho em vários ciclos e, ao logo do tempo, ocorre a dissociação dos íons cianeto da espécie $FeCN_6^{4-}$ e consequentemente a adsorção de PB (insolúvel) na superfície

eletródica. Este método foi introduzido por Deng[4] e colaboradores em 1998 e chamado de *electrochemical deposition of Prussian blue from a single ferricyanide solution*.

A figura 7.5 mostra os voltamogramas cíclicos correspondentes aos três estágios de formação de PB na superfície do eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_6$.

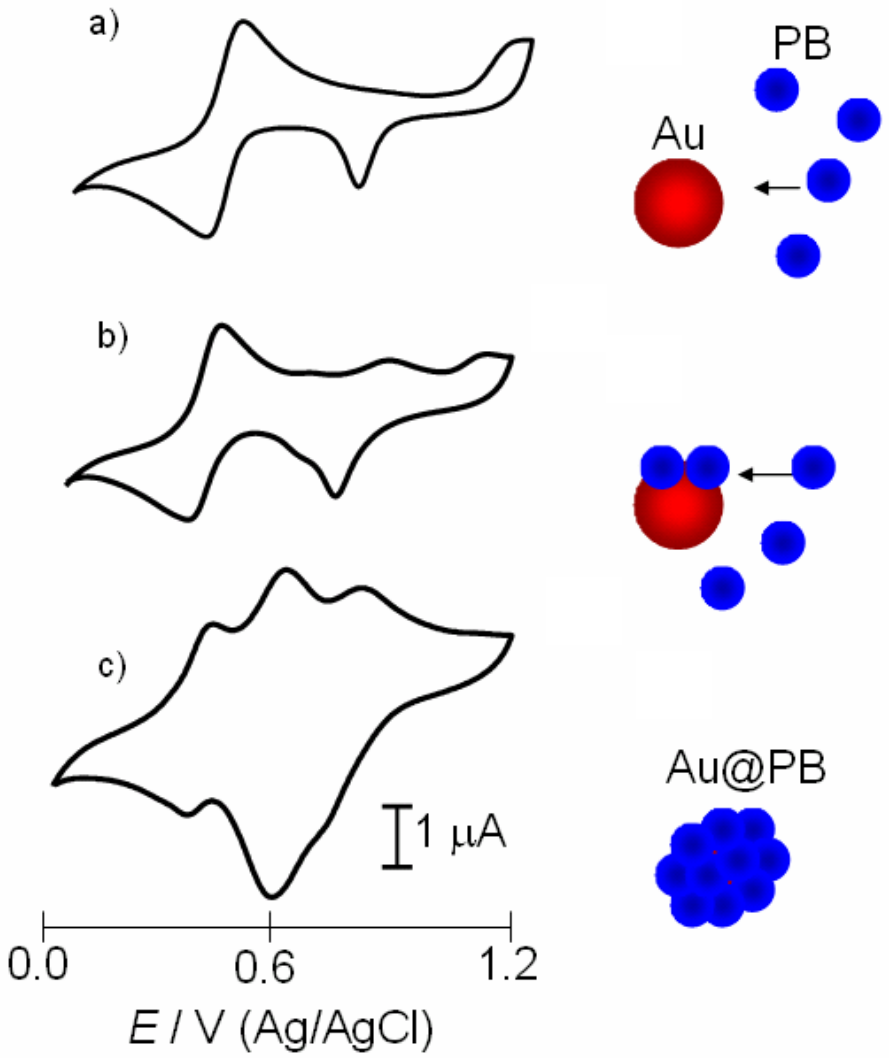


Figura 7.5 - Voltametria cíclica em diferentes estágios de formação de PB em solução 5,0 mmol L^{-1} de hexacianoferrato de potássio. Eletrólito: H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}. **a)** primeiro ciclo voltamétrico. **b)** Voltamograma cíclico obtido após 10 ciclos consecutivos. **c)** Voltamograma cíclico após o sistema ser deixado em circuito aberto durante 2 horas. Do lado direito é ilustrado o processo de formação do sistema *core-shell* Au@PB.

É sugerida a formação de um sistema ITO-PVS/PAMAM-Au@PB, ou seja, ocorre eletrodeposição de uma casca (*shell*) de PB em volta do núcleo (*core*) de nanopartícula de ouro, denominado sistema *core-shell* Au@PB.

Em um primeiro estágio durante o primeiro ciclo voltamétrico (figura 7.5a), nota-se o par redox $FeCN_6^{3-}/FeCN_6^{4-}$ assim como picos de oxidação e redução referentes às nanopartículas de ouro. Isso sugere que as superfícies das nanopartículas estão eletroatívas e o par redox $FeCN_6^{3-}/ FeCN_6^{4-}$ reage reversivelmente na superfície. Após 10 ciclos (figura 7.5b), observam-se dois novos picos em 0,6 e 0,8 V, indicando a formação de PB. Neste mesmo voltamograma, ocorre diminuição na corrente de pico de oxidação das nanopartículas, o que leva à conclusão de que a superfície das nanopartículas de ouro está parcialmente recoberta por PB e "bloqueada" para reagir e formar os óxidos de ouro. Após o décimo ciclo, o sistema foi deixado em circuito aberto durante 2 horas. Ao realizar um novo ciclo (figura 7.5c), não se observa mais o pico referente às nanopartículas de ouro e o voltamograma característico do PB é evidente. Dessa forma, conclui-se que o PB recobre as nanopartículas formando um sistema *core-shell* Au@PB.

7.3 Preparação de Membranas Eletroatívas Nanoestruturadas (MENs) Utilizando Mediadores Redox de Hexacianoferrato de Cobre, Níquel, Ferro e Cobalto

MENs foram preparadas utilizando um eletrodo de ITO-$(PVS/PAMAM\text{-}Au)_3$, ou seja, um eletrodo com apenas 3 bicamadas de PVS/PAMAM-Au. A escolha deste número de bicamadas foi motivada porque a difusão de oxigênio ocorre eficientemente até 3 bicamadas, o que precisa ser considerado na preparação de um dispositivo enzimático, como será discutido em detalhe no próximo capítulo.

O método consistiu em eletrodepositar compostos de hexacianoferrato de metais de transição (MHCF), como cobre (CuHCF), cobalto (CoHCF), níquel (NiHCF) e ferro (FeHCF) utilizando CV como técnica de varredura de potencial. Geralmente a corrente de pico é monitorada e a evolução da deposição se dá com o aumento da corrente faradaica em função do número de ciclos realizados. Os métodos de eletrodeposição de mediadores já são bem conhecidos na literatura e as metodologias pertinentes foram selecionadas para a preparação das MENs, de acordo com o esquema a seguir:

a) ***ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@FeHCF:*** submeteu-se um eletrodo de ITO-$(PVS/PAMAM\text{-}Au)_3$ a 30 ciclos potenciodinâmicos consecutivos (-0,35 a 1,1 V) em uma solução contendo $FeCl_3$ 1,0 mmol L^{-1}, $K_3Fe(CN)_6$ 1,0 mmol L^{-1}, KCl 0,1 mol L^{-1} e HCl 0,1 mmol L^{-1} (pH~1). Utilizou-se velocidade de varredura de 10 mV s^{-1}.

b) ***ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@NiHCF:*** submeteu-se um eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$ a 30 ciclos potenciodinâmicos consecutivos (-0.2 a 0,9 V) com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} em solução contendo 2,5 mmol L^{-1} de $NiCl_2$, $K_3Fe(CN)_6$ 2,5 mmol L^{-1} e KCl 0,6 mol L^{-1} a pH 2 (pH ajustado com HCl).

c) ***ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF:*** submeteu-se um eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$ a 30 ciclos potenciodinâmicos consecutivos (-0.2 a 0,9 V) com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} em solução contendo 0,5 mmol L^{-1} de $CoCl_2$, $K_3Fe(CN)_6$ 0,25 mmol L^{-1} e NaCl 0,05 mol L^{-1} a pH 3 (pH ajustado com HCl).

d) ***ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CuHCF:*** submeteu-se um eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$ a 30 ciclos potenciodinâmicos consecutivos (-0,35 a 1,1 V) em solução contendo 1,0 mmol L^{-1} de $CuCl_2$, $K_3Fe(CN)_6$ 1,0 mmol L^{-1} e KCl 0,1 mol L^{-1} a pH 3 (pH ajustado com HCl). Utilizou-se velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}.

Os resultados obtidos com as metodologias acima estão apresentados na figura 7.6.

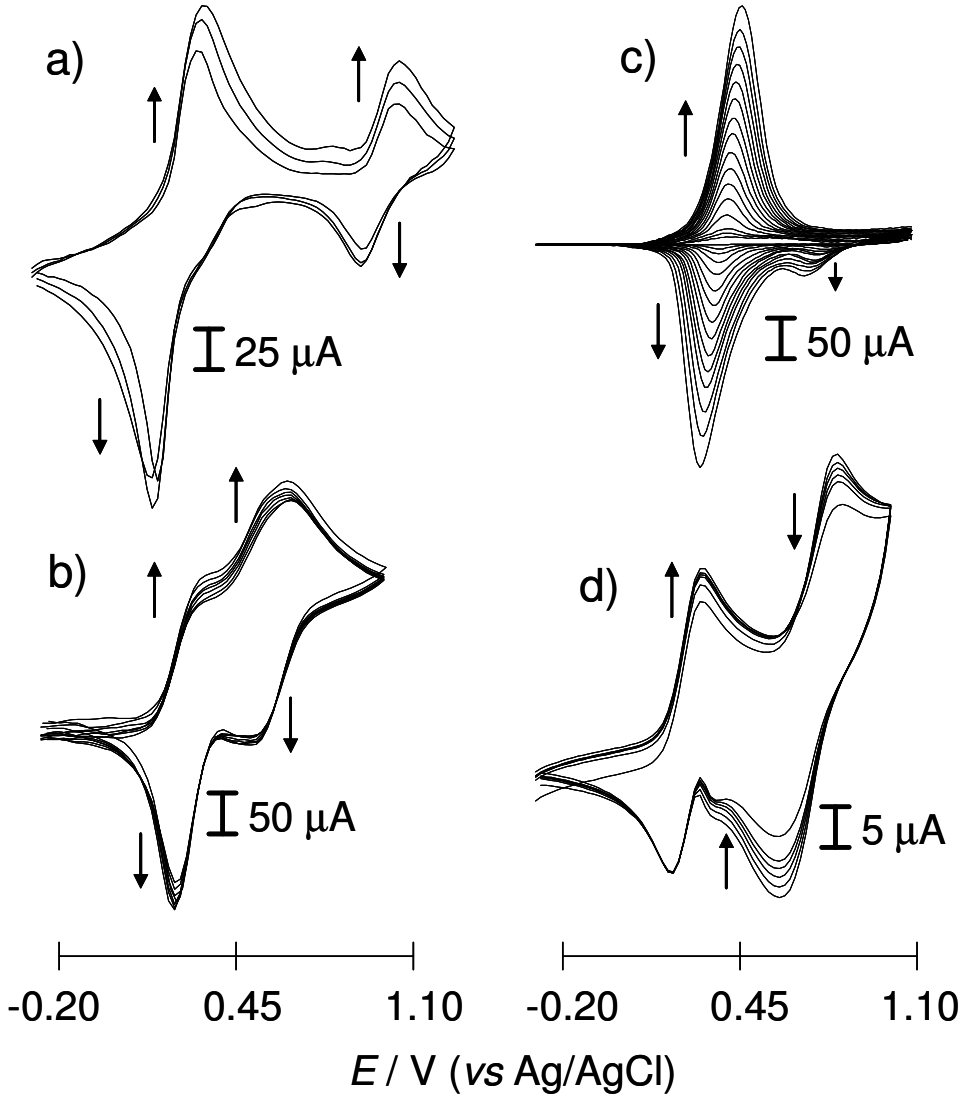


Figura 7.6 – Voltametria cíclica (eletrodeposição) dos mediadores redox usando eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$. Os mediadores eletrodepositados são: (**a)** FeHCF, (**b)** NiHCF, **(c)** CoHCF e **(d)** CuHCF.

A deposição de FeHCF (eq. 7.2 e 7.3) é rápida e as correntes de pico aumentam até o décimo ciclo, acima do qual não se observa aumento expressivo. O eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@FeHCF apresenta alta estabilidade e as correntes de pico são proporcionais à velocidade de varredura até 300 mV s^{-1} (figura 7.7a), indicando rápida propagação de carga no interior do filme.

$KFe^{3+}(Fe^{2+}(CN)_6) \leftrightarrows k^+ + e^- + Fe^{3+}(Fe^{3+}(CN)_6)$ +0,9 V (eq. 7.2)

$KFe^{3+}(Fe^{2+}(CN)_6) + k^+ + e^- \leftrightarrows K_2Fe^{2+}(Fe^{2+}(CN)_6)$ +0,2 V (eq. 7.3)

A formação do eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@NiHCF foi observada pela presença de dois picos bem definidos atribuídos às espécies de NiHCF (figura 7.6b). Observou-se crescimento lento dos picos até 30 ciclos. Resultados semelhantes encontrados na literatura sugerem que o crescimento de NiHCF é acompanhado pela inserção de íons K^+, sendo os picos mais positivos atribuídos ao sistema $K_2Ni[Fe^{2+}(CN)_6]/KNi[Fe^{3+}(CN)_6]$. Após transferir o eletrodo modificado para uma solução de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}, estudou-se a influência da velocidade de varredura nos voltamogramas cíclicos. Como pode ser observado na figura 7.7b, em baixa velocidade de varredura (e.g. 10 mV s^{-1}) distinguem-se dois pares redox. Em altas velocidades de varredura, apenas um par redox bem definido é observado, que pode ser atribuído ao par Fe^{2+}/Fe^{3+}. Ambas as correntes de pico aumentam linearmente com a velocidade de varredura, indicando nenhuma dependência difusional.

Para a eletrodeposição de CoHCF observou-se comportamento semelhante aos citados anteriormente, com um crescimento linear da corrente com o número de cíclos (figura 7.6c). Após a eletrodeposição, o eletrodo ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF foi caracterizado por sucessivos ciclos em diferentes velocidades de varredura, em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}(figura 7.7c). Um par redox foi observado e atribuído a dois processos que ocorrem simultaneamente

em potenciais muito próximos, Co^{II}/Co^{III} e $[Fe^{III}(CN)_6]^{3-}$/ $[Fe^{II}(CN)_6]^{4-}$. Esses picos aumentam linearmente com a velocidade de varredura até 300 mV s^{-1}. Os potenciais de pico se deslocam simetricamente quando se aumenta a velocidade de varredura.

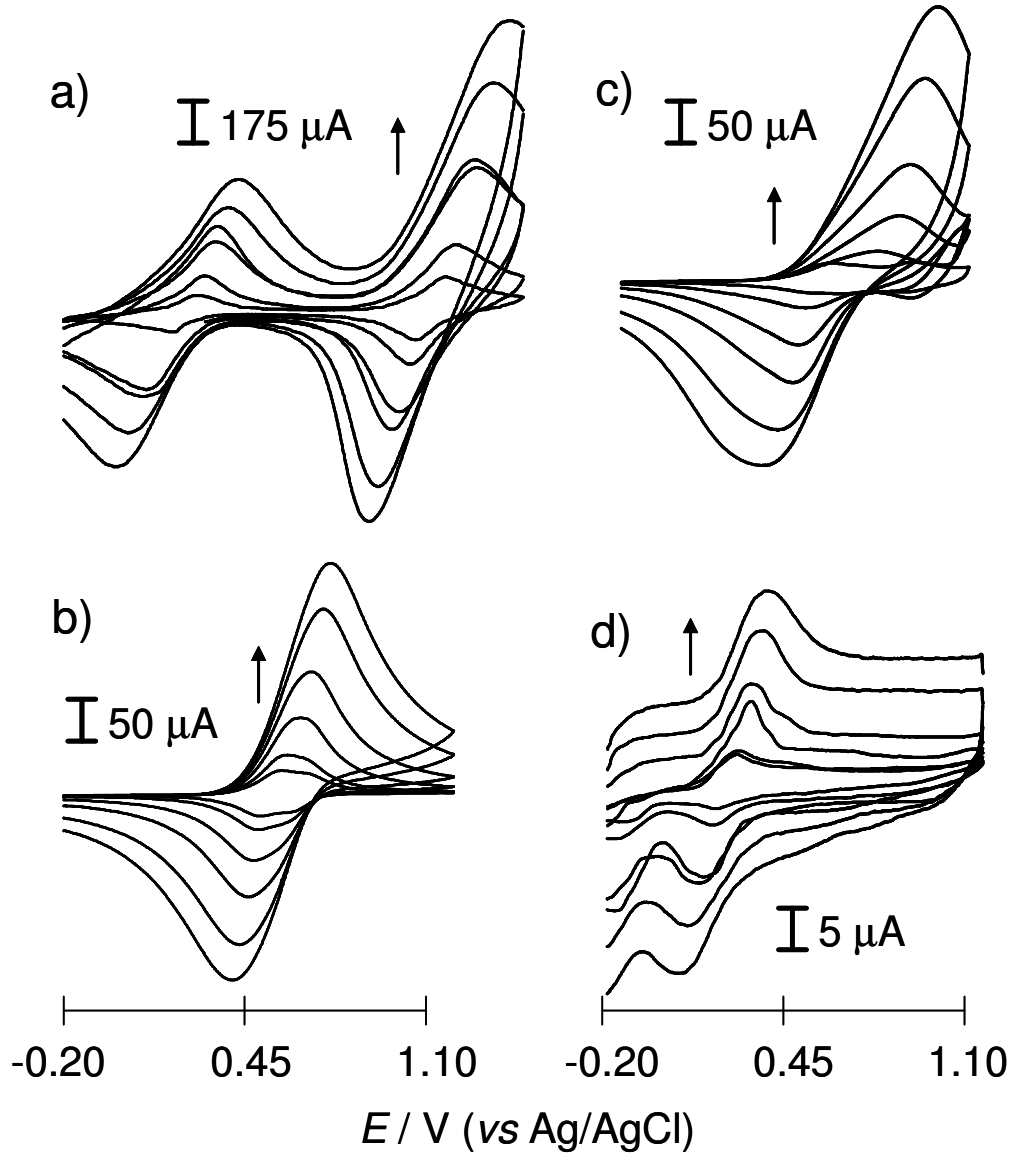


Figura 7.7 – Voltametria cíclica dos eletrodos ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@Me em tampão fosfato pH 6,7, onde Me= (**a**) FeHCF, (**b**) NiHCF, (**c**) CoHCF e (**d**) CuHCF. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}.

O último mediador depositado foi o CuHCF, para o qual as concentrações dos precursores necessárias eram menores. Durante a eletrodeposição (figura 7.6d), dois pares redox são observados, que podem ser atribuídos aos sistemas Cu^{I}/Cu^{II} e $[Fe^{II}(CN)_6]^{4-}/[Fe^{III}(CN)_6]^{3-}$. A corrente do primeiro par redox aumentou rapidamente nos primeiros 10 ciclos, sendo que um aumento não significativo ocorreu até 20 ciclos, quando a deposição cessou. Curiosamente, a corrente do segundo par redox diminuiu com o aumento dos ciclos, sendo mais efetivo do décimo ao vigésimo ciclo. Provavelmente isso se deve a um filme espesso formado nessas condições, dificultando a transferência eletrônica. Outra característica peculiar é que o segundo par redox apresentou dependência com velocidade de varredura até 50 mV s^{-1}, desaparecendo acima deste valor (figura 7.7d). Isso é indicativo de cinética lenta, demonstrando que esse filme apresenta instabilidade em altas velocidades. No entanto, o primeiro pico apresentou dependência linear até 300 mV s^{-1}, com deslocamento dos picos menor do que para o mediador CoHCF.

7.4 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) dos Eletrodos Modificados com Mediadores Redox e Estudo das suas Propriedades Catalíticas

A deposição dos mediadores redox foi bem sucedida e os filmes apresentaram comportamentos eletroquímicos diferenciados, indicando que o metal de transição do complexo inorgânico exerce papel fundamental na eletroatividade. Isso pode ser investigado em detalhe utilizando EIS e analisando as componentes de transporte e troca de carga. A figura 7.8

apresenta os espectros em que é evidente a presença de um semicírculo em altas frequências no plano complexo após cada mediador imobilizado.

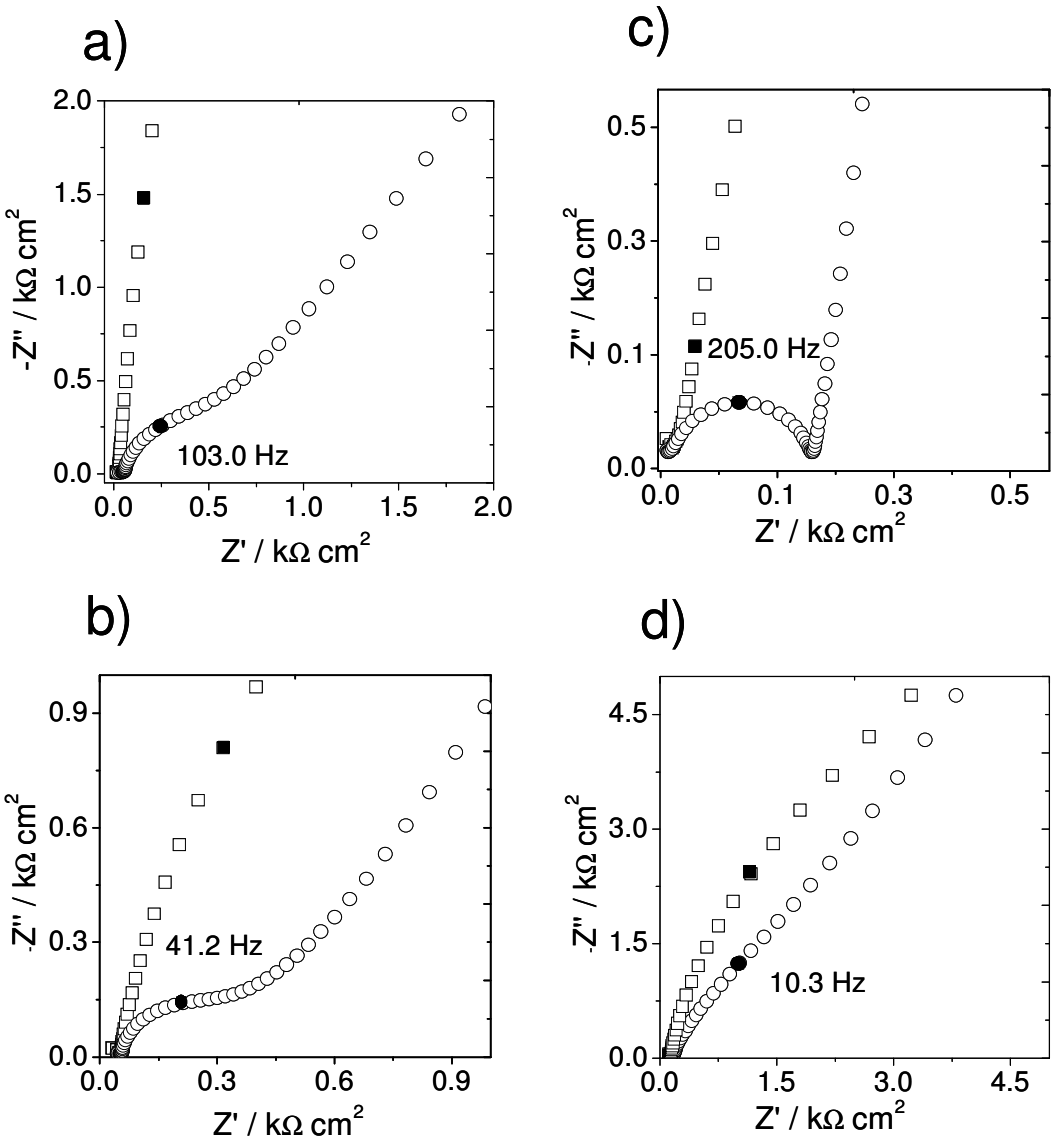


Figura 7.8 - Espectros de impedância no plano complexo para o eletrodo de ITO com 3 bicamadas de PVS/PAMAM-Au antes (-□-) e após (-○-) a eletrodeposição dos mediadores redox. (a) FeHCF, (b) NiHCF, (c) CoHCF and (d) CuHCF em potencial de circuito aberto (OCP). Variação de frequência: 65 kHz a 0.1 Hz.

Aqui, a estratégia usada para caracterizar os sistemas foi comparar os mecanismos difusionais[2,3] e de troca de carga de cada eletrodo com um

eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$ não modificado. Para isso, imergiu-se um eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$ em solução contendo percursores dos mediadores redox e registrou-se imediatamente um espectro de impedância. Após vários ciclos potenciodinâmicos um novo espectro foi obtido para o sistema ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@Me, onde Me é o mediador formado.

Os espectros foram obtidos em potencial de circuito aberto (OCP). Comparando os espectros de EIS para cada eletrodo modificado com mediador com o espectro do eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$ não modificado observa-se que o transporte de carga é mais rápido para o primeiro. Pode-se concluir que a resistência de transporte de carga decresce na sequência CuHCF > FeHCF > NiHCF > CoHCF.

As propriedades catalíticas dos hexacianoferratos eletrodepositados no eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$ estão apresentadas na figura 7.9. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 6.7) a 50 mV s^{-1} e com adição de 1,0 mmol L^{-1} e 5,0 mmol L^{-1}, tendo em vista o estudo das propriedades catalíticas a baixa e alta concentração de peróxido. Todos os eletrodos apresentaram atividade eletrocatalítica para o peróxido de hidrogênio, que dependeu do mediador. Para o NiHCF (figura 7.9b) e CuHCF (figura 7.9d), o efeito do peróxido no voltamograma cíclico foi o mesmo: após adição de 1,0 mmol L^{-1} H_2O_2 ocorreu decréscimo nas correntes de pico, provavelmente pela interação entre o peróxido e o medidor. A redução do peróxido ocorre em -0,2 V em ambos os casos, o que pode ser visto mais claramente para NiHCF com alta concentração de peróxido.

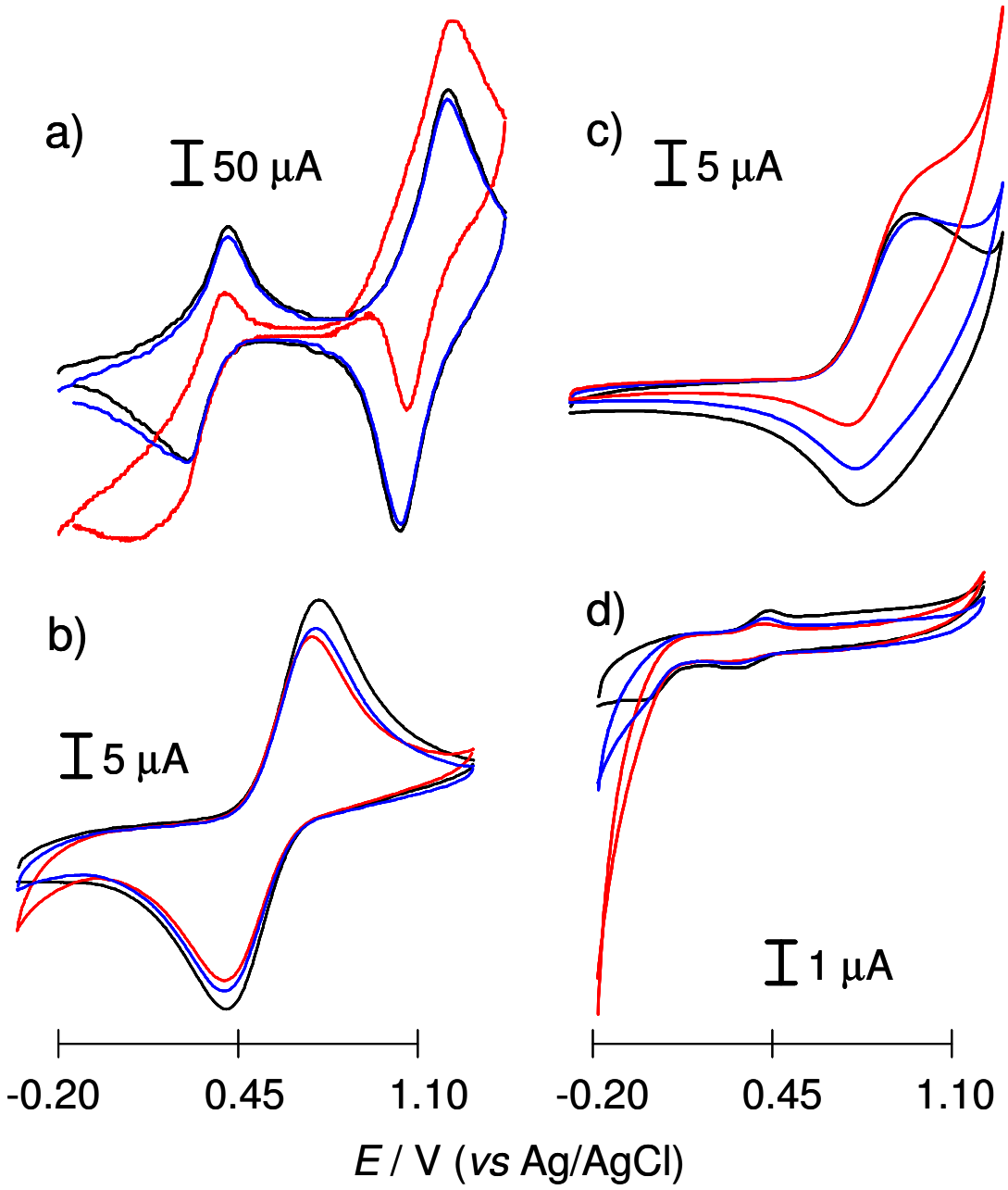


Figura 7.9 - Voltametria cíclica dos eletrodos ITO-(PVS/PAMAM-Au)3@Me em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 6,7 (linha preta) e na presença de H_2O_2 1 mmol L^{-1} (linha azul) e 5 mmol L^{-1} (linha vermelha), onde Me= (a) FeHCF, (b) NiHCF, (c) CoHCF e (d) CuHCF. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}.

Para o FeHCF (figura 7.9a), as correntes de pico aumentam apenas quando alta concentração de peróxido é adicionada e a redução do peróxido pode ser visualizada por volta de +0,1 V. Da mesma forma, para o CoHCF (figura 7.9c) o efeito catalítico ocorre com alta concentração de peróxido, com aumento na corrente de pico perceptível em +0,7 V. Em baixa concentração de peróxido, as correntes de pico diminuem, o que revela a interação entre mediador e o peróxido de hidrogênio.

7.4 Conclusões

As nanopartículas de ouro no eletrodo ITO-(PVS/PAMAM-Au) intensificam o processo de troca de carga, fazendo com que esse sistema seja promissor para estudos eletroquímicos. Por meio de eletrodeposição, um novo sistema core-shell Au@PB foi preparado, formando um sistema ITO-(PVS/PAMAM-Au)6@PB. O controle na deposição de PB pode ser obtido monitorando-se as correntes do processo faradaico durante os ciclos potenciodinâmicos. Utilizando uma metodologia similar, outros mediadores de hexacianoferratos de metais de transição (Fe, Ni, Co e Cu) foram obtidos sobre eletrodos de ITO-(PVS/PAMAM-Au). Por meio da EIS, verificou-se que a resistência de transporte de carga decresce na sequência CuHCF > FeHCF > NiHCF > CoHCF. Os eletrodos modificados apresentaram atividade catalítica para o peróxido de hidrogênio, o que pode ser aplicado em dispositivos enzimáticos de glicose oxidase, como será mostrado no próximo capítulo.

7.5 Referências

1. CESPILHO, F.N.; ZUCOLOTTO, V.; BRETT, C. M. A.; OLIVEIRA JUNIOR, O.N. **Dispositivos elétricos e eletroquímicos com membranas nanoestruturadas de dendrímeros, polieletrólitos e nanopartículas metálicas utilizando o processo de automontagem e deposição eletroquímica de mediadores redox,** jan. 2007.Pedido de patente em andamento junto ao GADI-USP.

2. BRETT, C. M. A; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry:** principles, methods and applications**.** Oxford: Oxford University Press, 1993 p.

3. BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods**: fundamentals and applications**.** New York: Wiley, 1980 p.

4. CRESPILHO, F. N.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA JR., O. N. Electroactive Nanostructured Membranes (ENM): Synthesis and electrochemical properties of redox mediator-modified gold nanoparticles using a dendrimer Layer-by-Layer approach. **Electroanalysis**, 2007. Special edition. In press.

CAPÍTULO VIII:
Imobilização Enzimática em MENs: Estudo de Biocatálise e Preparação de Biossensores

Neste último capítulo de resultados e discussões abordar-se-á a aplicação das MENs em estudos catalíticos enzimáticos, em que a presença de uma enzima em conjunção com multicamadas contendo mediadores redox foi estudada. Optou-se por utilizar um eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@HCFCo, pois resultados promissores utilizando HCFCo como mediador têm sido publicados. Vale a pena resumir aqui as etapas que antecederam este capítulo: primeiramente realizou-se a síntese e caracterização de PAMAM-Au e sua incorporação em filmes automontados com o polieletrólito PVS. Em seguida, as multicamadas de PVS/PAMAM-Au foram estudadas, mostrando ser possível preparar eletrodos de ITO-(PVS/PAMAM-Au)3@HCFCo com atividade catalítica e eletroatividade bem definida. Em seguida, submeteu-se o eletrodo à incorporação de uma enzima, cuja escolha recaiu sobre a glicose oxidase que já tem suas propriedades bem caracterizadas.

8.1 Imobilização Enzimática

A glicose oxidase (GOx) catalisa reações de transformação de glicose em ácido glucônico. Uma unidade monomérica de GOx é esferóide e compacta, com as seguintes dimensões: 60Å x 52 Å x 37 Å. O sítio catalítico responsável pelas reações de oxidação é denominado FAD (flavina adenina dinucleotídio), também chamado de cofator enzimático. Para o processo catalítico, a enzima utiliza em princípio o oxigênio molecular como aceitador de elétrons, gerando como subproduto peróxido de hidrogênio. Uma maneira indireta de verificar o comportamento enzimático é determinar a quantidade de subproduto formado[1-3]. De fato, há inúmeras publicações com métodos para a determinação de glicose utilizando detecção de peróxido de hidrogênio, sendo os métodos eletroquímicos os mais citados[4,5,6]. Um exemplo é o biossensor comercial para diabéticos, que contém um material condutor recoberto por um mediador de elétrons e GOx. A presença do mediador é fundamental para a oxidação de glicose a baixos potenciais[6], minimizando o efeito de interferentes das amostras naturais.

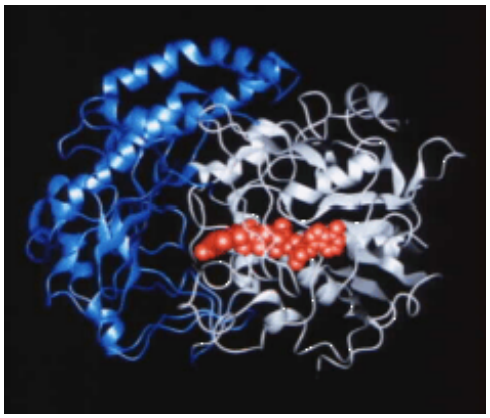


Figura 8.1 – Modelo estrutural do monômero de GOx . Em vermelho, mostra-se o cofator FAD[2].

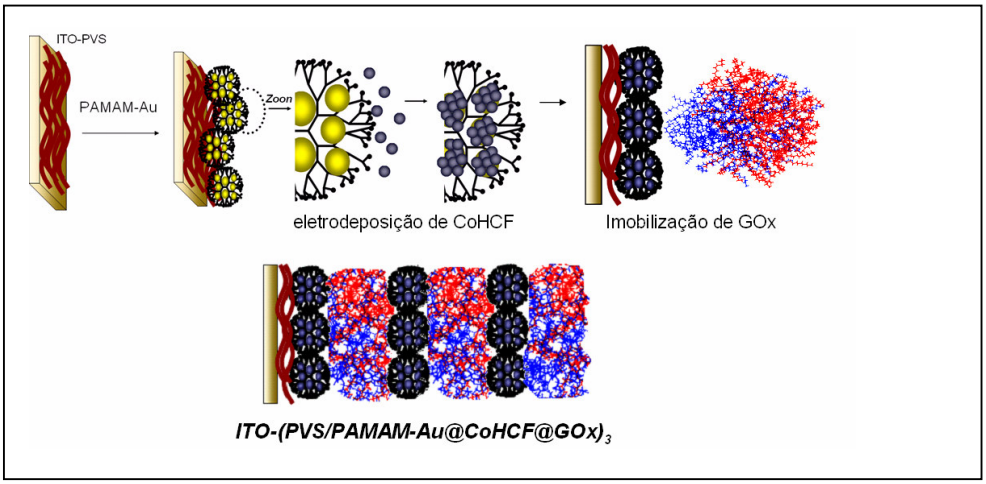
O objetivo principal desta etapa do trabalho é verificar se há biocompatibilidade entre as MENs estudadas no capítulo anterior e o sistema enzimático. Para isso, selecionou-se o eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@HCFCo para estudos eletroquímicos. A configuração de um dispositivo enzimático, para biossensores ou outra aplicação, é importante porque a enzima perde atividade quando imobilizada no estado sólido na superfície de um substrato condutor. Para averiguar isso, três métodos distintos foram utilizados para a imobilização de GOx, ilustrados na figura 8.2, correspondendo às seguintes estratégias:

a) ***ITO-(PVS/PAMAM-Au@CoHCF@GOx)$_3$:*** nesta configuração, primeiramente se deposita uma camada de PVS/PAMAM-Au@CoHF e depois se realiza a imobilização enzimática para formar uma camada de PVS/PAMAM-Au@CoHCF@GOx. Repete-se por 3 vezes este procedimento.

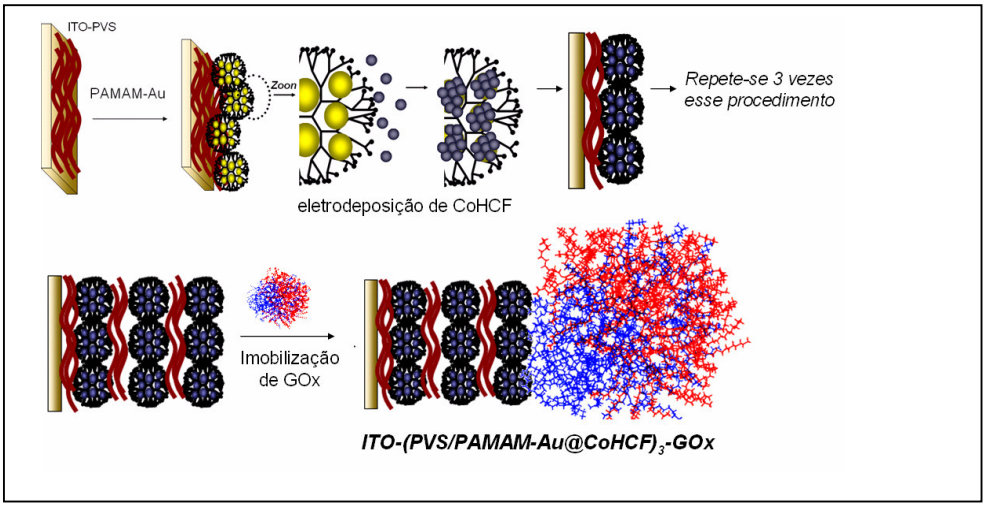
b) ***ITO-(PVS/PAMAM-Au@CoHCF)$_3$-GOx:*** esta estratégia é semelhante à anterior, com a diferença que apenas uma camada de GOx é depositada no final da preparação das 3 bicamadas de PVS/PAMAM-Au@CoHF.

c) ***ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx:*** nesta configuração, 3 bicamadas de PVS/PAMAM-Au são depositadas consecutivamente e em seguida o mediador redox é eletrodepositado e uma camada de enzima é posteriormente imobilizada.

a) ITO-(PVS/PAMAM-Au@CoHCF@GOx)$_3$



b) ITO-(PVS/PAMAM-Au@CoHCF)$_3$-GOx



c) ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx

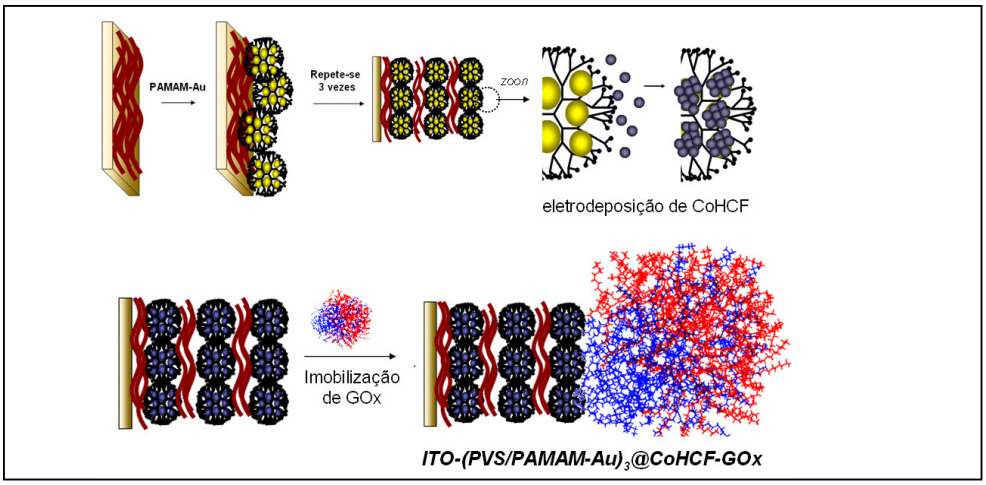


Figura 8.2 – Esquema das estratégias utilizadas para imobilização de GOx

As estratégias utilizadas buscaram alcançar os seguintes objetivos: preparar uma membrana eletroativa com alta capacidade de permeação de peróxido de hidrogênio; utilizar um mediador redox eficiente para detectar peróxido de hidrogênio em baixos potencias (0,0 V vs Ag/AgCl, por exemplo) e criar ambiente amigável para que a enzima GOx possa catalisar a reação de oxidação de glicose com alta eficiência.

Em recente trabalho publicado pelo nosso Grupo[7], mostrou-se que a permeação de oxigênio ocorre eficientemente até 3 bicamadas de PVS/PAMAM-Au, razão pela qual no capítulo anterior tenha sido usado um eletrodo ITO-$(PVS/PAMAM\text{-}Au)_3$. Como no estudo de imobilização enzimática também investigou-se a presença da GOx dentro das multicamadas (estratégia (a)), apenas 3 camadas de PVS/PAMAM-Au foram utilizadas, de modo a eliminar qualquer incerteza sobre a impermeabilidade à passagem de oxigênio molecular por essas camadas. Outro fator importante a ser ressaltado é que em todos os casos utilizou-se o mesmo procedimento para adsorver a enzima.

Para a imobilização de GOx utilizou-se a metodologia de entrecruzamento (*cross-linking*) com glutaraldeído (GA) na presença de albumina de soro bovino (BSA)[8]. GA é um agente bifuncional de entrecruzamento, que reage com resíduos de lisina no exterior das proteínas (figura 8.3). A idéia de utilizar esse método é estabelecer uma ligação entre as aminas terminais do PAMAM e a mistura BSA/GOx, fazendo com que a enzima fique fortemente estabilizada na superfície do eletrodo.

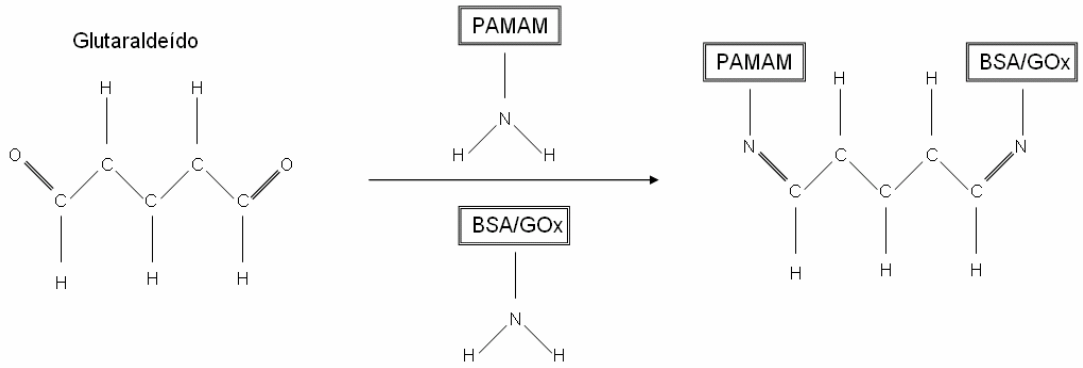


Figura 8.3 – Entrecruzamento entre PAMAM e BSA/GOx utilizando glutaraldeído

A adição de BSA acelera o processo de entrecruzamento por conter grupos lisina em sua estrutura, propiciando maior eficiência e atividade catalítica para a enzima, se comparado com o procedimento de entrecruzamento direto na GOx. Com BSA a enzima mantém seus sítios catalíticos mais acessíveis a reações redox, uma vez que o entrecruzamento não afeta drasticamente esses sítios e a enzima permanece em ambiente favorável.

A GOx foi imobilizada imergindo o eletrodo por 2 horas em uma solução contendo 240 μL de solução estoque de GOx (E.C. 1.1.3.4, *Aspergillus niger*) e 100 μL de GA (2.5% v/v). A solução estoque de GOx foi preparada adicionando 20 mg de BSA e 50 mg de GOx em 1,0 mL de 0,1 mol L^{-1} de tampão fosfato (pH 7.0). Após a imobilização, secou-se cuidadosamente o eletrodo à temperatura de 25 ºC. Quando necessário, armazenava-se o eletrodo em tampão fosfato a 4 ºC.

8.2 Propriedades Biocatalíticas dos Eletrodos Modificados

Primeiramente, verificou-se a presença de CoHCF no eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au@CoHCF)$_3$. Durante a eletrodeposição do mediador, acompanhou-se a evolução dos ciclos voltamétricos, como mostra a figura 8.4. As condições experimentais utilizadas foram as descritas no item 7.3 do capítulo 7. Diferentemente da eletrodeposição de um eletrodo ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF (ver figura 7.6c, capítulo VIII), o eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au@CoHCF)$_3$ apresenta os 3 estágios de eletrodeposição bem visíveis nos voltamogramas, o que revela presença das multicamadas de PVS/PAMAM-Au na superfície do eletrodo.

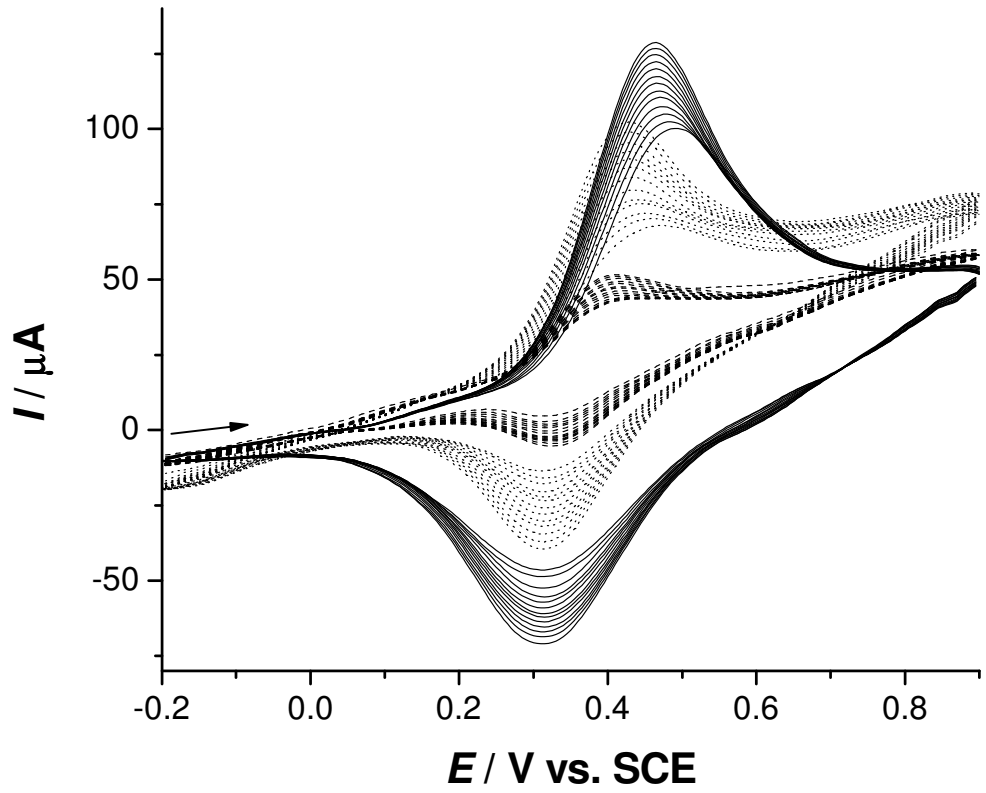


Figura 8.4 – Eletrodeposição do mediador redox CoHFC em três etapas diferentes (10 ciclos por etapa) para formar um eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au@CoHCF)$_3$.

Observou-se também que os voltamogramas estão inclinados relativamente ao eixo do potencial, o que indica resistividade do filme (queda ôhmica) ao logo da deposição. Os potenciais de pico deslocam-se de um estágio de deposição para outro, tornando-se quase-reversíveis. Isso é indicativo de que o transporte de carga ao longo do filme está sendo dificultado pela configuração do eletrodo. Esse mesmo efeito é observado para o eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au@CoHCF@GOx)$_3$, com a agravante de que a enzima torna o eletrodo ainda mais resistivo, dificultando o transporte de carga entre as multicamadas contendo PAMAM-Au@CoHCF. Esses fatores contribuem para que os eletrodos operem fora dos parâmetros de reversibilidade eletroquímica, levando à baixa eficiência na eletrocatálise do peróxido de hidrogênio. Em outras palavras, mesmo que a enzima imobilizada possua alta atividade na conversão de glicose em ácido glucônico, o peróxido de hidrogênio formado como subproduto não participará eficientemente das reações eletroquímicas. Isso pode ser observado quando se compara o efeito da adição de glicose em solução tampão fosfato (pH 7,0) na presença dos eletrodos preparados pelas diferentes estratégias, como mostra a figura 8.5.

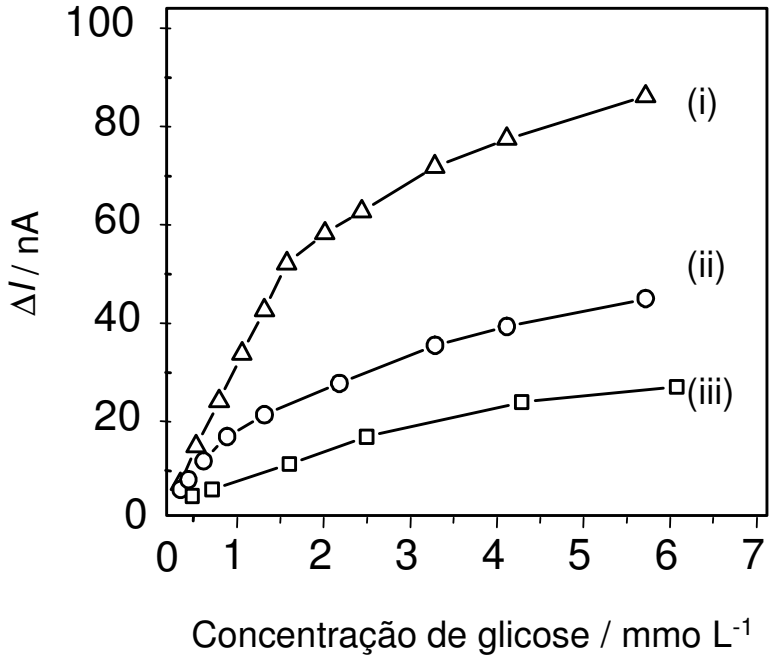


Figura 8.5 – Efeito da adição de diferentes concentrações de glicose na corrente obtida por cronoamperometria utilizando como eletrodo de trabalho ITO-$(PVS/PAMAM\text{-}Au)_3$@CoHCF-GOx (i), ITO-$(PVS/PAMAM\text{-}Au@CoHCF)_3$-Gox (ii) e ITO-$(PVS/PAMAM\text{-}Au@CoHCF@Gox)_3$ (iii). Eletrólito: solução tampão fosfato (pH 7,0) Potencial aplicado: 0,0 V (Ag/AgCl).

Observa-se claramente que as curvas i, ii e iii possuem comportamento do tipo Michaelis-Menten[1-3], ou seja, características típicas de sistemas enzimáticos com o efeito da concentração de glicose na taxa de uma reação catalisada. Em concentrações de glicose muito baixas, a velocidade inicial de reação é quase proporcional à concentração de glicose e a reação é de primeira ordem. Entretanto, à medida que a concentração de glicose aumenta, a taxa inicial passa a crescer menos, não sendo mais proporcional à concentração de glicose. Nessa região, as ordens das reações estão misturadas. Com o posterior aumento na concentração de glicose, a taxa de reação torna-se essencialmente independente da concentração do substrato e aproxima-se assintoticamente a uma taxa constante. Nesses valores de concentrações de glicose a reação é de

ordem zero e a enzima é tida como saturada de glicose. A saturação estabelece a hipótese de que GOx e a glicose reagem reversivelmente para formar um complexo (GOx-glicose), passo essencial na catálise da reação.

Fica evidente que o melhor comportamento eletroquímico na redução de peróxido de hidrogênio é utilizando a enzima como última camada (curvas i e ii) e que a melhor curva é dada pelo eletrodo de configuração ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx. Baseado nisso, um esquema das reações envolvidas e considerando a arquitetura do eletrodo ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx é proposto na figura 8.6. Esta configuração foi utilizada nos experimentos descritos a seguir.

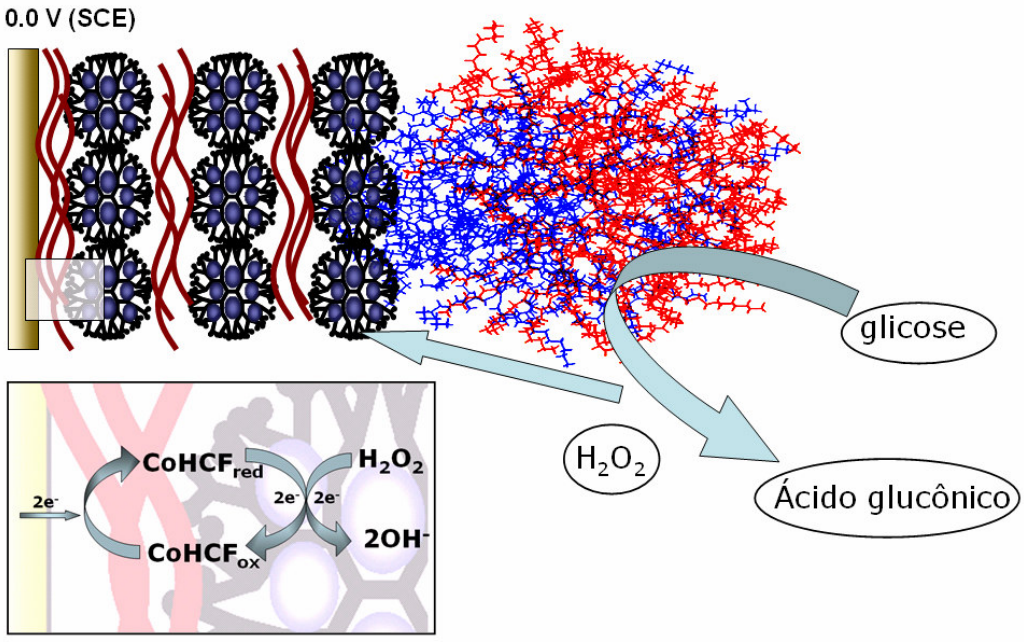


Figura 8.6 – Modelo esquemático para as reações de oxidação de glicose no eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx

8.3 Propriedades Biocatalíticas do Eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx

Para o eletrodo ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx, calculou-se a constante aparente de Michaelis-Menten (K_M^{app}) com base na curva i da figura 8.5. Essa constante é um parâmetro importante, que fornece informação sobre a cinética enzimática[1-3,9,10]. Para isso, considerou-se a seguinte reação na superfície do eletrodo:

GOx + glicose $\rightarrow$ GOx—glicose K_1

GOx—glicose $\rightarrow$ GOx + ácido glucônico + H_2O_2 K_2

Note que a presença de oxigênio está implícita. Segundo a equação de Michaelis-Menten, a cinética enzimática da reação acima pode ser descrita em princípio por:

$$V = K_2[GOx][glicose]/K_m + [glicose] \quad \text{(eq. 8.1)}$$

Para a construção dos eletrodos é desejável obter o mais baixo valor de K_m e V mais elevado. Em outras palavras, quanto menor K_m, maior a atividade catalítica.

Por meio de uma relação recíproca, a equação inicialmente descrita por Lineweaver-Burk[9,10] relaciona os valores de correntes obtidos a partir do gráfico *I vs* concentração de glicose (figura 8.5) dado por:

$$1/I_{ss} = 1/I_{max} + K_M^{app} / I_{max}\, c \qquad \text{(eq. 8.2)}$$

onde I_{ss} é a corrente de estado estacionário após a adição de glicose, I_{max} é a corrente máxima obtida após a saturação da curva e *c* é a concentração de glicose da solução.

Utilizando a equação 8.2 obteve-se K_M^{app} = 2,03 mmol L^{-1}. Esse valor de K_M^{app} para o eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx é relativamente alto, em comparação com a literatura, pois K_M^{app} menores que 1,0 mmol L^{-1} para GOx têm sido obtidos[9,10,11]. Isso implica que o eletrodo, embora muito sensível à presença de glicose apresentando um limite de detecção de 17 μmol L^{-1} (três vezes a razão sinal-ruído), ainda não está numa configuração ideal para que a enzima catalise eficientemente a oxidação da glicose.

Para contornar esse problema, uma outra estratégia foi utilizada para a imobilização de GOx, como será mostrado a seguir.

8.4 Imobilização de GOx no Eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx Utilizando *Drop-coating*

Primeiramente, realizou-se uma nova e completa investigação do eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)3@CoHCF-GOx, desde a síntese do mediador aos testes com peróxido de hidrogênio e glicose. Os resultados descritos na figura 8.7. mostram que o sistema ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx é bem comportado e resulta em um típico eletrodo enzimático, com alta reprodução dos resultados. Partindo desse ponto, outro método de imobilização enzimática foi investigado para verificar a eficiência catalítica da GOx. Mencione-se que o método anterior, no qual o eletrodo foi imerso em solução contendo BSA, GOx e GA, é conhecido como *dip-coating*. Passou-se então a investigar um outro método, onde GOx é imobilizada via *drop-coating*. Neste, a mesma solução sem GA é utilizada para imobilizar a enzima. Primeiramente, adicionam-se 10 µL da solução de BSA/GOx na superfície do eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF, permanecendo em repouso por 1 hora a 25 ºC. Em seguida e após verificação visual de que o eletrodo estava parcialmente seco, adicionaram-se 10 µL de GA, deixando o eletrodo novamente em repouso por mais 2 horas. Utilizou-se o eletrodo apenas após seu armazenamento em tampão fosfato (pH 7,0) durante 24 horas a 4 ºC.

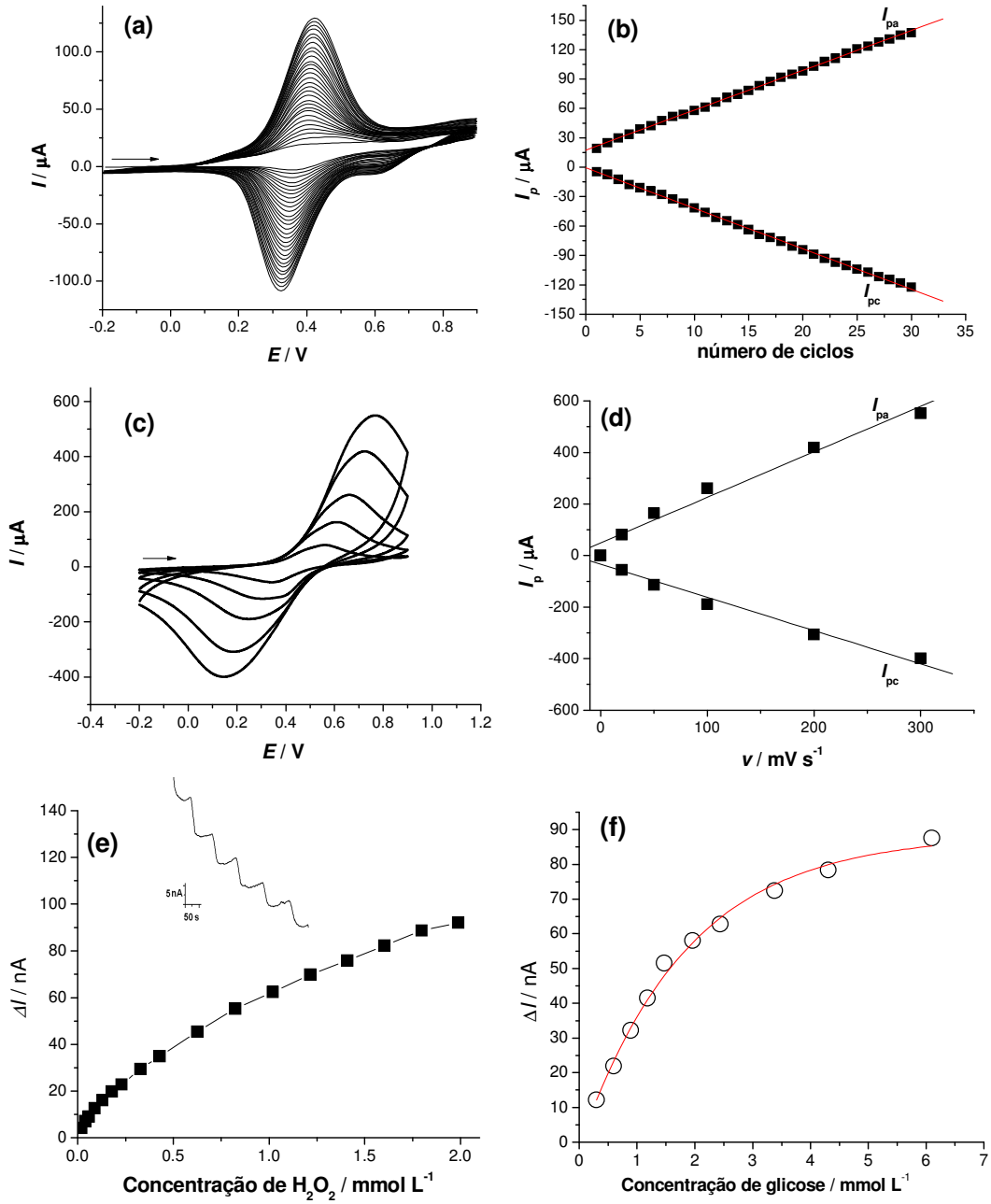


Figura 8.7 - Preparação e caracterização do eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx. Em (a) tem-se 30 ciclos voltamétricos da deposição de CoHCF em ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$, onde a deposição ocorreu linearmente com as correntes de pico e o número de ciclos (b). O eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$CoHCF foi transferido para uma cela contendo tampão fosfato (pH 7,0) e submetido a ciclos com diferentes velocidades de varredura (c), onde linearidade entre as correntes de pico e a velocidade de varredura foi obtida (d). A variação entre a concentração de peróxido de hidrogênio e a corrente está apresentada em (e). Após a imobilização de GOx, o eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx apresentou comportamento típico de um dispositivo enzimático frente à adição de glicose (f).

Ao comparar a variação da concentração de glicose com a corrente de redução de peróxido de hidrogênio verificou-se que o método de *drop-coating* possui maior eficiência que o *dip-coating*, como mostra a figura 8.8. Os dois casos obedecem ao perfil da curva de Michaelis-Menten para a reação enzimática. No entanto, maior corrente é obtida quando o método de *drop-coating* é utilizado. Na parte linear das curvas, a corrente para uma mesma concentração de glicose é duas vezes maior quando se utiliza *drop-coating*, além de que o K_M^{app} é 0,80 mmol L^{-1}, aproximadamente três vezes menor que o obtido por *dip-coating*. Este resultado já fica entre os valores da literatura considerados[9,10] como de alta capacidade biocatalítica.

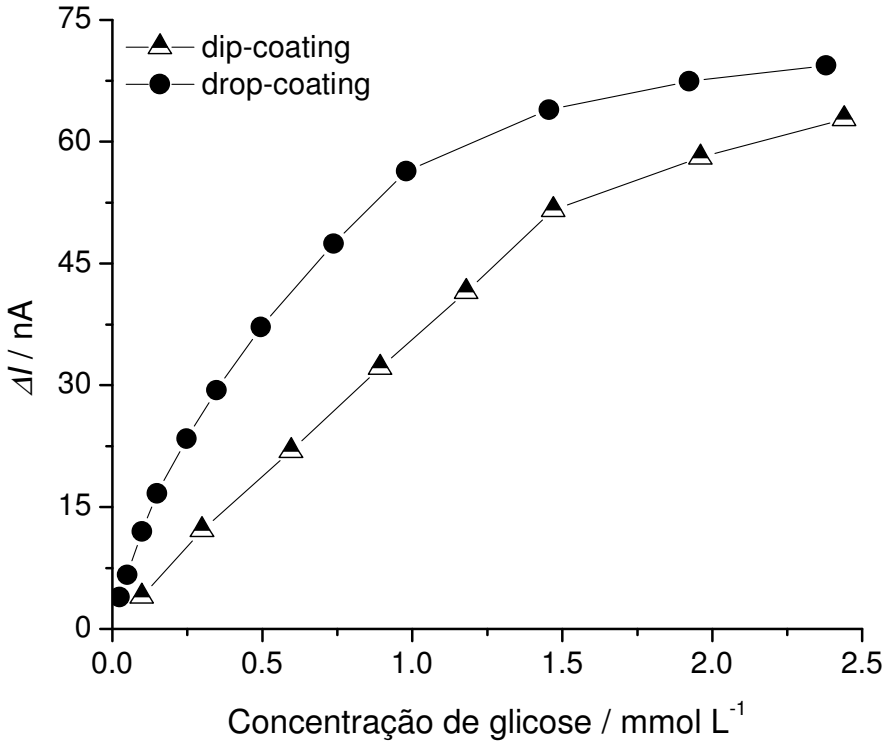


Figura 8.8 - Variação da corrente de redução de peróxido de hidrogênio obtida em função da concentração de glicose utilizando o eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx preparado por dois métodos distintos de imobilização enzimática: *dip-coating* e *drop-coating*.

8.5 Variação da Concentração de Enzima no Eletrodo

Os resultados melhores obtidos com a técnica de *drop-coating* podem ser atribuídos, provavelmente, ao fato de o sistema BSA/GOx estar ligado mais efetivamente na superfície das moléculas de PAMAM, conferindo maior estabilidade e sensibilidade ao eletrodo. Além disso, a quantidade de enzima pode ser mais bem controlada utilizando *drop-coating*. Para compreender o efeito da concentração enzimática no eletrodo, variou-se a concentração de BSA na solução enzimática, mantendo-se a concentração de GOx constante. Também variou-se a concentração de GOx, com a concentração de BSA constante. A figura 8.9 mostra a resposta à variação de glicose para um eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx utilizando diferentes quantidades de enzima depositada por *drop-coating*

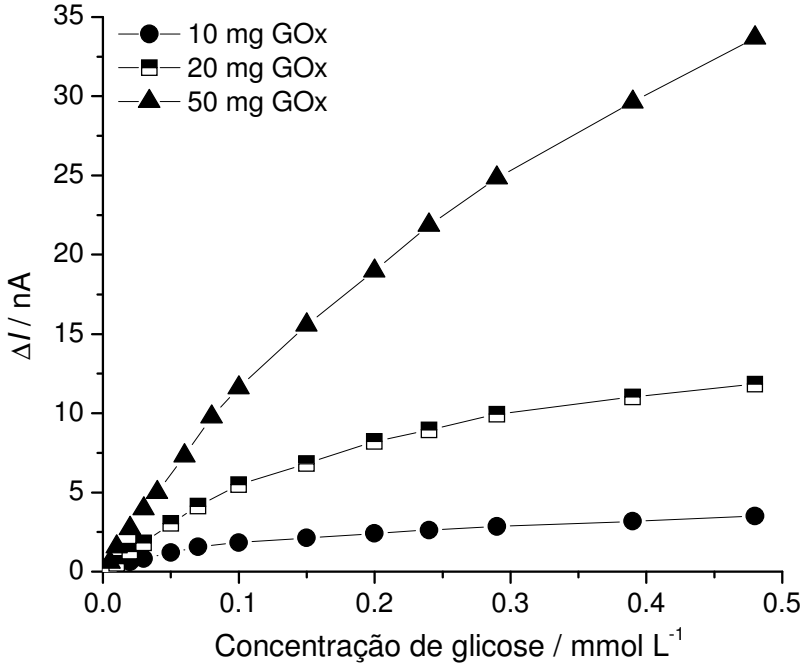


Figura 8.9 – Resposta à variação de glicose para um eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx utilizando diferentes quantidades de enzima depositada por *drop-coating*.

Um aumento significativo de corrente é observado quando a concentração de enzima é aumentada de 10 para 50 mg mL^{-1} e mantendo-se a concentração de BSA constante. Fixando a concentração de GOx (50 mg mL^{-1}) o efeito da presença de BSA também foi investigado nas concentrações de 20, 50 e 100 mg mL^{-1}, não se observando modificação significativa. Dessa forma, a concentração de BSA foi mantida em 20 mg mL^{-1}. Notou-se também que a concentração de GA influencia fortemente o comportamento eletroquímico do eletrodo, uma vez que aumentando de 2,5% para 25% a concentração de GA na solução, obteve-se um decréscimo de 25% da corrente. Isso talvez ocorra porque o GA pode estar ligando-se a sítios enzimáticos importantes para o processo catalítico, causando a desativação da GOx durante o entrecruzamento. Por isso, utilizou-se GA 2,5% nos experimentos subsequentes.

8.6 Utilizando o Eletrodo ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx como Biossensor

A otimização dos parâmetros mencionados no item 8.5 fez com que o eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx apresentasse alta sensibilidade à glicose. Diante disso, torna-se pertinente citar as configurações finais aqui e seu possível teste como biossensor, como mostra a figura 8.10. A resposta final para a concentração de glicose, a 0,0 V (Ag/AgCl), determinada em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) levou a uma resposta linear até 100 μmol L^{-1} de glicose, com sensibilidade de 115 nA mmol L^{-1} e limite de detecção de 5,5 μmol L^{-1} (três vezes a razão sinal ruído). O valor de K_M^{app} foi 0,24± 0,03 mmol L^{-1} (n=3), um excelente resultado, que é atribuído à enzima estar operando em alta capacidade catalítica.

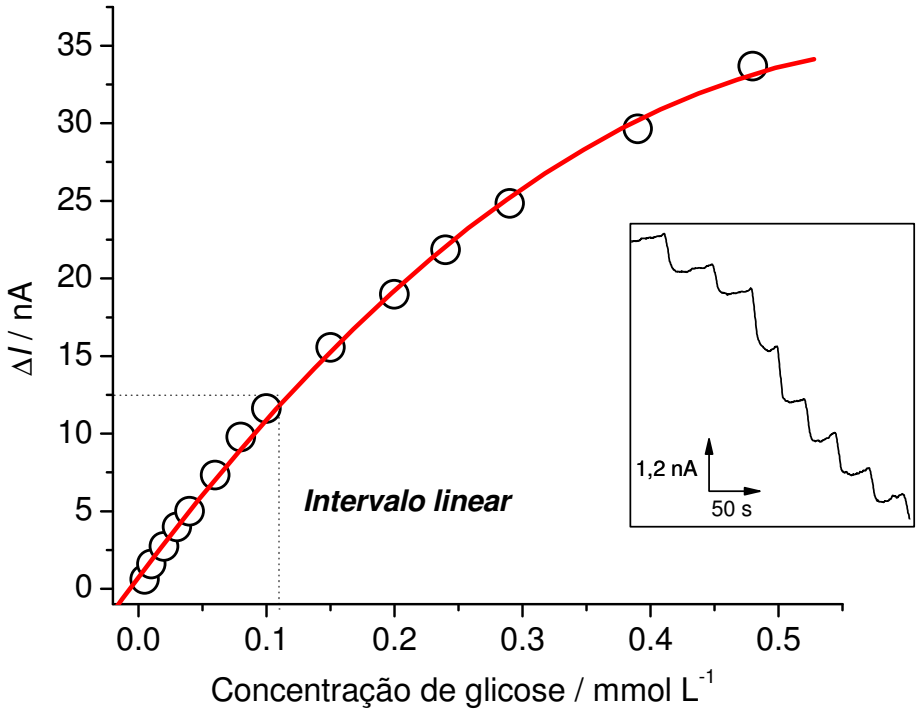


Figura 8.10 – Típica resposta à variação de glicose para um biossensor do tipo ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx.

Realizaram-se alguns estudos preliminares de estabilidade operacional, como determinar a corrente como resposta à mesma concentração de glicose em um período de 8 horas. Notou-se que a corrente decaiu cerca de 30% no final deste intervalo de tempo. A estabilidade de armazenagem durante 30 dias, quando o biossensor é guardado em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) a 4 °C, mostrou-se muito eficaz, pois o eletrodo manteve 70% da sua resposta inicial

Desses resultados, concluiu-se que o eletrodo de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx é promissor para aplicação em biossensor. Naturalmente, várias etapas deverão ser cumpridas para implementar um dispositivo. Alguns estudos em andamento no nosso Grupo revelaram que compostos interferentes naturais da glicose em amostras de vinhos, por exemplo, têm seus efeitos minimizados quando o biossensor de ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx é

utilizado. Isso motiva novos estudos nesse âmbito, com a transdução eletroquímica em conjunção com a arquitetura molecular auxiliando no desenvolvimento de dispositivos enzimáticos.

8.7 Conclusões

Demonstrou-se neste capítulo que a configuração ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx pode ser aplicada como dispositivo enzimático eficiente e estável. Utilizando *drop-coating*, GOx foi imobilizada com sucesso na superfície eletródica, e esse método foi empregado posteriormente em experimentos de biocatálise.

Os melhores resultados obtidos revelaram que glicose pode ser detectada a 0,0 V (Ag/AgCl), em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0), com resposta linear até 100 μmol L^{-1} de glicose, sensibilidade 115 nA mmol L^{-1}, limite de detecção de 5,5 μmol L^{-1} e K_M^{app} = 0,24 mmol L^{-1}. Ressalta-se que o sistema desenvolvido cria um ambiente amigável para a enzima GOx, que opera com alta atividade catalítica.

A aplicação como biossensor parece ser viável, o que foi reforçado por estudos preliminares de estabilidade operacional.

8.8 Referências

1. EDSALL, J.T. **Enzymes and enzyme systems, their state in nature.** Cambridge : Harvard University Press, 2001. 146 p.

2. SCHOOL OF BIOLOGICAL & CHEMICAL SCIENCES AT QUEEN MARY. University of London. Disponível em: < http://www.chem.qmul.ac.uk>. Acesso em: 08 jan. 2007.

3. UNIVERSITY OF PAYSLEY. Paisley Scotland. Disponível em: <http://www-biol.paisley.ac.uk/>. Acesso em: 08 jan. 2007.

4. WRING, S. A.; HART, J. P. Chemically modified, carbon-based electrodes and their application as electrochemical sensors for the analysis of biologically important compounds - A review. **Analyst**, v. 117, p. 1215-1229, 1992.

5. MURPHY, L. Biosensors and bioelectrochemistry. **Bioinorganic Chemistry**, v. 10, p.177–184, 2006.

6. KARYAKIN A.A. Prussian Blue and its analogues: Electrochemistry and analytical applications. **Electroanalysis**, v. 3, p.813-819, 2001.

7. CRESPILHO, F.N.; NART, F.C.; OLIVEIRA JUNIOR, O.N.; BRETT, C.M.A. Oxygen Reduction and diffusion in electroactive nanostructured membranes (ENM) using the layer-by-layer dendrimer-gold nanoparticles approach. **Electrochimica Acta**, 2006. In press.

8. SILVA, C.J.S.M.; SOUSA, F.; GÜBITZ, G.; CAVACO-PAULO, A. Chemical modifications on proteins using glutaraldehyde. **Food Technology Biotechnology**, v. 42, p. 51–56, 2004.

9. JIN-ZHONG, X.; JUN-JIE, Z.; QIANG, W., ZHENG, H.; HONG-YUAN, C. An amperometric biosensor based on the coimmobilization of horseradish peroxidase and methylene blue on a carbon nanotubes modified electrode. **Electroanalysis**, v. 15, p. 219-225, 2006.

10. GHICA M.E., BRETT C.M.A. Development and applications of a bienzymatic amperometric glycerol biosensor based on a poly(neutral red) modified carbon film electrode. **Analytical Letters,** v. 39,p. 1527-1542, 2006.

11. CRESPILHO, F. N.; GHICA, M. E.; FLORESCU, M.; NART, F. C.; OLIVEIRA JUNIOR., O. N.; BRETT, C M A . A strategy for enzyme immobilization on Layer-by-Layer dendrimer-gold nanoparticle electrocatalytic membrane incorporating redox mediator. **Electrochemistry Communications**, v. 8, p. 1665-1670, 2006.

CAPÍTULO IX:
Conclusões

Esta tese de doutorado foi dividida em quatro etapas fundamentais, com destaque para a síntese e caracterização de nanopartículas metálicas encapsuladas em dendrímero, preparação e caracterização de filmes automontados com nanopartículas de ouro e dendrímero poliamidoamina (PAMAM-Au), preparação e caracterização de membranas eletroativas nanoestruturadas (MENs) por meio de eletrodeposição de mediadores redox em filmes automontados de PVS/PAMAM-Au e, finalmente, realização de um estudo da Imobilização enzimática em MENs. Dos resultados obtidos, enumera-se a seguir as principais conclusões:

1) Por meio da espectroscopia eletrônica, caracterizou-se as nanopartículas e observou-se o comportamento da banda plasmônica. Imagens de TEM revelaram que PAMAM-Au e PAMAM-Pt possuem morfologias esféricas, enquanto o PAMAM-Ag forma grandes cristais com estruturas fractais. Estruturas cúbicas de face centrada caracterizaram os cristais formados de Au e Pt, sendo possível estimar os diâmetros (3,0 nm) das nanopartículas pela equação de Scherrer (difração de raios X), confirmados posteriormente por TEM. Indício de estabilização por encapsulamento do híbrido PAMAM-Au foi observado por FTIR,

para o qual foram utilizadas as bandas de amidas. Por fim, determinou-se o tempo total de formação de PAMAM-Au e mostrou-se a evolução da reação de formação das nanopartículas em função do tempo.

2) Posteriormente à preparação das nanopartículas, filmes de PVS/PAMAM-Au foram preparados com 5 minutos de tempo de imersão. Utilizando UV-Vis e CV, mostrou-se que o crescimento desses filmes é linear, indicando que a mesma quantidade de material é adsorvida em cada etapa. No caso do eletrodo ITO-(PVS/PAMAM-Au), saltos de elétrons foram considerados o mecanismo de transporte de carga ao longo do filme.

3) Após a caracterização do eletrodo ITO-(PVS/PAMAM-Au), um novo sistema core-shell Au@PB foi preparado, formando um sistema ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_6$@PB, onde a deposição de PB pode ser monitorada medindo-se as correntes do processo faradaico durante os ciclos potenciodinâmicos. Similarmente, outros mediadores de hexacianoferratos de metais de transição (Fe, Ni, Co e Cu) foram obtidos sobre eletrodos de ITO-(PVS/PAMAM-Au). Por meio da EIS, verificou-se que a resistência de transporte de carga decresce na sequência CuHCF > FeHCF > NiHCF > CoHCF e todos os eletrodos apresentaram atividade catalítica para o peróxido de hidrogênio.

4) Uma nova configuração de eletrodo, ITO-(PVS/PAMAM-Au)$_3$@CoHCF-GOx, pôde ser aplicada como dispositivo enzimático, sendo que GOx foi imobilizada por *drop-coating* na superfície do eletrodo e aplicada em experimentos de biocatálise. Glicose pôde ser detectada a 0,0 V (Ag/AgCl), em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0), com resposta linear até 100 μmol L^{-1} de glicose, sensibilidade 115 nA mmol L^{-1}, limite de detecção de 5,5 μmol L^{-1} e

K_M^{app} = 0,24 mmol L^{-1}, mostrando que o sistema aqui proposto cria um ambiente amigável para a enzima operar com alta atividade catalítica.

Assim, a principal contribuição deste trabalho foi desenvolver novos sistemas nanoestruturados com aplicações específicas, tendo em vista o entendimento dos processos de troca de carga entre sistemas nanoestruturados e biológicos. A preparação das MENs representou um grande passo nesse sentido.

CAPÍTULO X:
Propostas para Trabalhos Futuros

Ainda há muito a investigar para compreender as propriedades dos filmes automontados com PAMAM-nanopartículas e polieletrólitos. A seguir, vislumbram-se algumas propostas para a continuidade e evolução deste trabalho:

1) Estudar o comportamento eletroquímico dos sistemas PVS/PAMAM-Pt e PVS/PAMAM-Ag.

2) Verificar o efeito das bandas plasmônicas dos metais em filmes automontados.

3) Desenvolver novas configurações de eletrodos, tendo em vista a obtenção de propriedades específicas.

4) Explorar diferentes tipos de reações enzimáticas utilizando as MENs como eletrodo.