

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
CURSO DE DOUTORADO EM QUÍMICA – ASSOCIAÇÃO AMPLA
UEL/UEPG/UNICENTRO

VAGNER DOS SANTOS

**Filmes LbL contendo o nanohíbrido $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ e polieletrólitos aniônicos como
sensores e biossensores eletroquímicos**

PONTA GROSSA
2013

VAGNER DOS SANTOS

Filmes LbL contendo o nanohíbrido Pt-SiPy⁺Cl⁻ e polieletrólitos aniônicos como sensores e biossensores eletroquímicos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química (Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO) como requisito à obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Inorgânica.

Orientadora: Prof. Dra. Karen Wohnrath

Coorientadora: Prof. Dra. Christiana Andrade Pessoa

PONTA GROSSA

2013

- S237 Santos, Vagner dos
Filmes LbL contendo o nanohíbrido Pt-SiPy⁺Cl⁻ e polieletrólitos aniônicos como sensores e biossensores eletroquímicos / Vagner dos Santos. Ponta Grossa, 2013.
150 f.
- Tese (Doutorado em Química – área de concentração : Química Inorgânica), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Universidade Estadual de Londrina e Universidade Estadual do Centro-Oeste.
- Orientadora: Prof. Dra. Karen Wohnrath
Coorientadora: Prof. Dra. Christiana Andrade Pessoa
1. Cloreto de 3-*n*-propil-piridínio-silsesquioxano. 2. Filmes LbL. 3. Nanopartículas de platina. 4. Dopamina. 5. Lipossomos e glicose oxidase I. Wohnrath, Karen. II. Pessoa, Christiana Andrade. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Universidade Estadual de Londrina. Universidade Estadual do Centro-Oeste. Doutorado em Química. IV. T.

CDD : 547

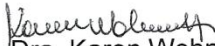
TERMO DE APROVAÇÃO

VAGNER DOS SANTOS

“FILMES LbL CONTENDO Pt-SiPy⁺Cl⁻ E POLIELETRÓLITOS ANIÔNICOS COMO SENSORES E BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS.”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

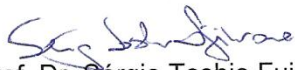
Orientador:


Prof.ª Dra. Karen Wohnrath
UEPG/PR


Prof. Dr. Frank Nelson Crespilho
IQ – USP- São Carlos


Prof. Dr. Vagner Roberto de Souza
UEM/PR


Prof. Dr. Luiz Henrique Dall'Antonia
UEL/PR


Prof. Dr. Sérgio Toshio Fujiwara
UEPG/PR

Ponta Grossa, 20 de junho de 2013.

Dedicatória

“A oportunidade nunca chega para aquele que espera, senão para aquele que vai a sua procura”.

PAUL J. MEYER

Aos meus queridos Pais Orlando e Carmensi,
aos meus irmãos Elieser e Monalisa
e a minha esposa Cíntia.

Agradecimentos

Às pessoas que são importantes e que contribuíram para a realização desta tese, quero expressar os meus sinceros agradecimentos:

Principalmente a Deus por ter me proporcionado oportunidades e pela presença constante em todos os momentos da minha vida.

A Prof^a. Dra. Karen Wohnrath pela orientação durante os últimos seis anos desde o início do mestrado, pela amizade, por seu exemplo de dedicação, ética e seus ensinamentos que foram essenciais para minha formação durante a realização do Doutorado.

A Prof^a. Dra. Christiana Andrade Pessoa pela coorientação, pela amizade e pela contribuição na discussão de resultados, fatores estes que auxiliaram no desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Jarem pela amizade, pelas sugestões e pelas discussões dos resultados que foram fundamentais para o desenvolvimento desta tese.

Ao Prof. Dr. Sérgio Toshio Fujiwara pelas sugestões e pelo fornecimento do polímero SiPy⁺Cl⁻.

Aos Professores Dr. Valtencir Zucolotto e Dr. Frank N. Crespilho pelas colaborações com discussões, sugestões, fornecimento de laboratório, reagentes e equipamentos que certamente ajudaram a enriquecer o conteúdo desta tese.

Aos amigos José Luiz de Souza Lopes, Felipe José Pavinatto e Thatyane Morimoto Nobre que através do curso intitulado “Filmes Finos Nanoestruturados e Modelos de Biomembranas” colaboraram com sugestões e conhecimentos que auxiliaram na pesquisa realizada com lipossomos.

Aos amigos Jorge Delezuck e Rodrigo Iost que me auxiliaram bastante nas atividades experimentais durante o tempo que estive na USP de São Carlos.

A minha irmã Monalisa, pela amizade, pelo incentivo, pelo auxílio nas atividades experimentais, e pelas discussões dos resultados que me auxiliaram bastante para chegar até aqui.

Aos meus amigos do grupo de desenvolvimento de eletrodos modificados (GDEM) que sempre de uma forma ou de outra, procuraram me ajudar no desenvolvimento desta pesquisa. Em especial as amigas Cliciane e Bianca que me auxiliaram bastante na pesquisa

voltada a utilização de lipossomos e no desenvolvimento do biossensor enzimático. Ao grande amigo Cleverson pela troca de informações e discussões dos resultados.

À Prof^a. Dra. Célia Guadalupe T. J. Andrade e ao Prof. Dr Luiz Henrique Dall'Antonia da UEL, por auxiliarem nas medidas de MET.

Ao Prof. Dr. Marcelo M. Ferro pela colaboração no preparo das amostras de estriados e pelas discussões que certamente auxiliaram nesta tese.

Aos técnicos do Complexo de Laboratório Multiusuários da UEPG, Nilson e Luzia, pelo auxílio nas análises realizadas.

À Coordenação do Programa de Doutorado em Química pelo suporte necessário para realização desta tese.

Ao Prof. Dr. Roberto Faria, coordenador do Instituto Nacional de Eletrônica Orgânica INCT/CNPq, pela bolsa CNPq-PDI, a qual foi fundamental para o desenvolvimento deste Doutorado.

Aos meus familiares pela compreensão, apoio e incentivo na realização deste Doutorado, em especial aos meus pais por sempre confiarem no meu potencial dando-me força e amor nas horas que precisei.

À minha esposa Cíntia por me compreender nas horas que fiquei distante no decorrer deste trabalho, pelo apoio, incentivo e por todo seu amor e carinho.

Ao grande amigo Jean Marcelo Pasetti, por acreditar em mim desde o início de minha carreira como professor, pelo incentivo e formação na minha profissão.

Resumo

Santos, V. Filmes LbL contendo o nanohíbrido Pt-SiPy⁺Cl⁻ e polieletrólitos aniônicos como sensores e biossensores eletroquímicos. 2013. 150 p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2013.

Esta tese descreve o uso do polímero cloreto de 3-*n*-propil-piridínio-silsesquioxano (SiPy⁺Cl⁻) como um eficiente estabilizante para síntese de nanopartículas de platina (NPs-Pt). Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão e medidas de espalhamento dinâmico de luz indicaram boa distribuição das NPs-Pt (3-40 nm) nas cavidades do SiPy⁺Cl⁻. O nanohíbrido Pt-SiPy⁺Cl⁻ obtido foi utilizado como polication na preparação de filmes finos pela técnica *Layer-by-Layer* (LbL). Para investigação das propriedades eletrocatalíticas das NPs-Pt incorporadas ao SiPy⁺Cl⁻, obteve-se filmes pela deposição alternada dos poliânions poli-2,5-metoxipropiloxi-sulfonado fenilenovinileno (PPV-SO₃) e ácido-polivinilsulfônico (PVS) com o polication Pt-SiPy⁺Cl⁻, nas arquiteturas (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)_n, (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PVS)_n, respectivamente. A deposição nos filmes LbL foi monitorada por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, a qual revelou um crescimento linear dos filmes a cada bicamada depositada. Além disso, nos espectros UV-Vis foi constatado que a sequência de deposição iniciada pelos poliânions (PPV-SO₃ ou PVS) apresentou maior absorbância, indicando que nas arquiteturas (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n e (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n há mais espécies disponíveis de NPs-Pt na superfície dos filmes. A presença dos polieletrólitos nos filmes e a interação entre estes foram constatadas por medidas espectroscópicas de infravermelho (FTIR) e Raman. Nas medidas eletroquímicas para detecção de DA, com os filmes formados por PVS e Pt-SiPy⁺Cl⁻, verificou-se que o (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ apresentou correntes de oxidação para a DA mais intensas em meio ao interferente ácido ascórbico (AA), com uma diferença entre os potenciais de oxidação igual a 550 mV, em pH 7. Nos filmes contendo PPV-SO₃ e Pt-SiPy⁺Cl⁻ verificou-se que a presença do PPV-SO₃ é fundamental para auxiliar as NPs-Pt no processo de transferência de elétrons. O filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ detectou simultaneamente a DA em meio aos interferentes AA e ácido úrico (AU) ($\Delta E = 640$ mV), com uma diferença de potenciais de oxidação 90 mV maior do que a observada com o filme contendo PVS (550 mV). Além disto, melhores valores de sensibilidade ($2,7 \mu\text{mol L}^{-1}$), limite de detecção ($LD = 3,19 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) e limite de quantificação ($LQ = 2,07 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) foram observados nos estudos com o filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em relação ao PVS. A fim de mimetizar um sistema biológico, escolheu-se o filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ para detecção de DA confinada nos lipossomos de dipalmitoilfosfatidil colina (DPPC). Este filme possibilitou uma diferença de potencial de oxidação de 350 mV da DA encapsulada, na presença dos interferentes AA e AU. A partir desta constatação, medidas *in vitro* para a detecção de DA em estriados cerebrais de ratos foram realizadas com sucesso com o filme *drop-coated* dos polieletrólitos PPV e Pt-SiPy⁺Cl⁻, imobilizados sobre eletrodo de carbono impresso. Além deste analito, as arquiteturas dos filmes LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)_n foram utilizadas na detecção de H₂O₂ e glicose. Após imobilização de glicose oxidase (GOx) na superfície dos filmes, o biossensor (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆GOx exibiu sensibilidade = $1,17 \mu\text{mol L}^{-1}$, $LD = 27,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, $LQ = 91,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $k_m^{app} = 2,64 \text{ mmol L}^{-1}$, valores estes superiores a filmes mais complexos relatados na literatura, demonstrando a importância das NPs-Pt para estes filmes.

Palavras chaves: cloreto de 3-*n*-propil-piridínio-silsesquioxano, filmes LbL, nanopartículas de platina, dopamina, lipossomos e glicose oxidase.

Abstract

Santos, V. LbL Films containing the Pt-SiPy⁺Cl⁻ nanohybrid and anionic polyelectrolytes as sensors and biosensors electrochemical. 2013. 150 p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2013.

This thesis describes the use of the chloride of 3-*n*-propyl-pyridinium-silsesquioxane polymer (SiPy⁺Cl⁻) as an efficient stabilizer for the synthesis of platinum nanoparticles (NPs-Pt). Transmission Electron Microscopy (TEM) and measurements of dynamic light scattering (DLS) showed good distribution of NPs-Pt (3-40 nm) in the cavities of the SiPy⁺Cl⁻. The nanohybrid (Pt-SiPy⁺Cl⁻) obtained was used as polycation in the preparation of thin films by the Layer-by-Layer (LbL) technique. In order to investigate the electrocatalytic properties, films were obtained by the alternated deposition of the polyanions poly-2,5-metoxipropiloxisulfonated-phenylenevinylene (PPV-SO₃) and acid (polyvinylsulfonic) (PVS) with Pt-SiPy⁺Cl⁻ polycation in the architectures (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n, (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)_n, (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n and (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PVS)_n, respectively. The deposition of the films was monitored by UV-Vis spectroscopy, which showed a linear growth in each bilayer deposited. In addition, it was observed by UV-Vis spectra that the deposition sequence initiated by polyanions (PPV-SO₃ or PVS) showed higher absorbance, indicating that the architectures (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n and (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n contain more species of NPs-Pt available on the surface of the films. The presence of polyelectrolytes in the films and the interaction between them were verified by Infrared spectroscopic (FTIR) and Raman. Electrochemical measurements for the detection of DA, with the LbL films from PVS e Pt-SiPy⁺Cl⁻, showed that the oxidation currents for the (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ in presence of its interferent the ascorbic acid (AA) were more intense, with a difference between the oxidation potential equal to 550 mV at pH 7. For the films containing PPV-SO₃ and Pt-SiPy⁺Cl⁻ it was found that the presence of PPV-SO₃ is crucial to help the NPs-Pt in the process of electron transfer. The (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ LbL film detected simultaneously the DA and the interferents AA and uric acid (UA) ($\Delta E = 640$ mV) with an oxidation potential difference of 90 mV higher than the observed with the (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ LbL film containing PVS ($\Delta E = 550$ mV). In addition, the better values of sensitivity (2,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$), detection limit ($LD = 3,19 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$), quantification limit ($LQ = 2,07 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) were observed in the studies with the LbL films (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ instead of PVS. In order to mimic a biological system, the LbL film (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ was selected to DA detection confined into liposomes from dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC). This film provided a difference of oxidation potential of 350 mV of the encapsulated DA, in the presence of AA and UA interfering. In vitro measurements for the detection of DA in striatal rat brain were performed successfully with drop-coated film of polyelectrolyte PPV and Pt-SiPy⁺Cl⁻, immobilized on screen-printed carbon electrode. Besides this analyte, the architectures of LbL films (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n and (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)_n were used in the detection of H₂O₂ and glucose. After immobilization of glucose oxidase (GOx) on the surface of the films, the biosensor (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆GOx exhibited sensitivity = 1.17 $\mu\text{mol L}^{-1}$, LD = 27.4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, LQ = 91.4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e $k_m^{app} = 2.64 \text{ mmol L}^{-1}$, values greater than more complex films reported in the literature, demonstrating the importance of NPsPt for these films.

Keywords: chloride of 3-*n*-propyl-pyridinium-silsesquioxane polymer, LbL films, platinum nanoparticles, dopamine, liposomes, hydrogen peroxide and glucose oxidase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de preparação de filmes LbL.....	30
Figura 2 – Estrutura idealizada do cloreto de 3- <i>n</i> -propil-piridínio-silsesquioxano (SiPy ⁺ Cl ⁻) (Patente: BR9803053-A). Para simplificar, foram omitidos os átomos de hidrogênio dos átomos de carbono.....	33
Figura 3 – (a) Via de síntese de DA obtida a partir do aminoácido L-tirosina. (b) Representação da região do estriado cerebral humano (c) estriado cerebral de rato.....	38
Figura 4 – Reação da GOx com glicose onde o FAD é reduzido à FADH ₂ que é oxidado pelo O ₂	48
Figura 5 – Esquema da estabilização das NPs-Pt no polímero SiPy ⁺ Cl ⁻	51
Figura 6 – Esquema de preparação das vesículas lipossômicas mostrando a dissolução do DPPC em clorofórmio, evaporação do solvente, hidratação do filme lipídico com solução de DA, homogeneização e formação dos lipossomos MLV.....	54
Figura 7 – Etapas da sonicação dos estriados cerebrais de ratos.....	55
Figura 8 – Aparato experimental utilizado para realização das medidas eletroquímicas utilizando o filme <i>drop-coated</i> (C/PPV/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃ contendo a solução de DA sobre a superfície.....	61
Figura 9 – (a) Espectros de UV-Vis das soluções de Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ , HCOOH 0,1 mol L ⁻¹ e H ₂ PtCl ₆ 2 mmolL ⁻¹ (b) Distribuição de tamanho do Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ (Imagem inserida em 16 d: solução de Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻). Imagens de MET do Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ nas aproximações de (c) 23000 vezes e (d) 360000 vezes.....	63
Figura 10 – Espectros de UV-Vis das soluções de PVS (2,5 g L ⁻¹), PPV-SO ₃ (2,5 g L ⁻¹) e Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻	64
Figura 11 – (a) Espectros de absorção na região do UV-Vis de filmes LbLs (PPV/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃ obtidos em diferentes tempos; (b) gráfico de absorbância (293 nm) vs tempo de deposição.....	65
Figura 12 – (a) Espectros de UV-Vis dos filmes LbL (PVS/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) _n contendo diferentes bicamadas; (b) Relação entre o número de bicamadas e a absorbância em 258 nm dos filmes LbL (PVS/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) _n e (Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ /PVS) _n (c) Espectros de UV-Vis dos filmes LbL (PPV/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) _n contendo diferentes bicamadas; (d) Relação entre o número de bicamadas e a absorbância em 293 nm dos filmes LbL (PPV/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) _n e (Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ /PPV) _n	66
Figura 13 – Espectros de UV-VIS da solução 2,5 g L ⁻¹ de PPV-SO ₃ , solução de Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ e dos filmes LbL (PPV/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃₀ e (Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ /PPV) ₃₀ sobre quartzo.....	67
Figura 14 – Espectros FTIR de (a) <i>drop-coated</i> do PVS, (b) <i>drop-coated</i> do SiPy ⁺ Cl ⁻ ; (c) <i>drop-coated</i> do Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ ; (d) filme LbL (Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ /PVS) ₄₀ e (e) filme LbL (PVS/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₄₀	68
Figura 15 – Espectros de FTIR dos filmes (a) <i>drop-coated</i> de PPV-SO ₃ , (b) <i>drop-coated</i> de SiPy ⁺ Cl ⁻ , (c) <i>drop-coated</i> de Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ , (d) LbL de (PPV/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃₀ e (e) LbL de (Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ /PPV) ₃₀	70

- Figura 16** – Espectros Raman dos filmes de : (a) *drop-coated* PVS (b) *drop-coated* SiPy^+Cl^- , (c) *drop-coated* $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, (d) filme LbL $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$ e (e) filme LbL $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS})_{30}$72
- Figura 17** – Espectros de espalhamento Raman para os filmes *drop-coated* de SiPy^+Cl^- , $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ e PPV-SO_3 e do filme LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$, todos depositados sobre substrato de prata.....72
- Figura 18** – Imagens de AFM dos filmes LbL de (a) $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{12}$, (b) $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{20}$, (c) $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$, e (d) $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS})_5$73
- Figura 19** – Imagens morfológicas de AFM dos filmes LbL (a) $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_5$, (b) $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{10}$, (c) $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{15}$ e (d) $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_{20}$. A janela de varredura para as imagens foi de 5.5 μm75
- Figura 20** – Voltamogramas cíclicos do FTO e dos filmes LbL $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$, $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS})_n$, $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_n$, em $\text{pH} = 7$ na presença de 0,1 mol L^{-1} de NaNO_3 ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$).....76
- Figura 21** – Voltamogramas cíclicos do FTO e dos filmes LbL $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$, $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS})_3$ e filme *drop-coated* $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ sobre FTO, em $\text{pH} = 7$ na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ DA ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$).....77
- Figura 22** – Voltamogramas (a) cíclicos e (b) de pulso diferencial dos filmes LbL $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$, onde $n = 1, 3, 6, 9, 12$ bicamadas, na presença de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ DA ($v = 30 \text{ mV s}^{-1}$).....78
- Figura 23** – Voltamogramas cíclicos do filme LbL $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ na presença de DA e AA, ambos $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em NaNO_3 0,1 mol L^{-1} , $\text{pH} = 7$ e $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$79
- Figura 24** – (a) Voltamogramas de pulso diferencial do filme LbL $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ na presença de diferentes concentrações de DA ($6,7 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e (b) Curva analítica (c) Voltamograma de onda quadrada obtidos com filme LbL $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ na presença de DA ($0,31$ e $2,07 \mu\text{mol L}^{-1}$), em NaNO_3 0,1 mol L^{-1} em $\text{pH} = 7$ ($v = 30 \text{ mV s}^{-1}$)....80
- Figura 25** – Voltamogramas de pulso diferencial dos eletrodos $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$, $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS})_3$, $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$, FTO e Pt lisa em (a) $\text{pH} = 1$, (b) $\text{pH} = 3$, (c) $\text{pH} = 7$ e (d) $\text{pH} = 10$. Na presença de [DA] e [AA] ambos $9,09 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. $E_{\text{pulso}} = 50 \text{ mV}$; $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ e $t_{\text{pulso}} = 0,07 \text{ s}$ (parâmetros otimizados).....82
- Figura 26** – Voltamogramas cíclicos dos filmes LbL (a) $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ (b) $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_n$ (c) do substrato FTO, dos filmes LbL $(\text{PPV}/\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$, $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_3$, $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_3$, na presença de DA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em NaNO_3 0,1 mol L^{-1} $\text{pH} = 7$ e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$84
- Figura 27** – (a) Voltamogramas cíclicos de Pt *bulk*, FTO, *drop-coated* de $(\text{PPV-SO}_3)_3$, $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$, $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ e $(\text{PVS})_3$ e (b) destes eletrodos sem Pt *bulk*, em DA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, NaNO_3 0,1 mol L^{-1} , $\text{pH} = 7$ e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$85
- Figura 28** – Voltamogramas cíclicos dos filmes LbL de (a) $(\text{PPV}/\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ e (b) $(\text{PVS}/\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ na presença de DA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em NaNO_3 0,1 mol L^{-1} $\text{pH} = 7$ e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$86

- Figura 29** – Voltamogramas de onda quadrada (a) e componentes de corrente (b) do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de DA 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹. Parâmetros utilizados: $f = 90$ Hz, $a = 80$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.....86
- Figura 30** – (a) Voltamogramas de onda quadrada do filme (PPV/Pt-SiPy+Cl-)3 em diferentes [DA] (2,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ à 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹) e (b) Curva analítica. (Parâmetros da onda: $f = 90$ Hz, $a = 80$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV).....87
- Figura 31** – Voltamogramas de onda quadrada do filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em 0,32 e 2,07 μ mol L⁻¹ de DA. (Parâmetros da onda: $f = 90$ Hz, $a = 80$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV).....88
- Figura 32** – Voltamogramas cíclicos do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de AA (a) e de AU (b), ambos 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹; $v = 50$ mV s⁻¹.....88
- Figura 33** – Voltamogramas de onda quadrada do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de (a) AA e AU misturados na concentração 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ e (b) DA, AU e AA misturados na concentração 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹. Parâmetros utilizados: $f = 90$ Hz, $a = 80$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.....89
- Figura 34** – Voltamogramas de onda quadrada do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de (a) AA e AU misturados na concentração 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ em diferentes pHs; e (b) DA, AU e AA misturados na concentração 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ em diferentes eletrólitos suporte (0,1 mol L⁻¹, pH = 7). Parâmetros utilizados: $f = 90$ Hz, $a = 80$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.....90
- Figura 35** – Gráfico da relação entre a corrente de oxidação e a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) na presença de 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ de DA (a) (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ (b) em 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de DA (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ e pH 7, em diferentes velocidades de varredura.....91
- Figura 36** – $I_{pa}/v^{1/2}$ em função da velocidade de varredura, obtidos com o filme LbL (a) (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (b) (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ e 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de DA, rsestivamente, em NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ e pH 7, em diferentes velocidades de varredura.....92
- Figura 37** – Correlação entre (a) I_{pa} e o número de ciclos para o filme (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ (b) I_{pa} e o número de ciclos para o filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (c) E_{pa} e o número de ciclos, obtida com o filme LbL (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (d) E_{pa} e o número de ciclos, obtida com o filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de DA, $v = 30$ mV s⁻¹.....93
- Figura 38** – Espectros Raman de (a) filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em DA, AA e AU ambos 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹; (b) filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em DA 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹; filmes *drop-coated* de (c) AU, (d) AA, (e) DA e (f) substrato de Ag (dispersão coloidal).....94
- Figura 39** – (a) Representação Nyquist (impedância imaginária x impedância real) para os eletrodos FTO, (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ e (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₁₀ na presença de 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] preparados em 0,1 mol L⁻¹ de NaNO₃, pH 7, em potencial de circuito aberto com frequência 10 KHz–100 mHz e amplitude 10 mHz. (b) Relação entre o número de bicamadas de (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n e R₂.....95
- Figura 40** – Circuito equivalente proposto para os eletrodos FTO, (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ e (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₁₀ na presença de 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] dissolvido em 0,1 mol L⁻¹ de NaNO₃, pH 7.....97

- Figura 41** – Representação Nyquist (impedância imaginária x impedância real) do filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de AA e 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] preparados em 0,1 mol L⁻¹ de NaNO₃ em diferentes pH.....**98**
- Figura 42** – Representação Nyquist (impedância imaginária x impedância real) para o filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de DA e 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆], ambos preparados em 0,1 mol L⁻¹ de NaNO₃ em diferentes pH...**99**
- Figura 43** – Representação Nyquist para os eletrodos FTO, (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆]; em 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de DA + 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆]; em 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de AA + 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆]; em 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de AU + 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆]. Ambos em 0,1 mol L⁻¹ de NaNO₃ e pH 7.....**100**
- Figura 44** – Distribuição de tamanho dos lipossomos contendo DA.....**102**
- Figura 45** – (a) Voltamograma cíclico (b) Voltamograma de Onda Quadrada do filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença do lipossomo de DPPC sem DA em NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ (pH 7). (c) Voltamograma cíclico (d) Voltamograma de onda quadrada do filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença do lipossomo de DPPC com DA encapsulada em NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ (pH 7).....**103**
- Figura 46** – Voltamogramas de onda quadrada do filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença do LIPO-DA em (a) AA, (b) AU, (c) DA, AA e AU ambos 6,25 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ (pH 7). Parâmetros utilizados: $f = 10$ Hz, $a = 70$ mV e $\Delta E_s = 1$ mV.....**104**
- Figura 47** – Voltamogramas de onda quadrada obtidos do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em amostras de estriados em NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹, pH 7.....**104**
- Figura 48** – Voltamogramas cíclicos do filme *drop-coated* (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de (a) 31 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DA e (b) 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DA. ($v = 50$ mV s⁻¹).....**107**
- Figura 49** – Voltamogramas cíclicos do filme *drop-coated* (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de diferentes concentrações de DA (a) 1 a 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (b) 1 a 1 x 10⁴ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($v = 50$ mV s⁻¹).....**107**
- Figura 50** – Voltamogramas cíclicos do filme *drop-coated* (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de DA e AA, ambos 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($v = 50$ mV s⁻¹).....**109**
- Figura 51** – Gráfico da relação entre o I_{pa} e $v^{1/2}$ na presença de DA: (b) 3,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ e (d) 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹.....**109**
- Figura 52** – Voltamogramas cíclicos dos eletrodos (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, impresso de Pt e impresso de C nas concentrações de DA: (a) 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (b) 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (c) 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($v = 50$ mV s⁻¹).....**110**
- Figura 53** – Voltamogramas cíclicos dos eletrodos impressos de Pt, e de C (sem modificação e modificados) e (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, nas concentrações de DA: (a) 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (b) 1,0 x 10³ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($v = 50$ mV s⁻¹).....**111**
- Figura 54** – Voltamogramas cíclicos do filme *drop-coated* (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em amostras de estriados (a) contendo 74 e 109,5 mg; (b) contendo 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DA e sem estriado ($v = 50$ mV s⁻¹); (c) gráficos da gaussiana dos valores integrados de I_{pa} da DA provenientes dos voltamograma cíclicos no intervalo de potencial de -0,1 a 0,25 V.....**112**

- Figura 55** – Voltamogramas cíclicos do filme *drop-coated* (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença do estriado e na presença do estriado com adição de 300 µmol L⁻¹ de DA em NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ (v = 50 mV s⁻¹).....113
- Figura 56** – (a) Voltamogramas cíclicos do filme *drop-coated* (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em diferentes concentrações de DA; (b) gráficos da gaussiana dos valores integrados de I_{pa} da DA provenientes dos voltamograma cíclicos no intervalo de potencial de -0,1 a 0,25 V; (c) curva de calibração obtida em diferentes concentrações de DA (v = 50 mV s⁻¹).....114
- Figura 57** – Voltamogramas cíclicos de (a) filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n (b) filme (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)_n; Voltamogramas de pulso diferencial de (c) filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n e (d) filme (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)_n, v = 30 mV s⁻¹115
- Figura 58** – (a) Voltamogramas cíclicos do FTO, dos filmes LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)₆ na presença de 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de DA (b) Voltamogramas de pulso diferencial dos filmes LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)₆ em 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de H₂O₂.....116
- Figura 59** – Voltamogramas cíclicos de (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ e (PPV/SiPy⁺Cl⁻)₆ LbL films na presença de [H₂O₂] = 1.0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ em 0.1 mol L⁻¹, PBS (pH 7) a 30 mVs⁻¹.....116
- Figura 60** – (a) Relação entre a I_{pa} e a raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de 1,0 . 10⁻⁴ mol L⁻¹ de H₂O₂; (b) Gráfico de I_{pa}/v^{1/2} em função de v^{1/2} do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ em H₂O₂ 1,0 . 10⁻⁴ mol L⁻¹; (c) cronoamperogramas em diferentes concentrações de H₂O₂ (intervalo da adição = 50 s).....117
- Figura 61** – Espectros de CD (a) 0,015 mg mL⁻¹ de solução de GOx em 0,1 mol L⁻¹ de PBS, pH 7; e (b) filmes LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ e (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆GOx, preparados em diferentes tempos de imersão da GOx, sobre quartzo.....119
- Figura 62** – Representação de um filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆GOx.....119
- Figura 63** – Espectros de FTIR dos filmes (a) LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃₀, (b) *drop-coated* (GOx) e (c) LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ GOx, depositados sobre silício.....120
- Figura 64** – (a) Voltamograma cíclico do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ GOx na presença de glicose 9,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹; (b) cronoamperometria do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆GOx em diferentes [glicose] (intervalo = 50 s), E = 1,06 V; (c) curva de calibração obtida na faixa de 8,7 x 10⁻⁵ a 9,8 x 10⁻⁵ mol L⁻¹; (d) Voltamogramas cíclicos do filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ GOx na presença de glicose 27,4 e 91,4 µmol L⁻¹, NaNO₃, 0,1 pH 7, v = 30 mV s⁻¹.....122
- Figura 65** – (a) Cronoamperograma do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆GOx em diferentes concentrações de glicose; (b) gráfico de dupla recíproca, ou Lineweaver-Burk.....124
- Figura 66** – Tempo de vida do biossensor (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆GOx: I_{pa} x número de dias..124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo de métodos de síntese de NPs-Pt com seus respectivos tamanhos.....	26
Tabela 2 – Pesquisas recentes sobre filmes LbL contendo NPs-M (últimos 2 anos).....	31
Tabela 3 – Comparação dos resultados obtidos com diferentes eletrodos contendo o SiPy^+Cl^- imobilizado com valores obtidos pelo método.....	35
Tabela 4 – Parâmetros experimentais da preparação dos filmes LbL nas arquiteturas $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_n$, $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$, $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS})_n$ e $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$	53
Tabela 5 – Número de onda, grupos e modos vibracionais dos precursores PVS, SiPy^+Cl^- , e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ presentes nos filmes sobre o substrato de silício.....	68
Tabela 6 – Bandas observadas nos espectros Raman dos filmes <i>drop-coated</i> de SiPy^+Cl^- , $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ e PPV-SO_3 e do filme LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$	73
Tabela 7 – Rugosidade média (RMS) do substrato FTO e dos filmes LbL $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ contendo 5, 12, 20 e 30 bicamadas e do filme LbL $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS})_5$	74
Tabela 8 – Rugosidade média dos grãos (nm) da superfície do FTO, dos filmes LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ contendo 5, 10, 15 e 20 bicamadas e do filme LbL $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_5$	75
Tabela 9 – Valores de LD e ΔE obtidos entre DA e AA para diferentes eletrodos.....	81
Tabela 10 – Valores de LD, LQ e ΔE obtidos entre DA, AU e AA para os filmes contendo as arquiteturas $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ e $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$	90
Tabela 11 – Bandas de espalhamento Raman com suas respectivas atribuições obtidas dos espectros após a ciclagem dos filmes LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ em DA, AA e AU ambos $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; filme LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ em DA $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; filmes <i>drop-coated</i> de AU, AA, DA e substrato de Ag. (dispersão coloidal).....	94
Tabela 12 – Resistência de transferência de carga e capacitância calculados utilizando o programa ZView a partir dos semicírculos obtidos com os eletrodos FTO, $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$, $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6$ e $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{10}$ na presença de 5 mmol L^{-1} de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ dissolvidos em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_3 , pH 7.....	96
Tabela 13 – R2 e C1 calculados a partir dos diagramas de Nyquist com o programa ZView.....	98
Tabela 14 – R2 e C1 calculados a partir dos diagramas de Nyquist com o programa ZView.....	100
Tabela 15 – R2 e C1 calculados a partir dos diagramas de Nyquist utilizando o programa ZView.....	101
Tabela 16 – Número de onda, grupos e modos vibracionais dos precursores PPV-SO_3 , SiPy^+Cl^- , e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ e GOx presentes nos filmes <i>drop-coated</i> (GOx), filme LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$ e filme LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6\text{GOx}$ sobre o substrato de silício.....	121
Tabela 17 – Valores de limite de detecção, sensibilidade e da k_m^{app} obtidas com o biossensor $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6\text{GOx}$ e outros relatados na literatura.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido ascórbico

AU – Ácido úrico

ABT – Ascorbato

AFM – Microscopia de força atômica

CuTsPc – Ftalocianina tetrassulfonada de Cobre

CD – Dicroísmo circular

DA – Dopamina

DLS – Espalhamento dinâmico da luz.

DPPC – Dipalmitoil fosfatidilcolina

Epa – Potencial de pico anódico

Epc – Potencial de pico catódico

ENH – Eletrodo de referência normal de hidrogênio

FTIR – Espectroscopia na Região do Infravermelho com transformada de Fourier

FTO – Vidro recoberto com óxido de estanho dopado com flúor

GOx – Enzima glicose oxidase

Ipa – Corrente de pico anódico

Ipc – Corrente de pico catódico

ITO – Vidro recoberto óxido de estanho dopado com índio

k_m^{app} – Constante aparente de Michaelis e Menten

LB – Langmuir-Blodgett

LbL – Layer-by-Layer

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de Quantificação

LUV – Lipossomos unilamelares

MWCNT – Nanotubo de carbono de paredes múltiplas

MET – Microscopia Eletrônica de transmissão

MLV – Lipossomos multilamelares

n – Número de bicamadas

NP – Nanopartícula

NPs – Nanopartículas

NPs-M – Nanopartículas metálicas

PAH – Cloreto de polialilamina

PAMAM – Dendrímero poliamidoamina

PANI – polianilina

PBS – Solução tampão fosfato salino

Pc – Ftalocianina

PVS – Ácido polivinil sulfônico

PPV – Poli (fenilenovinileno)

PPV-SO₃ – poli-2,5-metoxipropiloxi-sulfonado-fenilenovinileno

SiPy⁺Cl⁻ – Cloreto de 3-*n*-propilpiridínio silsesquioxano

Pt-SiPy⁺Cl⁻ – nanohíbrido formado por nanopartículas de Pt e cloreto de 3- *n*-propilpiridínio silsesquioxano

VC – Voltametria Cíclica

VPD – Voltametria de Pulso Diferencial

VOQ – Voltametria de Onda Quadrada

URT: Urato

UV-Vis – Espectroscopia na região do ultravioleta visível

SUMÁRIO

Capítulo 1. INTRODUÇÃO.....	17
Capítulo 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 O efeito das nanopartículas (NPs) em materiais nanoestruturados.....	19
2.1.1 Síntese de nanopartículas metálicas.....	21
2.2 Filmes nanoestruturados contendo nanopartículas.....	26
2.2.1 Filmes <i>LbL</i> contendo nanopartículas.....	30
2.3 Propriedades do cloreto de 3-n-propil-piridínio-silsesquioxano.....	32
2.4 Recentes avanços sobre os analitos Dopamina e Peróxido de Hidrogênio.....	37
2.4.1 A dopamina e o desenvolvimento de sensores eletroquímicos.....	37
2.4.1.1 Lipossomos em sistemas biomiméticos e encapsulação de DA.....	40
2.4.1.2 Lipossomos imobilizados em filmes <i>LbL</i>	44
2.4.2 Filmes <i>LbL</i> como sensores na detecção de peróxido de hidrogênio.....	45
2.4.2.1 Filmes <i>LbL</i> como biossensores enzimáticos na detecção de Glicose.....	46
Capítulo 3. OBJETIVOS.....	50
Capítulo 4 . EXPERIMENTAL.....	51
4.1 Procedências dos reagentes e substratos utilizados.....	51
4.2 Síntese e preparo das soluções.....	51
4.2.1 Síntese das nanopartículas de platina no SiPy^+Cl^-	51
4.2.2 Preparação da solução da enzima GOx e analitos.....	52
4.3 Procedimentos de limpeza e preparação dos filmes.....	52
4.3.1 Limpeza dos filmes <i>LbL</i>	52
4.3.2 Preparação dos filmes <i>LbL</i>	52
4.3.3 Preparação dos filmes <i>drop-coated</i>	53
4.3.4 Imobilização da enzima GOx nos filmes.....	53
4.4 Preparação dos lipossomos L-DA.....	53
4.5 Preparação das amostras de estriados cerebrais de ratos.....	54
4.6 Caracterização dos filmes finos.....	55
4.6.1 Espectroscopia de Absorção na região do UV-Vis.....	55
4.6.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR).....	56

4.6.3 Espectroscopia de espalhamento Raman.....	56
4.6.5 Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	57
4.6.6 Potencial Zeta (ζ).....	58
4.6.7 Microscopia de força atômica (AFM).....	58
4.6.8 Dicroísmo circular (CD).....	59
4.7 Medidas eletroquímicas.....	60
Capítulo 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	62
5.1 Síntese das nanopartículas de platina no SiPy^+Cl^-	62
5.2 Preparação e caracterização dos filmes LbL contendo as arquiteturas $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$, $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS})_n$, $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_n$	64
5.3 Caracterização eletroquímica dos filmes $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$, $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS})_n$, $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_n$	76
5.3.1 Detecção eletroquímica de DA com os filmes de PVS e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$	76
5.3.2 Detecção eletroquímica de DA com os filmes LbL de PPV-SO_3 e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$	83
5.3.3 Estudo comparativo entre os filmes $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ e $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$	90
5.4 Caracterização do filme $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ por Raman após eletroquímica.....	93
5.5 Espectroscopia de impedância eletroquímica dos filmes $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$	95
5.5.1 Estudo com diferentes bicamadas de $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$	95
5.5.2 Impedância do filme $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ em $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ na presença de DA, AU e AA em diferentes pHs.....	98
5.6 Detecção de DA encapsulada em lipossomos com o filme LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$	101
5.7 Detecção de DA em estriado cerebral de ratos com o filme LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ e <i>drop-coated</i> de $(\text{C}/\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$	105
5.8 Detecção de H_2O_2 com filmes LbL de PPV-SO_3 e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$	114
5.9 Preparação, caracterização e aplicação do biossensor $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6$ GOx.....	118
Capítulo 6. CONCLUSÕES.....	126
Capítulo 7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	129
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130

Capítulo 1. INTRODUÇÃO

Com o avanço tecnológico, o interesse pela combinação de materiais orgânicos e inorgânicos para melhorar propriedades, ou até mesmo obter novas propriedades únicas e diferenciadas, tem sido o objeto de estudo de muitos pesquisadores¹. Diante desta perspectiva, os materiais híbridos organo-inorgânicos à base de sílica, como os silsesquioxanos, vêm de encontro a este interesse, pois apresentam diversas aplicações como carreadores de fármacos², dispositivos ópticos³, materiais adsorventes⁴, catalisadores⁵ e dispositivos eletroquímicos⁶.

Dentre os silsesquioxanos, diversos estudos têm sido realizados para investigação das propriedades do polímero cloreto de 3-n-propil-piridínio-silsesquioxano (SiPy^+Cl^-) preparado por Gushikem *et al*⁷ (Patente: BR9803053-A), na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Dentre estas propriedades estão alta capacidade de troca aniônica⁸, boa estabilidade química¹, alta solubilidade em água⁹ e capacidade de formar filmes em diversos substratos^{10,11}.

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa de desenvolvimento de eletrodos modificados, (GDEM) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), têm investigado as propriedades do polímero SiPy^+Cl^- imobilizado em filmes finos nanoestruturados preparado pela técnica *Layer-by-Layer* (LbL). Estes filmes têm sido aplicados como sensores eletroquímicos de substâncias diversas como ácido ascórbico (AA)^{9,12,13}, dopamina (DA)^{9,12} ácido úrico (AU)¹³, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), glicose, hormônios, prometazina¹⁴ e outros. Nas diferentes arquiteturas investigadas o polímero SiPy^+Cl^- tem se mostrado um excelente polieletrólito catiônico adsorvendo na superfície de diferentes materiais.

Paralelamente a estes estudos, a combinação da estrutura química do polímero SiPy^+Cl^- com sais metálicos, tem gerado novas possibilidades de obtenção de materiais híbridos nanoparticulados. A existência de cavidades intramoleculares no SiPy^+Cl^- faz com que este polímero sirva de molde para a formação e estabilização de nanopartícula metálicas (NPs-M)^{12,15}.

A imobilização destas NPs-M pela técnica LbL, tem se destacado por possibilitar o desenvolvimento de filmes ultrafinos e organizados em nível nanométrico em diferentes tipos de materiais, com simplicidade experimental e baixo custo^{16,17}. Para aplicação dos filmes

LbL como sensores e biossensores eletroquímicos, a imobilização de NPs-M é fator crucial para melhorar a transferência de elétrons onde estes filmes são aplicados como sensores eletroquímicos¹⁸.

Dentre as substâncias de interesse para investigação por eletrodos modificados está a DA que atua em funções cerebrais com atividade estimulante do sistema nervoso central¹⁹. O interesse por sua determinação se deve ao fato de que desníveis na concentração deste neurotransmissor estão associados a doenças como o Mal de Parkinson e a Esquizofrenia²⁰. A possibilidade de obtenção de um dispositivo nanostruturado capaz de monitorar a concentração de DA em amostra biológica real é um dos fatores que levou ao desenvolvimento deste Doutorado.

Outra substância de interesse detecção é o H_2O_2 um forte agente oxidante amplamente utilizado nas indústrias químicas e de alimentos²¹. Este oxidante é considerado um mediador essencial na indústria farmacêutica, alimentar, análise ambiental e clínica²². Além disso, o H_2O_2 é produzido durante alguns processos químicos e enzimáticos^{18,23}. A sua detecção pode ser utilizada como um indicador do progresso de tais processos.

Neste sentido, um dos fatores que impulsionou o desenvolvimento desta tese foi a exploração da propriedade do $SiPy^+Cl^-$ como um eficiente estabilizante para síntese de NPs-Pt e a imobilização do híbrido gerado ($Pt-SiPy^+Cl^-$) combinado com outros materiais em filmes LbL. Dentre estes, o ácido polivinil sulfônico (PVS) e poli-2,5-metoxipropiloxi-sulfonado-fenilenovinileno (PPV-SO₃), que juntamente com o híbrido $Pt-SiPy^+Cl^-$ foram utilizados como modificadores de eletrodos aplicados como sensores eletroquímicos de DA e H_2O_2 .

Esta tese está dividida em 7 capítulos, sendo este o capítulo 1, contendo a introdução, e no capítulo 2 é feita uma revisão bibliográfica contendo os principais tópicos estudados, visando que os leitores tenham subsídio para analisar criticamente os resultados. O capítulo 3 mostra os objetivos gerais da tese, e no capítulo 4 estão dispostas as etapas realizadas no procedimento experimental. Os resultados são abordados no capítulo 5 com discussões relacionadas à síntese e caracterização das NPs-Pt, preparação e caracterização de filmes *drop-coated* e LbL, preparação de lipossomos, aplicação dos filmes como sensores e biossensores eletroquímicos para detecção de DA, H_2O_2 e glicose. As conclusões são mostradas no capítulo 6 e as perspectivas de trabalhos futuros complementares aos desta tese, são listados no capítulo 7.

Capítulo 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O efeito das nanopartículas (NPs) em materiais nanoestruturados

A manipulação de propriedades existentes nos materiais quando estes são reduzidos à nanoescala tem sido o grande desafio da nanociência nos últimos anos. O desenvolvimento de nanomateriais que apresentam um tamanho médio entre 1 a 1000 nm^{24,25}, tem despertado grande interesse para a nova realidade tecnológica. Um dos motivos que impulsiona este interesse é que na nanoescala os materiais manifestam propriedades dependentes desta dimensão e inexistentes em escalas maiores^{26,27}. Propriedades estas que têm sido exploradas em diversas áreas, tais como medicina^{28,29}, eletrônica^{30,31}, eletrocatalise^{32,33}, sistemas computacionais^{34,35}, geração de energia³⁶ e sistemas sensoriais^{37,38}.

Dentre os nanomateriais investigados nos últimos anos se encontram as nanopartículas metálicas (NPs-M)³⁹, nanopartículas de semicondutores⁴⁰, nanotubos de carbono (NTC)⁴¹ e filmes nanoestruturados⁴². A dimensão reduzida potencializa as interações na matéria proporcionando efeitos quânticos que explicam as propriedades exclusivas nesta escala²⁷. Muitas destas propriedades estão diretamente relacionadas com os efeitos eletrônicos estruturais, que surgem devido à substituição da estrutura eletrônica normal, por uma série de níveis eletrônicos discretos²⁷. Além disso, surgem efeitos provocados pelo aumento na área superficial, especialmente em catálises heterogêneas⁴³ e sistemas sensoriais⁴⁴.

As propriedades relacionadas com o aumento na área superficial das nanopartículas (NPs) têm contribuído em diversos setores, principalmente no desenvolvimento de sensores eletroquímicos⁴⁵, cujos dispositivos são capazes de fornecer informações referentes ao meio em que estão inseridos através das propriedades redox do sistema⁴⁶. Nos processos eletroquímicos, a presença de nanoestruturas em sensores melhora significativamente algumas propriedades, como o aumento na velocidade do transporte de massa, aumento na atividade catalítica, aumento na seletividade e sensibilidade, melhora na relação sinal/ruído e a possibilidade de geração de materiais com exposição de planos cristalinos não observados nos materiais convencionais^{45,47}. Além disso, devido a menor quantidade de material há uma diminuição nos custos de preparação destes sensores²⁷.

A melhora das propriedades dos sensores eletroquímicos contendo NPs é explicada pelo fato destes nanomateriais atuarem como se fossem eletrodos discretos, também

denominados de nanoeletrodos, onde o resultado final é obtido pela somatória do processo redox de cada NP⁴⁸. Pesquisas descritas na literatura têm demonstrado que a presença de NPs intensifica as propriedades sensoriais do eletrodo, tal como a atividade eletrocatalítica. Este efeito foi observado no trabalho de Masa *et al.*⁴⁹ quando compararam a atividade eletrocatalítica do processo de redução do oxigênio na platina *bulk* e nas nanopartículas de platina (NPs-Pt) imobilizadas no compósito formado por NTC e TiO₂ mesoporoso dopado com nitrogênio. O nanompósito Pt/N-TiO₂-CNT, exibiu maior estabilidade no sinal de corrente e resistência à corrosão do TiO₂ em relação à platina *bulk* suspensa em negro de fumo ou em NTC dopado com nitrogênio, devido às interações fortes entre o TiO₂ e as NPs-Pt, as quais possuem maior área superficial que a platina *bulk*. Zhou *et al.*⁵⁰ também mostraram que as NPs-Pt com aproximadamente 1,85 nm estabilizadas no polímero clorofenil foram responsáveis por aumentar cerca de três vezes a atividade eletrocatalítica da redução de oxigênio em relação aos catalisadores comerciais de Pt *bulk* suspensos em carbono.

Além das propriedades relacionadas ao aumento na superfície ativa das NPs, as propriedades óticas, eletrônicas e mecânicas verificadas quando um material atinge a nanoescala, também têm impulsionado o desenvolvimento de nanomateriais. Por exemplo, muitos materiais semicondutores podem se tornar isolantes na nanoescala. Isto ocorre devido ao fato das nanopartículas apresentarem um *band gap* não existente no sólido *bulk*⁵¹. Quanto menor o tamanho das NPs maior o deslocamento da excitação eletrônica para menores comprimentos de onda, pois nestas o valor do *band gap* é maior devido à reestruturação dos níveis energéticos.

As propriedades eletrônicas e óticas dos nanomateriais contendo NPs estão relacionadas ao efeito de confinamento quântico. Este fenômeno pode ser entendido com uma aproximação ao “modelo da partícula na caixa”, onde o tamanho da caixa é dado pelas dimensões das NPs⁵². Em função disto, as NPs-M podem exibir mudanças de cores relacionadas à ressonância dos plasmons, que ocorre devido às oscilações dos elétrons de condução, em ressonância com a luz incidente. Nos estudos de He *et al.*⁵³, foi constatada uma dependência na absorbância na radiação UV-Vis de nanopartículas de ouro (NPs-Au) com diferentes diâmetros. Os autores observaram que as NPs-Au de diâmetro entre 12 e 41 nm apresentaram bandas de absorção máxima em 520-530 nm e com aumento do tamanho destas, há um deslocamento gradual para comprimentos de onda maiores.

O interesse no controle sobre a morfologia das NPs se deve aos efeitos proporcionados por pequenas modificações no tamanho e nas formas das NPs, os quais influenciam nas

propriedades físicas e na reatividade destes materiais⁵⁴. As propriedades que surgem na nanoescala estão relacionadas à menor quantidade de átomos de superfície, sendo que estes átomos superficiais apresentam um menor número de coordenação do que os observados no sólido *bulk*. Além disso, alguns números de coordenação dos átomos superficiais nanométricos são incompletos, fazendo com que os átomos superficiais sejam menos estáveis termodinamicamente. A elevada energia superficial faz com que os átomos sejam mais suscetíveis a formar ligações em busca de estabilidade e consequentemente tendem a se agregar^{55,56}. Isto ocorre, pois a formação do material *bulk* fornece energia que favorece o crescimento da partícula, sendo que a retirada desta energia de ativação (pela diminuição da temperatura do sistema, por exemplo) resulta num crescimento “interrompido” e desta forma, permite o controle cinético do tamanho da partícula⁵⁷.

Visando impedir a aglomeração das NPs promovida pela alta energia de superfície, o desafio atual consiste na preparação de nanomateriais estáveis e monodispersos com relação ao tamanho e forma, que possam ser manipulados sem agregação e imobilizados em substratos sem que haja alterações nas suas propriedades⁵⁸. Neste sentido, o objeto de estudo de diversas pesquisas tem sido a investigação acerca de novos métodos de síntese que proporcionem nanoestruturas estáveis.

2.1.1 Síntese de nanopartículas metálicas

As NPs-M podem ser sintetizadas por métodos que se dividem em físicos e químicos⁵⁹. Os métodos físicos são conhecidos como *top down*, e são responsáveis pela formação de NPs que vão da escala macro para micro pela quebra de partículas maiores a tamanhos nanométricos⁵⁹. Os métodos químicos também são conhecidos como *bottom up* e se baseiam nas reações químicas utilizando precursores moleculares ou atômicos. Estes permitem um maior controle sobre as características das NPs desejadas além de apresentar uma maior simplicidade e eficácia⁵⁷.

Os diferentes métodos químicos de síntese de NPs-M envolvem a utilização de agentes redutores, como o citrato de sódio, boridreto de sódio, ácido fórmico, hidrazinas e álcoois saturados e insaturados. A temperatura, pH do meio reacional e dispersão das espécies de interesse são parâmetros importantes para manter o controle do tamanho das NPs-M⁵⁴.

Para formação de sistemas monodispersos, que possui NPs com tamanhos próximos, é importante que o crescimento das NPs seja interrompido na fase de nucleação. O processo de

amadurecimento de Ostwald explica a síntese de NPs, onde numa reação de precipitação, em condições de supersaturação e baixa solubilidade, após a nucleação ocorre o aumento no tamanho dos núcleos ocasionados por processos secundários de aglomeração sobre estes núcleos formados⁶⁰.

Neste sentido, com intuito de interromper o crescimento dos núcleos formados, diversos métodos de síntese de NPs têm sido investigados. Dentre estes, muitos estudam a adição de agentes passivantes cuja função consiste em evitar a coalescências das NPs. A camada passivadora se liga à superfície das NPs-M evitando a condensação de novas espécies com o núcleo, evitando desta forma o crescimento do material.

Diversas substâncias têm sido utilizadas como passivantes, dentre elas os polímeros⁶¹, surfactantes⁶² e moléculas orgânicas com grupos $-OH$ ⁶³, $-SH$ ⁶⁴ e $-NH$ ⁶⁵. A passivação das NPs pode ser dada pela estabilização por cargas, onde há repulsão entre as superfícies carregadas das NPs ou pela adição de um agente químico à superfície das NPs, que tem a função de proteger e evitar a coalescência entre os núcleos formados⁶⁶. Muitas áreas podem se beneficiar da utilização de NPs-M passivadas dentre estas áreas as que envolvem sistemas sensoriais⁶⁷ e a medicina⁶⁸.

A vantagem da utilização de passivantes na formação de NPs-M se deve ao fato dos colóides passivados serem estáveis em solução, podem ser precipitados, filtrados, secos e redissolvidos sem perder suas propriedades. Além disso, a camada passivadora influencia nas características individuais como a solubilidade, o tamanho, a estrutura e a distribuição espacial, após a secagem do solvente⁶⁹. Vários trabalhos relatam a utilização de tióis como passivantes, principalmente na formação de NPs-M. Os tióis são moléculas que contém grupamentos hidrofóbicos e hidrofílicos e sua presença na superfície das NPs-M favorecem a solubilidade em diferentes solventes orgânicos, e conseqüentemente aumenta as possibilidades de aplicação como passivantes de NPs⁶⁷.

Brust *et al.*⁷⁰, desenvolveram uma rota sintética de NPs-Au provenientes do precursor $HAuCl_4$. Estas NPs foram passivadas com dodecanotiol em um sistema de duas fases líquido-líquido. Simplificadamente, este método consiste em transferir o íon $AuCl_4^-$ para o tolueno usando como agente de transferência o dodecanotiol. Após a adição de $NaBH_4$, em poucos segundos, a fase orgânica muda de cor laranja para marrom evidenciando a formação de NPs-Au.

Tendo em vista a eficiência no método de síntese de NPs-Au por Brust *et al.*⁷⁰ muitos estudos têm sido realizados para otimizar os parâmetros de síntese de outras NPs-M, tais

como de Pt e Ag. Neste sentido, Oliveira *et al.*⁷¹ estabilizaram as nanopartículas de prata (NPs-Ag) em dodecanotiol baseado no método de síntese de Brust *et al.*⁷⁰ Neste estudo, alguns parâmetros experimentais de síntese, como a ordem e velocidade de adição dos reagentes foram avaliados. Observou-se que pequenas variações levaram às significativas alterações nas características finais das NPs-Ag, como o tamanho, estrutura, estabilidade e auto-organização, de modo que amostras mais estáveis e com menor distribuição de tamanho médio (3,8 nm) foram obtidas para as NPs-Ag esféricas com adição rápida do agente redutor ao meio reacional. Verificou-se que estas NPs-Ag tendem a formar supercristais auto-organizados em 2 e 3 dimensões e com maior estabilidade.

Nanopartículas de platina também foram obtidas pela modificação da rota de Brust⁷⁰. Um exemplo disto é o trabalho de Castro *et al.*⁷² que sintetizaram as NPs-Pt a partir do H_2PtCl_6 e as estabilizaram com dodecanotiol, monitorando o tempo de adição do passivante para o controle do tamanho das NPs-Pt (1,7; 2,2 e 2,4 nm). Os autores também observaram que as NPs foram responsáveis pela intensificação do sinal de corrente de oxidação do metanol nos estudos eletroquímicos em células a combustível.

Yang *et al.*⁷³ utilizaram dois agentes estabilizantes (alquilamina e alcanotiol) durante a síntese de NPs-Pt e constataram que a afinidade pelo tiol aumenta com o tamanho das NPs-Pt, enquanto que a afinidade pela alquilamina aumenta com a diminuição das NPs-Pt. Por isso, as partículas menores exibiram maior atividade catalítica na oxidação do metanol quando estabilizadas em alcanotiol, enquanto que as NPs maiores apresentaram maior eficiência na oxidação do metanol quando estabilizadas pela alquilamina. Além disso, verificou-se que quanto mais intensa a ligação entre as NPs-Pt e o estabilizante, menor era a atividade catalítica apresentada pelas NPs-Pt.

Outra forma de obtenção de NPs-M é através da rota metalorgânica que consiste na redução de íons metálicos provenientes de precursores metalorgânicos. Por exemplo, Hou *et al.*⁷⁴, sintetizaram nanopartículas de níquel (NPs-Ni) a partir do acetilacetato de níquel como precursor e o NaBH_4 como redutor, na presença de hexadecilamina e óxido de trioctilfosfina. O tamanho das NPs-Ni variou de 3 a 11 nm e essa variação de tamanho se mostrou dependente da razão hexadecilamina/óxido de trioctilfosfina utilizada.

Um método relativamente simples para sintetizar NPs consiste na utilização de microemulsões de surfactante e água, pois fornecem um meio isotrópico e termodinamicamente estável para a síntese das NPs⁷⁵. Chen e Wu⁷⁶ sintetizaram NPs-Ni utilizando NiCl_2 como precursor e hidrazina como agente redutor em uma microemulsão de

água e brometo de acetiltrimetilamônio com *n*-hexano e obtiveram NPs bem dispersas devido a estabilidade da microemulsão.

Um método bastante versátil para síntese de NPs é o método poliol. Este método descrito por Fièvet *et al.*⁷⁷, o qual consiste na redução de íons metálicos em meio alcoólico. Geralmente é utilizado um poliálcool como o etileno glicol, que atua simultaneamente como solvente, passivante, agente redutor e meio para o crescimento das NPs⁷⁸. Primeiramente ocorre a dissolução do precursor metálico no poliálcool, seguido da redução do metal em solução e das etapas de nucleação e crescimento⁷⁹. As vantagens deste método são: (i) a alta solubilidade dos sais inorgânicos precursores nos polióis; (ii) as etapas de nucleação e crescimento normalmente ocorrem no ponto de ebulição do poliálcool; (iii) o aumento na temperatura produz materiais com alta cristalinidade; (iv) a passivação ocorre no mesmo instante que os processos de nucleação e crescimento prevenindo a coalescência descontrolada das partículas; e (v) os polióis são facilmente removidos da superfície das partículas⁷⁷.

O método poliol apresenta um grande número de variáveis de síntese, tais como a temperatura⁸⁰, a adição de agente redutor⁸¹, adição de agente passivante⁸² e adição de água no meio reacional⁸³, o que possibilita a obtenção de NPs de diversos materiais.

Silvert e Elhsissen⁸⁰ investigaram a influência da temperatura na síntese de NPs-Au pelo método poliol. Os autores variaram a temperatura de 100 a 196 °C e perceberam que em temperaturas menores as etapas de nucleação e crescimento ocorrem concomitantemente, levando à formação de partículas grandes polidispersas e polimórficas. O aumento da temperatura faz com que a nucleação e crescimento ocorram separadamente, levando à formação de NPs menores. Wu *et al.*⁸¹ prepararam NPs-Ni monodispersas de 9,2 nm, utilizando hidrazina como agente redutor extra. Os autores notaram que o tamanho das NPs é dependente da relação entre a quantidade de precursor metálico e agente redutor. Silvert *et al.*⁸² prepararam NPs-Au utilizando o polímero poli(vinil)pirrolidona (PVP), como passivante e verificaram uma dependência no tamanho das NPs-Au com a quantidade de polímero e determinaram uma quantidade mínima de PVP necessária para passivar as NPs-Au. Jungk *et al.*⁸³ sintetizaram óxido de bismuto de 70-90 nm de diâmetro. Os autores verificaram a dependência no tamanho das NPs com a quantidade de água acrescentada ao meio reacional.

Herricks *et al.*⁸⁴ investigaram o controle morfológico das NPs-Pt variando a quantidade de NaNO₃ adicionado no processo poliol onde H₂PtCl₆ foi reduzido pelo etileno glicol formando PtCl₄²⁻ e Pt⁰ a 160°. Os autores verificaram que o aumento na razão molar

entre o NaNO_3 e o H_2PtCl_6 de 0 para 11, proporcionou mudanças na morfologia das NPs-Pt que passaram de esferóides irregulares com perfis arredondados para tetraedros e octaedros com faces bem definidas.

Muitos estudos têm sido realizados acerca da síntese de NPs-M em dendrímeros. Estes são macromoléculas monodispersas, altamente ramificadas, com estrutura química bem definida e versatilidade química⁸⁵. Dentre estes dendrímeros estão as moléculas de poliamidoamina (PAMAM) contendo um núcleo de etilenodiamina e o PAMAM geração 4 (G4) com quatro unidades de poliamidas ligadas ao núcleo de etilenodiamina⁸⁶. Estes dendrímeros possuem cavidades intramoleculares que possibilitam a utilização destes como nanoreatores para síntese de NPs, uma vez que possibilitam a formação de NPs monodispersas⁸⁶. Este método de síntese se inicia pela mistura da solução de dendrímero com o precursor das NPs-M, que geralmente é um sal ou ácido metálico onde é acrescentado ao meio um agente redutor como o ácido fórmico^{87,17}. Parâmetros como luminosidade, agitação e tempo reacional devem ser controlados.

Desde os primeiros estudos realizados por Crooks *et al.*^{88,89,90} sobre as sínteses de NPs-M de Pd, Fe e Au nas cavidades de dendrímeros, várias pesquisas têm sido realizadas envolvendo a utilização de dendrímeros como *templates* para formação de outras NPs-M, tais como Ag⁹¹, Au⁸⁷ e Pt¹⁷.

Crespilho *et al.*⁸⁷ sintetizaram NPs-Au nas cavidades do PAMAM G-4 utilizando como precursor o sal metálico KAuCl_4 e como redutor o ácido fórmico. A evidência da formação de NPs se deu pela alteração na cor da solução que passou de amarela para vermelha. A formação de NPs-Au foi comprovada pelo desaparecimento da banda em 300 nm dos íons Au^{3+} e o surgimento da banda plasmônica das NPs-Au em 500 nm no espectro de UV-Vis. Por imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) constatou-se a formação de NPs-Au monodispersas e bem distribuídas no PAMAM com um tamanho médio de 3 nm.

He *et al.*⁹² são pioneiros na utilização de PAMAM contendo NPs-M em filmes automontados. Os autores prepararam filmes automontados em diferentes substratos utilizando poliestireno sulfonado como poliânion e um híbrido de PAMAM-Au como polication, devido às cargas positivas provenientes da protonação dos grupos amins destes dendrímeros. As NPs-Au apresentaram um tamanho médio entre 5-20 nm de diâmetro. No entanto os autores não investigaram a transferência de carga promovida pelas NPs presentes nos filmes como foi evidenciado em trabalhos mais recentes. Por exemplo, no estudo

realizado por Crespilho *et al.*⁸⁷, foi constatado que o transporte de carga entre as camadas do filme automontado com PVS e PAMAM-Au ocorre por salto de elétrons (*electron hopping*) entre as NPs-Au monodispersas presentes no PAMAM automontado, até a superfície do filme.

Um método de síntese de NPs-M semelhante ao descrito utilizando dendrímeros como estabilizantes, tem sido desenvolvido em nosso grupo de pesquisa. Este método consiste na incorporação de NPs-M numa matriz de silsesquioxano, e é uma das motivações que impulsionou o desenvolvimento desta tese.

Dentre os estudos realizados em nosso grupo de pesquisa está a incorporação de NPs-Pt nas cavidades internas do polímero SiPy^+Cl^- para formação do nanohíbrido $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$. Recentes publicações mostram a aplicação deste nanohíbrido como policátion na preparação de filmes nanoestruturados pela técnica (LbL)^{12,13}. Estes estudos serão melhores descritos nos resultados e discussões desta tese.

Na Tabela 1 é apresentado um resumo de alguns métodos de síntese de NPs-Pt com os respectivos tamanhos obtidos.

Tabela 1 - Resumo de métodos de síntese de NPs-Pt com seus respectivos tamanhos.

Método de síntese	NPs-Pt (nm)	Ref.
<i>Incorporação em PAMAM utilizando o H_2PtCl_6 como precursor</i>	3	87
<i>Incorporação em SiPy^+Cl^- utilizando o H_2PtCl_6 como precursor</i>	3 - 30	12
<i>Eletrodeposição em NTC com ACS*</i>	10 - 15	93
<i>Suportadas em carbono mesoporoso a partir do H_2PtCl_6. 6 H_2O</i>	4 - 5	94
<i>Suportadas em NTC sulfonados sobre carbono vítreo</i>	2,25	95
<i>Método Poliol com etileno glicol a partir do H_2PtCl_6. 6 H_2O</i>	1-6	96
<i>Deposítadas em negro de fumo e Al_2O_3 pelo método Poliol</i>	1,7 - 3,8	97
<i>Estabilizada em 1-dodecanotiol e dodecilamina</i>	5,3 - 12	73
<i>Deposição em filmes finos de Al_2O_3 amorfo</i>	0,5 - 2	98

* ACS (sílica recoberta com alumina)

2.2 Filmes nanoestruturados contendo nanopartículas

Um dos fatores relevantes para o desenvolvimento de dispositivos nanoestruturados baseados em NPs-M tem sido a utilização de métodos que possibilitem a preparação destes com controle em nível molecular. Para isso, uma das etapas importantes consiste na

imobilização dos nanomateriais sem prejudicar o caráter nano e impedindo a aglomeração das NPs^{16,27}. Neste sentido, as técnicas de preparação de filmes nanoestruturados têm demonstrado ser uma ferramenta importante no desenvolvimento destes dispositivos em inúmeras pesquisas.

Uma das vantagens da utilização de filmes finos é o baixo custo decorrente da pequena quantidade de material utilizado durante a preparação²⁷. Além disso, quando estes são utilizados na construção de sensores e biossensores, eles possibilitam a detecção de traços de espécies eletroativas¹⁸. Outra vantagem é a imensa quantidade de compostos que podem ser utilizados na construção destas estruturas possibilitando a obtenção de diversas arquiteturas miniaturizadas⁹⁹. Diversas técnicas têm sido empregadas para a construção de filmes ultrafinos contendo NPs-M, tais como a *drop-coating*¹⁰⁰, *spin-coating*¹⁰¹, *dip-coating*¹⁰², *spin-coating-electrostatic assembled* (SCESA)¹⁰³ *Langmuir-Blodgett* (LB)¹⁰⁴ e *Layer-by-Layer* (LbL)^{17,105}.

A imobilização de NPs-M na forma de filmes finos pode proporcionar extraordinárias propriedades físicas e eletrônicas em termos de transferência de elétrons decorrente ao aumento na área superficial¹⁶. Além disso, as NPs podem servir como suportes para imobilização de biomateriais intensificando a transferência eletrônica em filmes finos aplicados como biossensores¹⁸. No entanto, embora as diferentes técnicas de preparação de filmes finos tenham se apresentado como uma excelente estratégia para imobilização de NPs, o efetivo controle na espessura destes filmes tem se mostrado um fator crucial em diversas pesquisas^{9,16,99}.

A preparação de filmes *drop-coated* consiste basicamente em gotejar a solução contendo a substância de interesse sobre a superfície de um substrato sólido e aguardar a total evaporação do solvente. Após evaporação do solvente, um filme fino é formado sobre a superfície do substrato. A espessura do filme pode ser controlada por mudanças na concentração da solução. Além disso, a evaporação do solvente pode ser acelerada por aquecimento ou pela diminuição na pressão utilizando uma bomba a vácuo¹⁰⁶. Esta técnica representa um método fácil e rápido para modificação de eletrodos utilizados como sensores eletroquímicos.

A utilização da técnica de *drop-coating* para a incorporação de NPs-M foi estendida por Zhang *et al.*¹⁰⁷, com a dispersão de NPs-Pt e NPs-Au sobre a superfície de carbono vítreo. Este sensor foi aplicado na oxidação de monóxido de carbono e metanol e a partir dos resultados obtidos foi demonstrado que as melhores respostas eletroquímicas foram obtidas

com o sensor contendo as NPs em relação ao eletrodo de platina *bulk*, devido à intensificação no sinal de corrente de oxidação proporcionada pelo aumento do número de sítios ativos no filme.

Outra técnica bastante empregada em função de sua versatilidade é a *dip-coating*. Os filmes *dip-coated* são obtidos pela imersão de um substrato sólido na solução contendo a substância de interesse por um determinado tempo. Após emersão do substrato e evaporação do solvente, o filme é formado sobre a superfície do substrato. A espessura do filme é dependente da concentração da solução e do tempo de imersão¹⁰². Esta técnica *dip-coating* também foi utilizada para imobilização das NPs-Au e NPs-Pt¹⁰². Neste trabalho imobilizou-se uma suspensão de nanotubo de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) e Nafion (NF) sobre as matrizes de carbono vítreo (GC), ITO e ouro, obtendo a arquitetura *f*-MWCNTs–NF. Sobre estes filmes (*f*), as NPs-Pt e NPs-Au, provenientes da mistura de soluções de K_2PtCl_6 e $KAuCl_4 \cdot 3 H_2O$, foram eletrodepositadas obtendo-se a arquitetura (*f*-MWCNTs–NF-PtAu). Este filme foi aplicado como um sensor eletroquímico na determinação simultânea de AA, epinefrina (EF) e AU. O sensor se mostrou eficiente, uma vez que oxidou os interferentes em potenciais diferentes (0,07 V para o AA, 0,29 V para a EF e 0,42 V para o AU), com bons valores de separação de picos de oxidação (0,22 V entre o AA e 0,13 V para o EF e 0,13 V entre a EF e o AU).

Os filmes *spin-coated* são obtidos após gotejar a solução contendo a substância de interesse sobre a superfície de um substrato sólido em constante movimento rotacional. Parâmetros como a concentração da solução e velocidade de rotação, são fundamentais para determinação da espessura dos filmes¹⁰⁸.

Betsarkis, *et al.*¹⁰⁹ utilizaram a técnica *spin-coating* para dispersar NPs-Pt e de SnO_2 sobre silício. Os filmes foram preparados a partir de uma dispersão coloidal na qual a NPs-Pt foram introduzidas pela adição de tetracloroplatinato de amônio. Após tratamento térmico a 400 ° C, um tamanho médio de NPs entre 20 e 25 nm foi observado em imagens de MET.

A técnica *spin-coating electrostatic self-assembly*¹¹⁰ permite uma fabricação rápida de filmes finos formados por estruturas de multicamadas carregadas bem organizadas. Apesar de pouco explorada, é aplicada a uma grande variedade de heteroestruturas sobre substratos sólidos. An *et al.*¹⁰³ adotaram este método para imobilizar uma camada de NPs de CdSe (~6 nm de diâmetro) derivadas do ácido carboxílico sobre uma superfície carregada positivamente contendo uma camada de grupo amino. A morfologia desta monocamada automontada, revelada por medidas de microscopia de força atômica (AFM), mostrou uma rugosidade (rms

= 0,390 nm) muito menor do que quando comparada com a mesma amostra contendo estruturas randômicas, preparada pela imersão dos filmes na solução (rms = 0.418 nm).

A técnica Langmuir-Blodgett, assim como a acima citada, permite a obtenção de NPs em multicamadas, porém, estas são dispostas sobre um substrato com maior organização molecular, permite o controle da espessura das monocamadas com maior eficiência e possibilita a formação de monocamadas nanoestruturadas homogêneas. Para obtenção de filmes LB, a substância de interesse é dissolvida em um solvente orgânico (insolúvel em água) que é espalhado numa subfase aquosa presente numa cuba denominada cuba de *Langmuir*. Após a evaporação do solvente e com a utilização de barreiras móveis, a camada monomolecular na interface água/ar denominada filme de Langmuir é comprimida até um substrato sólido, formando o filme LB, por meio da imersão e retirada deste substrato. Sucessivas imersões possibilitam a formação de filmes LB contendo diversas camadas¹¹¹.

Cavaliere-Jaricot *et al.*¹¹² prepararam um filme LB com NPs-Pt dispersas em ácido graxo. Este filme foi utilizado para avaliar a atividade eletroquímica na reação de redução do oxigênio em meio ácido. Os autores verificaram uma grande dependência na corrente de redução do oxigênio com a quantidade de NP-Pt disponíveis no eletrodo. Esta quantidade de NP-Pt na superfície do filme LB foi controlada pelo número de camadas depositadas. Foi constatada a máxima eficiência do filme LB na redução do oxigênio com o filme contendo $2,4 \mu\text{g cm}^{-2}$ de NP-Pt disponíveis na superfície do eletrodo.

Embora a técnica LB apresente algumas vantagens em relação às outras técnicas descritas, ela apresenta algumas limitações. Esta técnica requer o uso de equipamentos especiais, a transferência das monocamadas pode apresentar dificuldades e consequentemente ser lenta e é necessário que o solvente seja volátil e insolúvel em água. Além disto, a técnica exige ambientes sofisticados e laboratórios extremamente limpos o que encarece a utilização da técnica.

Neste sentido, a técnica que tem se mostrado bastante atraente na formação de filmes finos contendo NPs, é a técnica LbL, pois além da obtenção de monocamadas contendo estruturas organizadas, não requer a utilização de equipamentos sofisticados. Em função da simplicidade experimental, esta foi a técnica utilizada nesta tese e sua descrição será explorada a seguir.

2.2.1 Filmes *LbL* contendo nanopartículas

A técnica camada por camada LbL (do inglês *Layer-by-Layer*) ou de automontagem (do inglês *Self-Assembly*) foi proposta pela primeira vez no início da década de 1980, no trabalho pioneiro de Sagiv e anos mais tarde reformulada por Decher¹¹³. Os filmes são formados pela adsorção alternada de camadas nanométricas de substâncias com cargas opostas na superfície de um substrato sólido. A formação dos filmes LbL ocorre por interações eletrostáticas entre as camadas depositadas¹¹⁴.

A técnica LbL consiste na adsorção espontânea, química ou física, de camadas ultrafinas de materiais sobre a superfície de um suporte sólido, a partir de suas soluções. A Figura 1, esquematiza a preparação do filme LbL que inicia com a imersão de um substrato sólido, carregado por exemplo, negativamente, em uma solução catiônica, de maneira que uma camada do polícatión adsorva na superfície do substrato^{16,27}. Em seguida, após imersão do substrato em uma solução de lavagem utilizada para remoção das espécies que não adsorveram na superfície do substrato, o substrato é imerso na solução aniônica, promovendo a adsorção do poliânion na camada previamente adsorvida de polícatión. Após a lavagem deste, obtém-se uma bicamada. A repetição do processo permite a construção de filmes compostos por quantas camadas forem desejadas¹⁶.

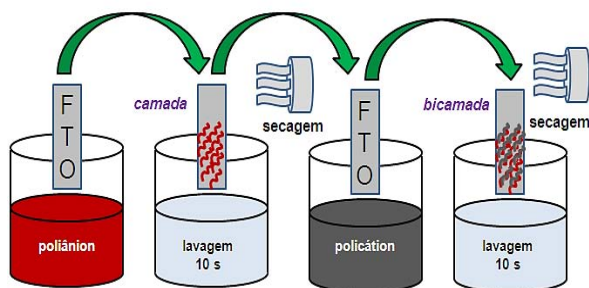


Figura 1- Esquema de preparação de filmes LbL para a formação de uma bicamada.

As interações existentes entre a superfície do substrato e entre as camadas depositadas nos filmes LbL são autolimitadas ocorrendo somente enquanto houver sítios de ancoragem disponíveis. Utilizando-se polieletrólitos altamente carregados as interações são predominantemente eletrostáticas, mas também pode haver interações secundárias do tipo Van der Waals e ligação de hidrogênio e interações mistas¹¹⁵. Estes filmes são organizados contendo espessura nanométrica¹¹⁶. Quando os polieletrólitos utilizados na construção dos filmes LbL são parcialmente carregados, verificam-se filmes LbL mais espessos. No entanto é

possível controlar a espessura destes filmes com um rigoroso controle no pH das soluções dos polieletrólitos¹¹⁷.

O emprego da técnica LbL para a imobilização de NPs deve-se a sua simplicidade experimental, baixo custo, evita a aglomeração das NPs, forma filmes altamente organizados, além da grande variedade de compostos que podem ser combinados com estas nanoestruturas e sequencialmente imobilizados num substrato sólido¹⁶. A técnica abre novas oportunidades para que possamos alcançar um modelo ideal de superfície, cujas propriedades são controláveis¹¹⁸.

Dentre as aplicações dos filmes LbL está o diagnóstico e monitoramento de doenças, pois a versatilidade da técnica permite a imobilização de material biológico como as enzimas¹¹⁹. A partir desta técnica é possível minimizar a desnaturação das enzimas, pois o processo de adsorção ocorre em solução aquosa, sob condições brandas¹²⁰. Para aplicação dos filmes LbL como sensores e biossensores eletroquímicos, a imobilização de NPs é fator crucial para melhorar respostas de sinais de transferência de elétrons como o aumento na sensibilidade e diminuição no limite de detecção (LD)¹⁸.

A Tabela 2 apresenta um sumário com recentes pesquisas voltadas a utilização de filmes LbL contendo NPs-M no período de 2009 a 2012.

Tabela 2 - Pesquisas recentes sobre filmes LbL contendo NPs-M (2009-2012).

Filme LbL	Descrição dos constituintes dos filmes	NPs	Ref.
[NP-Pt/(CNT) _n]	CNT = nanotubos de carbono	Pt	121
(HRP/NP-Au) ₂	HRP = horseradish peroxidase	Au	122
(PSS/TiO ₂ /PSS/NP-Au) ₂	PSS = poli (estirenosulfonato)	Au	123
(RGO/NP-Au) _n	RGO = óxido de grafeno reduzido	Grafeno/Au	124
NP-Pt-CNT-CS	CNT = nanotubos de carbono CS = quitosana	Pt	125
(PVS/NP-Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃	PVS = ácido poli(vinil sulfônico)	Pt	12
(NP-Pt-DENs/CNT)	DENs = PAMAN CNT = nanotubos de carbono	Pt	126
{Hb/Fe ₃ O ₄ @Pt} _n	Hb = hemoglobina	Pt	127

Nos estudos onde os filmes LbL são aplicados como sensores eletroquímicos, a presença de NPs-M têm sido crucial para auxiliar o processo de transferência de elétrons na superfície dos eletrodos. Por exemplo, Crespilho *et al.*¹⁷ prepararam filmes LbL contendo

NPs-Pt incorporadas ao dendrímero poliamidoamina (PAMAM) alternado com ácido polivivilsulfônico (PVS). O filme contendo 10 bicamadas de PVS/Pt-PAMAM sobre ITO foi utilizado como eletrodo de trabalho para a oxidação do metanol. Os autores verificaram que o sensor não respondeu à oxidação de metanol em potenciais abaixo de 1,0 V e sim, somente quando o eletrodo foi ciclado em 1,3 V. De acordo com os autores, o PAMAM pode bloquear os sítios ativos das NPs-Pt impedindo o fluxo de metanol. No entanto, em potenciais maiores que 1,0 V ocorre a oxidação do PAMAM, aumentando a disponibilidade das NPs-Pt e acarretando a oxidação de metanol em 0,87 V.

2.3 Propriedades do cloreto de 3-n-propil-piridínio-silsesquioxano

As combinações de compostos orgânicos com inorgânicos visando à formação de materiais híbridos têm sido a motivação de muitas pesquisas em função do interesse comercial, pois há uma melhora das propriedades ópticas, mecânicas, térmicas e química, dando maior flexibilidade e processabilidade destes materiais¹²⁷.

Diversos materiais híbridos orgânicos-inorgânicos à base de sílica têm apresentado inúmeras aplicações tecnológicas, dentre elas como materiais adsorventes para processos de separação⁴, catalisadores⁵, revestimentos protetores¹²⁸, carreadores de fármacos², dispositivos ópticos³ e sensores eletroquímicos⁶.

Dentre os materiais híbridos à base de sílica estão os silsesquioxanos. Estes são obtidos a partir de um organossilano, um precursor orgânico responsável pelo alto grau de incorporação de grupos orgânicos. Todos os átomos de silício presentes nos silsesquioxanos, proveniente do organossilano, se encontram ligados a um grupo orgânico. Esta é a principal característica que diferencia os silsesquioxanos dos outros híbridos à base de sílica¹²⁷.

O grupo orgânico do organossilano dos silsesquioxanos pode estar ligado na forma de ponte entre dois ou mais átomos de silício ou pendente ao silício. A natureza do grupo orgânico, assim como o seu tamanho de cadeia, propriedades eletrônicas e flexibilidade são determinantes na forma destes materiais os quais podem se apresentar na forma parcialmente ou totalmente reticulada. Além disso, a solubilidade e o tamanho da rede oligomérica dos silsesquioxanos também são dependentes do grupo orgânico¹²⁷.

Materiais híbridos que contém ligações covalentes entre os componentes orgânicos e inorgânicos podem apresentar auto-organização estrutural. Nos silsesquioxanos, esta propriedade é determinada pela rigidez do grupo orgânico ligado quimicamente à parte

inorgânica destes materiais. O tamanho da cadeia orgânica do organossilano além de participar da auto-organização, influencia nas dimensões dos poros que estes materiais apresentam. Exemplos de materiais híbridos que apresentam auto-organização são os materiais à base de sílica que contém grupos carregados positivamente¹²⁷, tal como o polímero cloreto de 3-*n*-propil-piridínio-silsesquioxano (SiPy⁺Cl⁻), cuja estrutura é ilustrada na Figura 2.

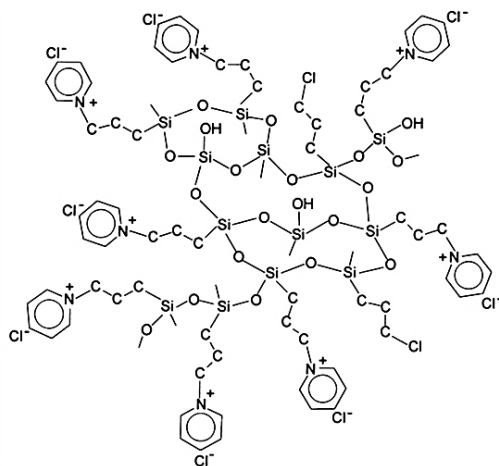


Figura 2 - Estrutura idealizada do cloreto de 3-*n*-propil-piridínio-silsesquioxano (SiPy⁺Cl⁻). Para simplificar, foram omitidos os átomos de hidrogênio dos átomos de carbono (Patente: BR9803053-A)⁷.

O polímero SiPy⁺Cl⁻ sintetizado por Gushikem *et al.*⁷ (Patente: BR9803053-A) apresenta alta capacidade de troca aniônica, boa estabilidade química, alta solubilidade em água e capacidade de formar filmes em diversos substratos, tais como grafite, vidro, sílica¹¹, sílica recoberta com Al₂O₃¹⁵, fibras de celulose modificadas com Al₂O₃¹⁰, vidro recoberto com óxido de estanho dopado com flúor (FTO)⁹, quartzo¹², prata¹³ e silício⁹. A formação de filmes revestidos com este polímero foi bastante explorada pelo grupo de pesquisa da UNICAMP, sendo alguns exemplos relatados a seguir.

A capacidade de troca aniônica do SiPy⁺Cl⁻ foi verificada por Fujiwara *et al.*⁸ que investigaram a adsorção de FeCl₃, CuCl₂ e ZnCl₂ sobre um filme de SiPy⁺Cl⁻ imobilizado na superfície de sílica gel recoberta com um filme fino de Al₂O₃, formando complexos aniônicos representados por (SiO₂:Al₂O₃:SiPy⁺)_m [MCl_{z+m}]^m. Por medidas de ressonância magnética nuclear (RMN) verificou-se que o filme foi fortemente aderido na superfície por meio da ligação Si-O-Al, demonstrando uma área superficial específica (S_{BET} = 233 m² g⁻¹) e uma excelente capacidade de troca aniônica de 1,04 mmol g⁻¹. O coeficiente de equilíbrio, *k*,

determinado para cada espécie de complexo indicou uma alta afinidade do filme com as substâncias adsorvidas.

Diferentes substratos como SiO_2 , $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$, Al_2O_3 , celulose/ Al_2O_3 ¹⁰, C-grafite e AlPO_4 revestidos com um filme fino de SiPy^+Cl^- foram utilizados como suporte para imobilizar espécies eletroativas como ftalocianina e porfirinas metaladas, com o objetivo de preparar sensores eletroquímicos¹. Como exemplo destes trabalhos tem-se o recobrimento do SiPy^+Cl^- sobre superfície de fosfato de alumínio mesoporoso (meso-ALPO). Sobre o filme preparado, $\text{ALPO}/\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$, foi imobilizada a ftalocianina tetrasulfonada de cobalto, CoTsPc, por troca iônica. O filme $\text{ALPO}_4/\text{SiPy}^+/\text{CoTsPc}^{4-}$, quando utilizado como sensor eletroquímico para oxidação de ácido oxálico, apresentou baixo limite de detecção (LD) ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e foi observado que os processos de transferência de elétrons com o centro metálico do material são mais rápidos que os processos de difusão do ácido oxálico para a superfície do eletrodo⁶.

Alfaya *et al.*¹²⁹ observaram uma forte aderência do SiPy^+Cl^- sobre uma superfície polida de grafite e por meio de uma reação de troca iônica a espécie eletroativa $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ foi adsorvida sobre este filme. O eletrodo resultante ($\text{grafite}/\text{SiPy}^+$) $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, além de quimicamente estável, resultou num potencial sensor eletroquímico para a oxidação de ácido ascórbico (AA) (LD = $0,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, sensibilidade = $0,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, no intervalo de $0,25 \times 10^{-4}$ e $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), quando utilizado para determinação de vitamina C em tabletes e em sucos de laranja.

Lucho *et al.*¹¹ também evidenciaram uma excelente capacidade de troca aniônica ($1,09 \text{ mmol g}^{-1}$) ao recobrir a superfície de Al_2O_3 com o polímero SiPy^+Cl^- , valor este próximo ao verificado por Fujiwara *et al.*⁸. Sobre este material, foi imobilizada a CoTsPc a partir de uma reação de troca iônica, com um rendimento de $40 \mu\text{mol g}^{-1}$. As propriedades eletroquímicas do material $\text{AlSiPy}/\text{CoTsPc}$ foram avaliadas na detecção de ácido oxálico por medidas de cronoamperometria e com de LD igual a $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. A partir da espectroscopia de impedância verificou-se uma resistência de transferência de carga para o material igual a $43 \Omega \text{ cm}^2$.

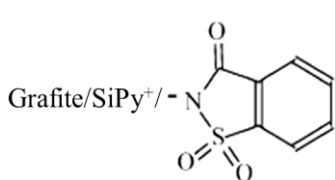
Outro eletrodo desenvolvido para a determinação do ácido oxálico foi obtido por Arguello *et al.*¹³⁰ a partir da mistura de SiPy^+Cl^- e carbono cerâmico, e sobre esta superfície foi aderida a CoTsPc. Dos resultados voltamétricos, foi verificado que o polímero SiPy^+Cl^- foi fundamental para impedir a lixiviação da CoTsPc depositada sobre o carbono cerâmico e para assegurar a dispersão adequada na rede sol-gel. O eletrodo obtido exibiu um LD ($7,1 \times$

$10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) menor que o obtido com o $\text{AlSiPy/CoTsPc}^{11}$, acima citado, na oxidação de ácido oxálico.

Muxel *et al.*¹³¹ utilizaram o polímero SiPy^+Cl^- para recobrir a superfície de um bastão de grafite para a preparação de um eletrodo íon seletivo potenciométrico para a determinação de Cr(VI) em amostras de águas residuárias de indústrias de galvanoplastia e de couro. Após preparação da arquitetura grafite/ SiPy^+Cl^- , esta foi imersa por 20 minutos numa solução de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 4, obtendo-se após lavado com água destilada e seco à temperatura ambiente o eletrodo modificado grafite/ $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{HCrO}_4^-$. O eletrodo exibiu uma resposta Nernstiana rápida (15 s) para Cr(VI) entre as concentrações $3,1 \times 10^{-6}$ e $1,8 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e LD de $2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. O sensor exibiu um tempo de vida útil de 6 meses com boa reprodutibilidade.

A Tabela 3 resume os resultados de concentração obtidos por voltametia cíclica, cronoamperometria e potenciomетria com diferentes eletrodos contendo o SiPy^+Cl^- imobilizado.

Tabela 3 - Comparação dos resultados obtidos com diferentes eletrodos contendo o SiPy^+Cl^- imobilizado com valores obtidos pelo método padrão¹.

Eletrodo / técnica	Analito / Amostra	Valores obtidos	Método padrão
$(\text{SiO}_2/\text{SiPy}^+)_4\text{CoTsPc}^{4-}$ voltametria cíclica ¹³²	Ácido oxálico em espinafre g/100 g	A1) 2,22 A2) 0,97	A1) 2,27 ¹³³ A2) 0,98
$(\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiPy}^+)_4\text{CuTsPc}^{4-}$ Cronoamperometria ¹³⁴	AA em tabletes g/g	A1) 1,01 A2) 0,47	A1) 1,038 ¹³⁵ A2) 0,476
$(\text{Grafite}/\text{SiPy}^+)_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ Cronoamperometria ¹²⁹	AA em tabletes g/g	A1) 1,02 A2) 1,04	A1) 1,002 ¹³⁵ A2) 0,996
$(\text{Grafite}/\text{SiPy}^+)_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ Cronoamperometria ¹²⁹	AA em sucos g/L	A1) 0,36 A2) 0,25	A1) 0,342 ¹³⁶ A2) 0,235
 Grafite/ $\text{SiPy}^+/-$ Potenciomетria ¹³⁷	Sacarina em adoçante artificial (pó) mg/g	A1) 11,6 A2) 25,9	A1) 12 ¹³⁸ A2) 24,8
	Sacarina em adoçante artificial (líquido) mg/g	A1) 65,3 A2) 82	A1) 68,9 ¹³⁸ A2) 83,2

A1 e A2 se referem a valores encontrados para diferentes amostras.

Em função das propriedades do SiPy^+Cl^- como a excelente capacidade de troca aniônica, alta solubilidade em água, estabilidade eletroquímica e aplicações eletroanalíticas, nosso grupo de pesquisa GDEM, tem estendido a investigação das propriedades do polímero SiPy^+Cl^- imobilizado em filmes finos nanoestruturados, preparados pela técnica LbL. Estes filmes têm sido aplicados como sensores eletroquímicos de substâncias diversas como AA¹², DA9, AU¹³, H₂O₂, glicose, prometazina¹⁴ e outros. Nas diferentes arquiteturas investigadas o polímero SiPy^+Cl^- tem se mostrado um excelente polieletrólito catiônico adsorvendo na superfície de diferentes materiais^{9,12,13,14}.

No trabalho de Jesus *et al.*⁹, o polímero SiPy^+Cl^- se mostrou um eficiente polycation alternado com a (CuTsPc) para a preparação de filmes LbL sobre FTO. Por medidas de XPS dos filmes $(\text{CuTsPc}/\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ e $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_n$ (onde $n = 5$ bicamadas) foi possível constatar maiores interações entre o precursores dos filmes quando estes são depositados na sequência $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_5$, pois a razão atômica obtida entre Cu/N_{total} para a arquitetura $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_n$ foi de 0,14 contra 0,036 obtida com $(\text{CuTsPc}/\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$. Estudos da determinação seletiva de DA na presença de excesso de AA, mostraram que o SiPy^+Cl^- presente no filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_5$ foi essencial para a ancoragem da substância eletroativa CuTsPc, quando comparado com o filme contendo a CuTsPc na parte interna, $(\text{CuTsPc}/\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_5$.

O mesmo eletrodo foi explorado por Jesus *et al.*¹⁴ na investigação da oxidação de prometazina hidrocloreada em formulações comerciais de *Fenergan*® e *Lisador*®. Foram observados dois picos de oxidação, em 0,48 e 0,79 V. Verificou-se que o filme LbL $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_5$ oxidou a prometazina fornecendo correntes de oxidação mais intensas do que as observadas em relação aos eletrodos de FTO (sem modificação) e aos eletrodos dos precursores, $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_5$ e $(\text{CuTsPc})_5$. Além disso, o eletrodo exibiu menores valores de LD e limite de quantificação (LQ), sendo $8,71 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ e $9,31 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, quando comparados com outros eletrodos como eletrodo de carbono vítreo, eletrodo de grafite modificado com líquido iônico e eletrodo de diamante dopado com boro.

Paralelamente a estes estudos, a combinação da estrutura química do polímero SiPy^+Cl^- com sais metálicos, gerou novas possibilidades de obtenção de materiais híbridos nanoparticulados. A existência de cavidades intramoleculares no SiPy^+Cl^- faz com que este polímero sirva de molde para a formação e estabilização de NPs metálicas^{12,15}.

Recentes pesquisas mostram a utilização de silsesquioxanos como estabilizantes para imobilização de NPs-M. Menezes *et al.*¹⁵ prepararam NPs-Au menores que 10 nm utilizando

dois tipos de silsesquioxanos carregados, o SiPy^+Cl^- e o cloreto de propil-azonia-4-azabiciclo[2.2.2]octano (SiDb^+Cl^-), como agente estabilizador. O sistema contendo NPs-Au foi imobilizado sobre sílica recoberta com óxido de alumínio para preparação de eletrodos de pasta de carbono (EPC) utilizado na eletrooxidação de nitrito. O eletrodo $\text{Au-SiPy}^+\text{Cl}^-$ mostrou maior corrente de oxidação para o nitrito do que outros eletrodos testados sem NPs-Au. Esta maior corrente foi atribuída à presença das NPs-Au no eletrodo que auxiliaram no processo de transferência de elétrons. Além disso, a corrente de oxidação do nitrito obtida com o eletrodo $\text{Au-SiDb}^+\text{Cl}^-$ foi menos intensa do que a obtida com o eletrodo $\text{Au-SiPy}^+\text{Cl}^-$. De acordo com os autores, este comportamento distinto dos eletrodos frente ao nitrito, está relacionado com as diferentes estruturas dos silsesquioxanos, pois enquanto o SiDb^+Cl^- é alifático o SiPy^+Cl^- apresenta elétrons π aromáticos que podem contribuir na transferência de elétrons.

A exploração acerca das propriedades do SiPy^+Cl^- como estabilizante para síntese de NPs-Pt, e posterior imobilização em filmes LbL para avaliar a influências das NPs em sensores eletroquímicos, foi um dos fatores que motivou a realização desta Tese. As substâncias de interesse para determinação com os filmes LbL preparados com NPs-Pt incorporadas ao SiPy^+Cl^- foram a DA e o H_2O_2 . Por esse motivo, conceitos importantes relacionados a este tema serão abordados sequencialmente.

2.4 Recentes avanços sobre os analitos Dopamina e Peróxido de Hidrogênio

2.4.1 A dopamina e o desenvolvimento de sensores eletroquímicos

Eletrodos modificados tem sido uma excelente ferramenta para obtenção de novos sensores aplicados na determinação de diversos analitos como a DA. Este neurotransmissor atua em funções cerebrais com atividade estimulante do sistema nervoso central¹³⁹. Este neurotransmissor é encontrado em tecidos e amostras biológicas na ordem de aproximadamente $1,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. A DA é uma catecolamina sintetizada a partir da tirosina da região mesencefálica denominada substância negra, parte compacta. Esta região possui esse nome por apresentar coloração escura decorrente à alta quantidade de células produtoras de DA que se oxidam à melanina, um pigmento de coloração escura¹⁹. A DA é obtida a partir da descarboxilização da L-DOPA proveniente da oxidação do aminoácido L-tirosina de acordo com o mecanismo da mostrado na Figura 3 (a).

A doença conhecida como *Mal de Parkinson* é causada pela degeneração progressiva de células da substância negra, que libera DA numa região do cérebro denominada corpo estriado. Este, localizado na base do córtex cerebral, é responsável pelo controle de movimentos voluntários e é estimulado pela DA proveniente da substância negra. O desequilíbrio químico causado pela morte das células que produzem a DA afeta os movimentos, provocando paralisia, rigidez do corpo, alterações posturais e tremores de repouso²⁰. A Figura 3 ilustra a localização do estriado cerebral humano (Figura 3 (b)) e de rato (Figura 3 (c)) onde é possível observar que o estriado no rato é proporcionalmente maior que o estriado humano.

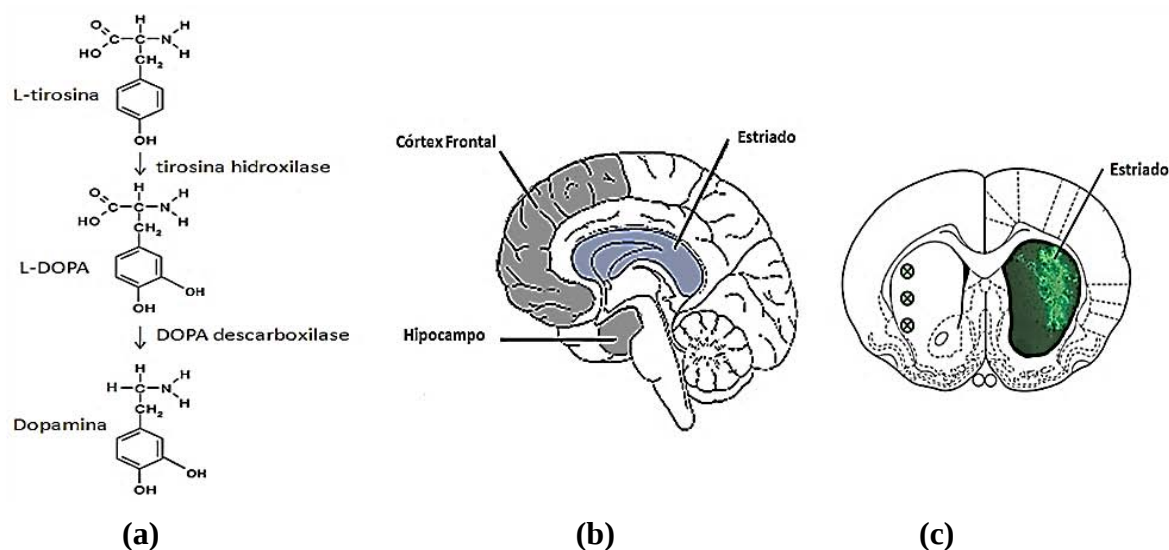


Figura 3 - (a) Via de síntese de DA obtida a partir do aminoácido L-tirosina¹⁹. (b) Representação da região do estriado cerebral humano¹⁴⁰ (c) estriado cerebral de rato¹⁴¹.

Além do *Mal de Parkinson*, desníveis na concentração de DA em tecidos cerebrais estão associados à Esquizofrenia¹⁴². Por esse motivo, parâmetros como sensibilidade e seletividade são de grande importância para a sua detecção.

Para determinação deste neurotransmissor, diversos métodos são utilizados, destacando-se os métodos espectroscópicos, cromatográficos e eletroquímicos¹⁹. Por exemplo, Cunha *et al.*¹⁴³ determinaram os níveis endógenos de DA e seus metabólitos não-conjugados, 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de fase reversa com detecção eletroquímica (HPLC-ED) num potencial fixo de 0,8 V. Neste estudo, os autores propuseram um modelo para explicar a influência ocasionada por lesões unilaterais da substância negra com o comportamento rotatório realizado pelos animais. As lesões foram realizadas com as

substâncias 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Os autores verificaram que a combinação entre o tipo de toxina (6-OHDA ou MPTP) e o local lesionado determinava o sentido e o número de rotações por hora realizadas pelos animais. Correlacionando a redução da concentração de DA estriatal com o sentido da rotação dos animais, pode-se inferir que animais com pouca depleção dopaminérgica tendem a rodar para o mesmo lado da lesão (ipsiversivo), enquanto animais com lesão mais severa (menos DA) rodam preferencialmente para o lado oposto da lesão (contraversivo).

Em pesquisa semelhante Ferro *et al.*¹⁴⁴ determinaram a DA por HPLC-ED em estriados de ratos lesionados com 6-OHDA e MPTP. Os autores constataram que ambas as toxinas causaram uma depleção significativa de DA no estriado. Ambos os ratos com 6-OHDA e MPTP lesionados apresentaram déficits semelhantes na execução de tarefas que exigem memória de trabalho, que é a que está ativa apenas durante o foco de atenção dos animais. No entanto, os ratos apresentaram um aumento significativo e transitório da atividade locomotora após a lesão MPTP e um comportamento hipolocomotor após a lesão de 6-OHDA.

Os métodos espectroscópicos e cromatográficos embora muito sensíveis, precisos e seletivos, são onerosos decorrentes ao alto custo do equipamento e da manutenção decorrente ao descarte de solventes e pelo próprio consumo. Como alternativa a estes métodos, os métodos eletroquímicos, permitem que as análises sejam realizadas diretamente na amostra, evitando-se a manipulação excessiva da mesma, além de serem mais rápidas e de menor custo¹⁴⁵. Além disso, em análise de rotina quando se trabalha com um grande número de amostras com composição similar, os métodos eletroquímicos são mais atrativos que os espectroscópicos e cromatográficos.

Embora os métodos eletroquímicos apresentem estas vantagens em relação aos demais métodos, um dos fatores que dificulta a determinação eletroquímica de DA, é a presença de interferentes como AA e o AU, pois estes interferentes são oxidados em potenciais bem próximos ao potencial de oxidação da DA¹⁴⁶. Uma boa alternativa para detecção de DA tem sido a aplicação de técnicas eletroanalíticas como a voltametria cíclica (VC)⁹, voltametria de pulso diferencial (VPD)^{9,147} e a voltametria de onda quadrada (VOQ)¹⁴⁷.

A utilização de eletrodos modificados contendo NPs tem se mostrado muito eficiente para a detecção de DA. Exemplo disto é relatado no trabalho de Wang *et al.*¹⁴⁸, os quais prepararam filmes LbL contendo a amina colina depositada sobre carbono vítreo e NPs-Au

dispersas na colina. Os autores verificaram que a colina exerceu um importante papel para a distribuição uniforme das NPs-Au, de tamanho da ordem de 100 nm, sobre a superfície do eletrodo. Foi evidenciado que as NP-Au promoveram uma atividade eletrocatalítica na oxidação de DA, AA e AU, com redução nos sobrepotenciais. Este eletrodo modificado com NPs-Au dispersas na colina possibilitou a detecção simultânea de DA e interferentes, com uma diferença de potencial em torno de 100 mV para DA e AA e DA e AU.

Recentemente Sun *et al.*¹⁴⁹, prepararam um eletrodo de pasta de carbono contendo NPs de SnO₂ dispersas em nanotubos de carbono MWCNTs. O sensor foi aplicado na detecção simultânea de DA, AA e AU após a adição destes analitos em amostra de urina humana. A alta atividade eletrocatalítica exibida pelo sensor foi atribuída a presença das NPs de SnO₂ que auxiliaram no processo de transferência de elétrons. Os voltamogramas de pulso diferencial mostraram maiores separações nos potenciais de oxidação dos analitos (~200 mV) e maior sensibilidade do que evidenciado nos voltamogramas cíclicos, em função da sensibilidade da técnica.

No trabalho de Jesus C. G *et al.*⁹ foi verificada uma diferença mais acentuada (500 mV) na separação dos Epa da DA e do AA utilizando-se filmes LbL contendo SiPy⁺Cl⁻ e ftalocianina de cobre em relação a outros trabalhos citados na literatura.

Muitas pesquisas envolvendo substâncias biológicas, antes de serem realizadas *in vivo* são testadas em condições experimentais que se aproximam o máximo das condições existentes numa amostra real. Parâmetros como pH, concentração, temperatura e pressão são determinantes para as medidas realizadas *in vivo*. Neste ínterim, modelos que procuram imitar a condição real são de extrema importância para a ciência. Dentre estes modelos, muitos estudos têm sido realizados visando à preparação de vesículas lipossômicas, também denominadas lipossomos¹⁵⁰. Diversos trabalhos relatam a utilização deste modelo biomiméticos para encapsulação de DA.

2.4.1.1 Lipossomos em sistemas biomiméticos e encapsulação de DA

As moléculas que constituem a bicamada lipídica dos modelos de membranas biológicas são em geral lipídios, tais como os fosfolipídios, esfingolipídios e colesterol, proteínas e carboidratos em glicoproteínas e glicolipídios¹⁵¹. A proporção destas espécies varia de acordo com o tipo da membrana e função que a mesma desempenha¹⁵². Tendo em vista a complexidade da membrana celular, visando compreender as funções desempenhadas

por estas membranas e os mecanismos de interações lipídio-biomolécula, estudos têm sido realizados a cerca destes fatores a partir da utilização de modelos de membrana simplificados, denominados sistemas biomiméticos^{151,150}.

Um dos modelos mais estudados dentre os sistemas biomiméticos da membrana celular é o modelo de preparação de lipossomos¹⁵³. Estes são vesículas de fosfolipídios que visam mimetizar as bicamadas lipídicas de forma esférica¹⁵⁴. Bangham *et al.*¹⁵⁵ são pioneiros nos trabalhos a cerca da utilização de lipossomos como sistema biomimético, pois em 1965 investigaram a difusão de íons em membranas lipídicas artificiais.

Os lipossomos são formados em sistemas aquosos pela agregação das moléculas anfifílicas que possui um grupo polar e duas cadeias alifáticas em bicamadas que ao fecharem mantêm um compartimento aquoso interno¹⁵⁴.

A estrutura dos lipossomos pode conter uma ou mais bicamadas concêntricas de fosfolipídios envolvendo um compartimento interno aquoso. Os lipossomos podem apresentar tamanhos diversos de acordo com o processo de preparação. Dentre eles há os lipossomos multilamelares (MLV), formados por várias bicamadas concêntricas intercaladas por compartimentos aquosos, os lipossomos unilamelares (*Small Unilamellar Vesicles*: SUV), formados por uma única bicamada concêntrica em um pequeno compartimento aquoso e representam os menores lipossomos e os lipossomos unilamelares (*Larger Unilamellar Vesicles*: LUV) que são grandes e formados por uma bicamada contendo uma grande cavidade aquosa¹⁵⁶.

Dentre as técnicas utilizadas para a construção de lipossomos tais como a hidratação lipídica, a sonificação, a extrusão, a hidratação e a desidratação, a hidratação lipídica tem sido a mais utilizada. No entanto, os lipossomos formados a partir desta técnica são os do tipo MLV¹⁵⁷. Estes lipossomos apresentam tamanhos diversos, mas utilizando as técnicas de sonicação e ou extrusão, é possível obter lipossomos unilamelares homogêneos.

Dentre os fosfolipídios utilizados para obtenção de lipossomos, estão as fosfatidilcolinas como o dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), são os fosfolipídios mais comuns na constituição da membrana biológica. Estes fosfolipídios são moléculas anfifílicas formadas por um grupo polar, com uma ponte glicerol ligada à dois grupos alquílicos que fazem parte de duas longas cadeias carbônicas¹⁵⁵.

Nos últimos anos, os lipossomos vêm sendo estudados na incorporação e liberação controlada de fármacos (*drug delivery*) devido à capacidade de proteção, versatilidade estrutural, composição e fluidez¹⁵⁸. Podem desempenhar a função de carreadores de fármacos,

agentes de diagnóstico ou biomoléculas. Em vários trabalhos da literatura é evidenciado que a utilização destes lipossomos como carreadores pode melhorar a farmacocinética e farmacodinâmica das moléculas encapsuladas, já que essas formulações podem induzir a rápida absorção e retenção do fármaco no tecido-alvo¹⁵⁹.

Dentre diversas substâncias que podem ser encapsuladas em lipossomos está a DA. Vários trabalhos descrevem a encapsulação de DA em lipossomos para mimetizar os processos que envolvem a membrana celular de diferentes tecidos^{160,161,162}.

A degeneração progressiva de células da substância negra justifica a importância da administração controlada de DA em tecido cerebral. Neste sentido, Matthew *et al.*¹⁵⁹ investigaram a liberação controlada de DA encapsulada em lipossomos (LIPO-DA) em tecido cerebral de ratos. Os LIPO-DA foram preparados como lecitina de soja hidrogenada, colesterol e diacetil fosfato hidrogenado, dissolvidos numa mistura de clorofórmio e diisopropil éter (1:2, v/v). A hidratação foi feita com DA hidrociorada em 10 mmolL⁻¹ de tampão fosfato salino (PBS), pH 4,5, contendo 0,4 % de EDTA. Inicialmente os L-DA exibiram *in vitro* a liberação de DA por mais de 40 dias. Os LIPO-DA foram implantados no corpo estriado de ratos submetidos à lesões unilaterais da substância negra. A liberação *in vivo* da DA em fluido extracelular foi monitorada por microdiálise onde se verificou que os níveis de DA no estriado de ratos tratados com os LIPO-DA foram maiores que os encontrados nos ratos contendo as lesões unilaterais da substância negra sem tratamento. Além disso, os ratos que receberam os LIPO-DA exibiram recuperação comportamental parcial. Estes resultados evidenciaram que a utilização de LIPO-DA demonstra o potencial desta tecnologia como um método para entrega controlada de agentes terapêuticos em áreas discretas do cérebro.

A encapsulação de DA em lipossomos também pode ser utilizada para investigação de interações entre DA encapsulada com outras substâncias presentes em amostras biológicas. Jiang *et al.*¹⁶² estudaram a interação entre DA e lipossomos contendo o transportador de DA (DAT) extraído do cérebro de ratos na análise de eletroforese capilar (CE). Os lipossomos foram preparados a partir de fosfatidilcolina de ovo e colesterol e sequencialmente hidratados com DAT em tampão. O DAT é uma proteína da membrana plasmática existente exclusivamente em neurônios responsáveis pela síntese de DA. O DAT desempenha um papel importante na neurotransmissão dopaminérgica interagindo com a DA extracelular de células nervosas. Este trabalho descreve a extração de DAT do cérebro de ratos e encapsulação deste transportador em lipossomos para atuarem como pseudofase estacionária em CE para

interação com DA (fase móvel). Além disso, foi acrescentado ao tampão de corrida a Nomifensina, inibidor competitivo da DAT, para avaliar a influência deste inibidor na interação entre DAT e DA.

Visando melhorar o rendimento de DA encapsulada em lipossomos Zhigaltsev *et al.*¹⁶⁰ utilizaram o sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ durante a preparação das vesículas lipossômicas. A fim de se obter lipossomos unilamelares (até 100 nm), foi constatado que técnicas convencionais de preparação de lipossomos como a extrusão e sonificação, não forneceram níveis de recuperação de DA em pequenas vesículas, devido o volume interior pequeno e ao vazamento da droga. Assim, o aumento da razão fármaco para o lipídio lipossomal pode acarretar desperdício da droga e, portanto, não se mostrou rentável. Visando superar estes inconvenientes os autores verificaram que a utilização do sulfato de amônio melhora o carregamento do lipossomo com DA em resposta a um imposto gradiente de prótons. Este método se revelou eficiente para retenção de uma maior quantidade de DA. Testes em ratos revelaram que o tratamento com os LIPO-DA preparados com fosfatidilcolina e colesterol (7:3 mol/mol) e o sulfato de amônio demonstraram efeito decisivo sobre a atividade anti-Parkinsoniana em virtude da maior quantidade de DA disponível nas vesículas lipossômicas.

Diversas estratégias experimentais podem ser utilizadas para controlar o tamanho dos lipossomos. Por exemplo, Khare *et al.*¹⁶¹ investigaram a encapsulação de DA acoplado ao glutamato em lipossomos de fosfatidilcolina, colesterol, estearilamina e glutamato. A liberação da droga foi analisada por meio de uma membrana de diálise. Foi verificado que o acoplamento lipossomal reduziu o tamanho das vesículas em torno de 30%. Os LIPO-DA foram testados em ratos albinos e os estudos revelaram que a DA pode ser efetivamente fornecida para o cérebro e os resultados indicaram a superioridade da formulação lipossomal acoplado em comparação à composição desacoplada.

Com intuito de aumentar a estabilidade de LIPO-DA Carafa *et al.*¹⁶³ encapsularam o pró-fármaco da DA, 2-amino-N-[3,4-di-hidróxi-fenil)-etil]-3-fenil-propionamida (DOPH) em lipossomos unilamelares de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e colesterol. As suspensões da composição formulada se mostraram estáveis em sistemas monodispersos com potencial zeta negativo. Verificou-se que a inclusão de DOPH em lipossomos ofereceu a possibilidade de impedir a fotodegradação e aumentar a estabilidade do plasma *in vitro* além de prevenir a degradação química e enzimática do metabolismo do DOPH.

2.4.1.2 Lipossomos imobilizados em filmes LbL

Em alguns processos para obtenção de modelos biomiméticos visando compreender os mecanismos de interações lipídio-biomolécula, se faz necessário a imobilização destes modelos de membrana em filmes nanoestruturados, pois podem simular interações específicas, enzima substrato, antígeno-anticorpo, e/ou mimetizar a superfície da membrana celular¹⁶⁴.

Michel *et al.*¹⁶⁵ mostraram que lipossomos podem ser incorporados em filmes com multicamadas alternados com o polieletrólito, poli (ácido glutâmico)/cloreto de poli (alilamônio) construído pela técnica LbL. Análise de microbalança de quartzo, elipsometria e imagens de força atômica, mostraram que os lipossomos não se alteraram após a imobilização.

A substância melanina foi encapsulada em lipossomos de dipalmitoilfosfatidil glicerol (DPPG)¹⁵⁹. Estes lipossomos foram alternados com polialilamina (PAH) para obtenção de filmes LbL, utilizando substrato de quartzo hidrofílico. Medidas de espectroscopia de absorvância na região do UV-Vis e na região do infravermelho revelaram uma interação efetiva entre a melanina e a membrana, além da boa estabilidade destas biomoléculas.

Lipossomos de DPPG, hidratados com água, foram preparados por Moraes *et al.*¹⁶⁶, os quais imobilizaram os lipossomos em substratos de vidro sobre a superfície de PAMAM. Neste, foi depositada a proteína albumina de soro bovino (BSA). Para esta investigação, os autores constataram nos espectros de absorvância na região do infravermelho (FTIR) interações efetivas entre os lipossomos com as monocamadas de PAMAM. Estas interações foram confirmadas pela presença das bandas do PAMAM em 1648 e 1554 cm^{-1} (amidas I e II, respectivamente) e do DPPG em 2915 e 2852 cm^{-1} (estiramento C – H) e em 1737, 1470 e 1258 cm^{-1} (estiramento da carboxila, deformação C–H e estiramento do PO_2) contidas no espectro do filme LbL (PAMAM/DPPG)₁₂ sobre substrato de silício.

Visando compreender as interações entre as membranas e moléculas de interesse biológico, a imobilização de lipossomos tem sido ótima ferramenta, principalmente na obtenção de biossensores. As superfícies de membranas geralmente são aceptoras de ligações biológicas, pois os elementos de interesse biológico estão expostos ao meio extracelular. Fosfolipídios podem servir de matriz na imobilização em filmes finos, além disso, podem encapsular biomoléculas sem alterar o ambiente aquoso nativo sem contato direto com os

polieletrólitos¹⁶⁷. No entanto, há um grande campo de pesquisa a ser explorado acerca da aplicação de filmes LbL contendo lipossomos encapsulados com DA.

2.4.2 Filmes LbL como sensores na detecção de peróxido de hidrogênio

A investigação sobre a detecção quantitativa de H_2O_2 , nos últimos anos tem recebido atenção considerável, pois H_2O_2 é um forte agente oxidante amplamente utilizado nas indústrias químicas e de alimentos²¹. Este oxidante é considerado um mediador essencial na indústria farmacêutica, alimentar, análise ambiental e clínica²². Além disso, o H_2O_2 é produzido durante alguns processos químicos e enzimáticos²³, portanto a sua detecção pode ser utilizada como um indicador do progresso de tais processos.

Na indústria de alimentos, por exemplo, a adição de H_2O_2 ao leite se deve a sua ação antibacteriana tendo em vista as más condições higiênico-sanitárias de obtenção, conservação e/ou transporte do leite. O H_2O_2 promove a oxidação do tiocianato (SCN^-) presente no leite a hipotiocianato ($SCNO^-$) que tem efeito antibacteriano¹⁶⁸.

O método de determinação de peróxido de hidrogênio recomendado pela legislação brasileira envolve titulação com permanganato de potássio e possui limite de detecção de 300 ppm¹⁶⁹. No entanto, a determinação eletroquímica tem se mostrado uma técnica eficiente para a determinação quantitativa de H_2O_2 devido à sua sensibilidade intrínseca, análise rápida, alta seletividade e simplicidade¹⁶⁹. Outros métodos podem ser utilizados para determinação de H_2O_2 , incluindo técnicas de espectrofotometria, iodometria, fluorimetria e quimiluminescência. No entanto, em relação aos métodos eletroquímicos, algumas destas técnicas apresentam custo elevado, são lentas e envolvem procedimentos tediosos¹⁷⁰.

Nos métodos eletroquímicos para determinação de H_2O_2 , muitos trabalhos têm explorado a aplicação de eletrodos modificados. A modificação superficial de um eletrodo pode acarretar, do ponto de vista físico-químico, a diminuição da energia de ativação do processo redox do H_2O_2 e aumento da taxa de transferência eletrônica. Além disso, do ponto de vista analítico, a modificação pode proporcionar inibição de alguns processos eletroquímicos em detrimento à intensificação de outros, gerando maior seletividade e sensibilidade, decorrente a maior afinidade entre eletrodo e o H_2O_2 ²³.

Farah *et al.*¹⁷¹ construíram um sensor para H_2O_2 pela modificação de carbono vítreo (GC) com azul da prússia (PB) e óxido de grafeno (GO). A combinação de propriedades do compósito formado no eletrodo GC-GO-PB promoveu maior sensibilidade e seletividade na

determinação de H_2O_2 do que o observado como o GC-PB sem GO e GC-GO sem PB. Diferentes dos eletrodos GC-GO e GC-PB, o sensor GC-GO-PB respondeu ao H_2O_2 em todos os valores pH testados (pH = 3,0; 5,0; 7,4 e 12,0).

Muitos estudos têm sido realizados acerca da determinação eletroquímica de H_2O_2 utilizando eletrodos modificados pela técnica LbL. Por exemplo, Lin *et al.*¹⁶⁹ construíram um filme LbL contendo nano bastões de ZnO e NPs de prata (NP-Ag) fotossintetizadas. Estes filmes designados AgNPs/ZnONRs/FTO foram aplicados como sensores amperométricos da detecção de H_2O_2 . Nestas medidas, o sensor exibiu excelentes atividades eletrocatalíticas atribuídas à presença de NPs no filme que no potencial aplicado de -0,55 V, forneceu um LD de $0,9\mu\text{mol L}^{-1}$ e uma sensibilidade igual a $152,1\text{ mA M}^{-1}\text{cm}^{-2}$.

Nos últimos anos a determinação de H_2O_2 tem sido bastante explorada utilizando biossensores preparados a partir da imobilização enzima oxidases em filmes LbL. A imobilização enzimática tem se mostrado atraente devido ao fato do H_2O_2 ser produzido em determinadas reações enzimáticas de oxidases como a glicose oxidase (GOx).

Um dos interesses pela determinação indireta da glicose pela oxidação do H_2O_2 gerado na reação enzimática é decorrente ao fato deste monossacarídeo ser a principal fonte de energia das células. A glicose é transportada via insulina na corrente sanguínea sendo que o corpo humano regula níveis de glicose na faixa de 4 a 8 mmol L^{-1} . No entanto em condições fisiopatológicas pode variar entre 2 a 30 mmol L^{-1} ¹⁸. Elevados níveis de glicose estão presentes em diabéticos, pois o metabolismo destes é incapaz de regular o nível de glicose. De acordo com a Organização Mundial da Saúde até o ano de 2000 havia cerca de 171 milhões de diabéticos e este número pode aumentar para 366 milhões até 2030¹⁸.

Neste sentido, a comunidade científica tem se esforçado bastante na busca do desenvolvimento de ferramentas que proporcionem o diagnóstico para o controle do diabetes a partir de técnicas de monitoramento contínuo, não invasivas, com alta precisão, de baixo custo, simplicidade de amostragem e testes, portabilidade e confiabilidade¹⁸.

2.4.2.1 Filmes LbL como biossensores enzimáticos na detecção de Glicose

A construção de biossensores enzimáticos tem sido o objetivo de muitas pesquisas desde que o primeiro conceito de biossensor enzimático foi proposto por Clark e Lyons em 1962¹⁷². Estes biossensores são obtidos pela imobilização de moléculas biológicas tais como enzimas¹⁷³, anticorpos¹⁷⁴ e DNA¹⁷⁵ na superfície de diferentes substratos.

Devido à alta velocidade de detecção e simplicidade, muitos biossensores amperométricos para glicose têm sido utilizados. Estes biossensores são baseados na imobilização da enzima glicose oxidase (GOx) e posterior detecção eletroquímica do H_2O_2 liberado na reação enzimática¹⁷⁶. Comparada com outras enzimas, a GOx é a mais utilizada na construção de biossensores decorrente sua alta especificidade e baixo custo de obtenção¹⁷⁷. No entanto, existem alguns problemas que devem ser contornados como baixa sensibilidade, baixa estabilidade e a estreita faixa linear de concentração detectada que podem impedir a detecção desejada¹⁷⁸.

Neste sentido, visando solucionar estas limitações e melhorar a capacidade sensorial destes dispositivos, muitas pesquisas têm sido realizadas almejando otimizar processos de obtenção dos biossensores. Dentre os estudos realizados destaca-se a adição na plataforma biossensorial de mediadores redox tais como ferroceno¹⁷⁵, azul da prússia¹⁷⁹, nanotubos de carbono^{180,181,182}, polímeros condutores¹⁸³ e NP-M^{184,185}.

Embora diversos estudos relatem a utilização de biossensores para glicose, a aplicação de nanobiossensores para detecção deste monossacarídeo é relativamente novo. As vantagens da aplicação destes nanobiossensores são alta sensibilidade, baixos LD e especificidade¹⁸. A utilização de NPs em biossensores permite a miniaturização, integração de biocomponentes, sistemas de transdução capazes de monitorar continuamente a glicose com dispositivos implantáveis de baixo custo utilizando pequenas quantidades de amostras de diabéticos¹⁸.

Outra vantagem da utilização de NPs na constituição de biossensores, é que NPs como as NPs-Pt são biocompatíveis e apresentam excelentes capacidades catalíticas para oxidação e redução de H_2O_2 . Esta propriedade se deve à maior superfície de área ativa promovida pela presença das NPs-Pt em relação ao metal *bulk*¹⁸⁶. Além disso, o fato das NP-Pt facilitarem a transferência de elétrons do H_2O_2 é muito atrativo para estudos envolvendo a construção de biossensores contendo oxidases tais como a GOx¹⁷⁹. Com intuito de evitar a aglomeração e manter as propriedades das NPs-Pt, estas geralmente são dispersas sobre um suporte condutor¹⁸⁶.

Dentre as técnicas de imobilização enzimática, a técnica LbL tem se destacado, pois o processo de imobilização ocorre num ambiente favorável, com pH e força iônica controlados, em solução aquosa. Estes fatores evitam a perda de atividade e a desnaturação da enzima¹⁸⁷. As outras técnicas convencionais como ligação covalente, *crosslinking*, aprisionamento em gel ou membranas, apresentam baixa reprodutibilidade e a deposição espacial é pouco controlada¹⁸⁸. A alta sensibilidade, potencial seletividade, baixo custo e possibilidade de

miniaturização e automação dos biossensores enzimáticos são alguns fatores responsáveis pela aplicação destes dispositivos analíticos em diferentes sistemas químicos e biológicos⁹⁹.

Wu *et al.*¹⁸⁹ descreveram uma nova estratégia para preparação de um biossensor para glicose pela obtenção de filmes LbL contendo quitosana (CS), NPs-Au, poli(alilamina) (PAA) e GOx sobre eletrodo de Pt. O biossensor contendo 6 bicamadas de (GOx/GNp/CS/GOx/GNp/PAA/Pt)₆ exibiu excelente resposta amperométrica num faixa de 0,5 a 1,6 mmol L⁻¹ e LD de 7.0 μM. Estes resultados indicaram que as NPs-Au proporcionaram um grande área superficial específica ancorando a GOx no filme LbL e providenciaram uma rápida transferência de elétrons com excelente condutividade.

Os filmes LbL contendo GOx têm sido utilizados como biossensores para detecção de glicose através de medidas eletroquímicas baseadas no sinal elétrico (corrente ou tensão) criado na oxidação da glicose a ácido glucônico promovida pela presença da GOx. O sinal amperométrico produzido é diretamente proporcional à concentração de glicose presente na amostra. A reação enzimática ocorre a partir da parte ativa da GOx, que consiste numa molécula orgânica complexa, a coenzima flavina adenina dinucleotídio (FAD) que é reduzida a FADH₂. Este é então oxidado pelo oxigênio molecular que possui um potencial de redução mais elevado (Figura 4). Na sequência o O₂ é reduzido a H₂O₂ que é detectado na superfície do eletrodo¹⁹⁰. Diversas pesquisas mostram que baixos limites de detecção, na faixa de 10⁻⁶ a 10⁻⁸ mol L⁻¹, são possíveis de se obter com biossensores contendo a GOx¹⁹¹.

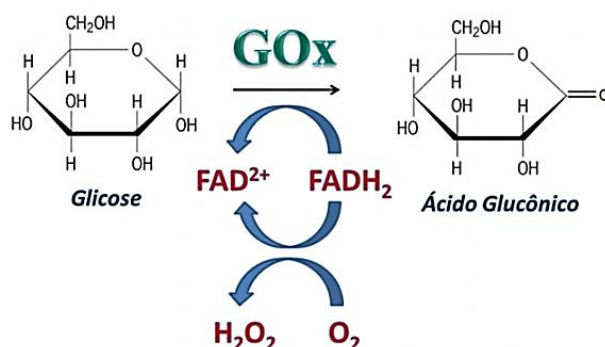


Figura 4 – Reação da GOx com glicose onde o FAD é reduzido à FADH₂ que é oxidado pelo O₂.

Wang *et al.*¹⁷⁸ construíram um biossensor de glicose imobilizando sobre GC nanotubos de carbono (MWCNTs) sulfonados, NPs-Pt e GOx pela técnica LbL. Visando uma maior dispersão dos MWCNTs sobre o GC foi acrescentado Nafion[®] sobre a superfície do eletrodo. Os autores verificaram que as NPs-Pt auxiliaram a atividade eletrocatalítica enzimática principalmente no eletrodo formado por 3 bicamadas de GOx/Pt/S-MWCNTs

exibindo uma sensibilidade de 1,36 $\mu\text{A}/\text{mM}$, faixa linear de 2,5mM e coeficiente de correlação de 0,972.

Muitos estudos têm evidenciado que a estrutura da GOx desempenha um papel essencial na atividade biocatalítica, por isso é importante que haja preservação na estrutura enzimática durante o processo de preparação do material a ser aplicado. Guiseppi-Elie *et al.*¹⁹² investigaram o efeito da ultra sonicação na estabilidade enzimática, conformação e atividade catalítica da GOx. Após sonicação da solução de GOx em tampão (23 kHz à 4 °C) durante períodos de tempo diferentes (10, 30, e 60 min), medidas de dicróismo circular (CD), espectroscopia de UV-Vis e análise termogravimétrica foram realizadas na solução de GOx após sonicação. Os espectros de CD revelaram alterações na estrutura α -hélice reduzida e a β -folha alongada da GOx sonicada, em relação a GOX não sonicada. Além disso, verificou-se na GOx sonicada uma diminuição na atividade enzimática. No entanto os autores verificaram que para minimizar estes problemas a sonicação deve ser realizada em temperaturas baixas.

É importante atentar sobre alguns cuidados que devem ser tomados durante o processo de incorporação enzimática na superfície de eletrodos, pois pode ocorrer diminuição ou até mesmo a perda da atividade. Além disso, a resistência difusional pode aumentar entre o meio reacional e o sítio ativo da enzima imobilizada. Neste sentido, a técnica LbL tem se mostrado fundamental em processos de imobilização enzimática na superfície de eletrodos, pois permite que enzimas sejam imobilizadas preservando suas propriedades. Além disso, a utilização de enzimas em solução na constituição dos biossensores se mostra economicamente inviável tendo em vista a impossibilidade de recuperação da enzima após uso¹⁹³. Sendo assim, a imobilização enzimática na superfície de eletrodos pode assegurar um método tecnologicamente viável para obtenção de biossensores.

Desta forma, o processo de imobilização de enzimas pela técnica LbL oferece algumas vantagens como o aumento na estabilidade da enzima impedindo sua desnaturação, a possibilidade de reutilização devido à recuperação da enzima e é economicamente viável¹⁹⁴. Também é importante ressaltar que a técnica LbL é vantajosa na imobilização enzimática tendo em vista que requer menos material biológico comparada as demais técnicas, permite o uso de soluções aquosas diminuindo a possibilidade de desnaturação e pode ser realizada em condições adequadas de temperatura e pH¹⁹⁵. Neste sentido, a utilização de filmes LbL contendo NPs-M pode ser uma excelente estratégia para incorporação enzimática de GOx.

Capítulo 3. OBJETIVOS

Esta tese teve por objetivo a investigação das interações existentes entre o híbrido formado pelo polímero SiPy^+Cl^- e NPs-Pt ($\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$), com os poliânions PVS e PPV- SO_3 quando imobilizados em filmes finos. A escolha do SiPy^+Cl^- deve-se à alta capacidade de troca aniônica, boa estabilidade química, alta solubilidade em água e capacidade de estabilizar nanopartículas metálicas. A exploração do híbrido formado com este polieletrólito foi importante para a avaliação das propriedades eletrocatalíticas dos filmes LbL preparados em diferentes arquiteturas, ou seja, com o $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ na parte externa e interna dos filmes. A potencialidade sensorial dos filmes formados por técnicas como a técnica LbL e a técnica *drop-coating*, foi avaliada na presença de DA em meio aos interferentes AA e AU, na forma livre, encapsulada em lipossomos e em amostra real de estriado cerebral de ratos, utilizando-se diferentes técnicas eletroquímicas. Além disso, visando explorar a versatilidade destes filmes como biossensores de H_2O_2 gerado na reação enzimática, propôs-se a imobilização da GOx na superfície eletródica. As informações das interações obtidas podem ser úteis no emprego desses filmes como matrizes para a imobilização de enzimas.

Capítulo 4. EXPERIMENTAL

4.1 Procedências dos reagentes e substratos utilizados

Os reagentes DA, o AA, o AU, o DPPC, o H_2PtCl_6 e a GOx (de *Aspergillus niger*, 155000 unidades/g) foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich. O ácido fórmico foi obtido comercialmente da Mallinckrodt. O polieletrólito SiPy^+Cl^- (BR9803053-A) foi sintetizado a partir do procedimento previamente descrito⁷.

Os substratos utilizados para preparação dos filmes foram obtidos comercialmente, sendo o FTO da Flexitec ($R_s = 10\text{--}20\ \Omega\text{m}$) e os eletrodos impressos de carbono com dimensões: $3,4 \times 1,0 \times 0,05\text{ cm}$ da DropSens (DRP-550).

4.2 Síntese e preparo das soluções

4.2.1 Síntese das nanopartículas de platina no SiPy^+Cl^-

A incorporação das NPs-Pt ao SiPy^+Cl^- foi realizada a partir de uma mistura de 10 mL de solução 2 mmol L^{-1} de H_2PtCl_6 , 10 mL de solução de SiPy^+Cl^- $0,5\text{ g L}^{-1}$ e 10 mL de ácido fórmico $0,1\text{ mol L}^{-1}$. Primeiramente foram misturadas as soluções de H_2PtCl_6 e SiPy^+Cl^- e após foi gotejada a solução do redutor ácido fórmico. Inicialmente a solução manteve a coloração amarela característica da solução do H_2PtCl_6 , e sequencialmente, depois de deixada durante 12 horas em agitação sob temperatura ambiente e sob proteção da luz, a mistura adquiriu uma coloração preta, indicando a formação de NPs-Pt. A Figura 5 ilustra um esquema desta reação.

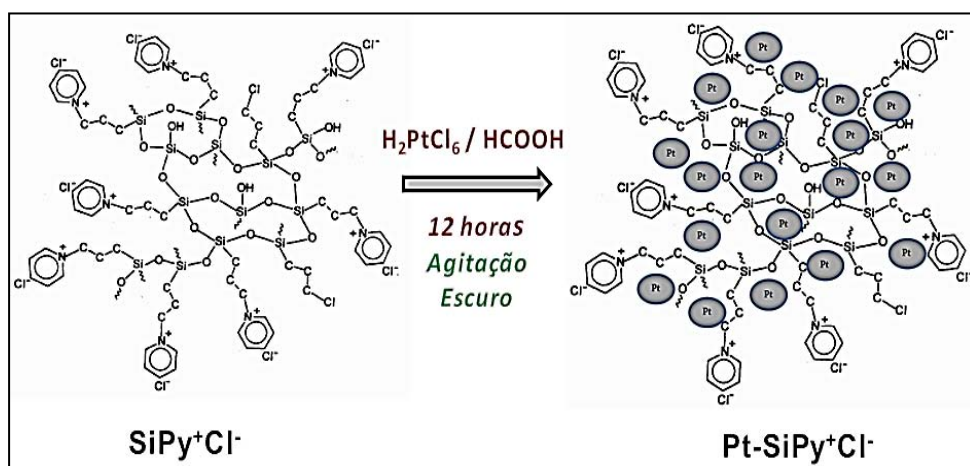


Figura 5- Esquema da estabilização das NPs-Pt no polímero SiPy^+Cl^- .

4.2.2 Preparação da solução da enzima GOx e analitos

A solução de GOx foi preparada numa concentração de 2 mg mL^{-1} em pH 7, em tampão fosfato salino (PBS) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e mantida sob refrigeração a 4°C .

Soluções estoques dos analitos H_2O_2 , DA, AA e AU foram obtidas na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e mantidas sob-refrigeração e proteção de luz a 4°C .

Em especial para as soluções de DA e H_2O_2 , a proteção de luz é extremamente importante, pois a oxidação da DA é intensificada pela ação da luz e o H_2O_2 se decompõem facilmente em H_2O e O_2 .

4.3 Procedimentos de limpeza e preparação dos filmes

4.3.1 Limpeza dos filmes LbL

Procedeu-se a limpeza dos substratos a partir da imersão dos mesmos em uma mistura de H_2O_2 , 20 volumes, NH_4OH e H_2O destilada, preparada na proporção de 1:1:5 (v/v) respectivamente, e mantida sob aquecimento durante 15 minutos¹⁹⁶. Em seguida, mergulharam-se os substratos no clorofórmio e no álcool isopropílico respectivamente sob aquecimento por 5 minutos. Repetiu-se o procedimento até verificação da limpeza total dos substratos.

4.3.2 Preparação dos filmes LbL

Utilizou-se o nanohíbrido $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ como policação na preparação de filmes LbL alternados com os poliânions PPV- SO_3 e PVS. A concentração das soluções de ambos os poliânions foi de $2,5 \text{ g L}^{-1}$ e os valores de pH das soluções foram de 2,9, 6,9 e 5,5 para $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, PVS e PPV- SO_3 , respectivamente, correspondentes aos pH das próprias soluções. Foram preparados filmes com as arquiteturas $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_n$, $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$, $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS})_n$ e $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ (onde n representa o número de bicamadas) pela imersão do substrato manualmente nas soluções dos precursores. O tempo de imersão do substrato nas soluções dos polieletrólitos foi de 4 minutos, e na solução de limpeza, com valores de pH ajustados para os mesmos valores dos pH dos polieletrólitos, foi de 10 segundos. Depois da deposição de cada monocamada secou-se o sistema substrato/filme com o auxílio de um soprador térmico. Foram utilizados os substratos de FTO, quartzo, silício e

prata (dispersão coloidal). A Tabela 4 sumariza os parâmetros experimentais da construção dos filmes LbL.

Tabela 4 – Parâmetros experimentais da preparação dos filmes LbL nas arquiteturas (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)_n, (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n, (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PVS)_n e (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n.

Polieletrólitos	pH	Concentração (g L ⁻¹)	Tempo de imersão (min)	Tempo de lavagem (s)
Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻	2,9	-----	4	10
PVS	6,9	2,5	4	10
PPV-SO ₃	5,5	2,5	4	10

4.3.3 Preparação dos filmes *drop-coated*

Filmes *drop-coated* de PPV-SO₃, PVS, SiPy⁺Cl⁻ e Pt-SiPy⁺Cl⁻, foram preparados gotejando-se as soluções de interesse sobre a superfície dos substratos de Si, para as medidas de infravermelho (FTIR) e sobre prata (dispersão coloidal), para as medidas de espalhamento Raman. As soluções gotejadas sobre os substratos foram deixadas sob a proteção da luz à temperatura ambiente até a evaporação total do solvente e consequentemente formação dos filmes.

Os filmes *drop-coated* obtidos sobre os eletrodos impressos foram preparados gotejando três vezes alternadamente as soluções de PPV-SO₃ (2,5 g L⁻¹) e de Pt-SiPy⁺Cl⁻ sobre eletrodos impressos de carbono e de platina na sequência PPV-SO₃/Pt-SiPy⁺Cl⁻. Os eletrodos obtidos, (C/PPV/SiPy⁺Cl⁻)₃, foram secos a vácuo.

4.3.4 Imobilização da enzima GOx nos filmes

A solução de GOx 2 mg L⁻¹ em PBS (pH 7), foi imobilizada sobre a superfície do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ durante 30 minutos à 4 °C, obtendo-se a arquitetura (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆GOx. O excesso da enzima que não adsorveu na superfície do filme foi removido pela imersão deste numa solução de 0,1 mol L⁻¹ de PBS, pH 7 por 1 minuto. Os filmes LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆GOx foram preparados e mantidos sob refrigeração (4 °C).

4.4 Preparação dos lipossomos L-DA

As vesículas lipossômicas foram preparadas conforme procedimento adaptado da literatura¹⁹⁷. Transferiu-se 20 mL de uma solução 1 mmol L⁻¹ do fosfolipídio DPPC em

clorofórmio para um tubo de ensaio e após, por cerca de 24 horas evaporou-se o solvente com o auxílio de um jato de nitrogênio, a fim de depositar o lipídio na forma de uma película sobre a parede do tubo. Após a evaporação, o fosfolipídio foi centrifugado a vácuo com uma ultracentrífuga refrigerada HITACHI modelo *HIMAC CR21GII*, por 20 minutos a 4°C, com intuito de remover vestígios finais do solvente. Posteriormente os filmes foram hidratados com solução de DA ($1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e NaNO_3 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 7. A solução de lipossomos contendo DA foi extensivamente misturada em ultra-som, durante 2 horas, a temperatura ambiente acima da fase de transição lipídica, para assim, obter as vesículas multilamelares (MLV). O excesso de DA não encapsulada, foi eliminado utilizando a coluna de tamanho de partícula (Sephadex G-75). O tamanho da vesícula foi caracterizado por espalhamento dinâmico de luz (DLS). A Figura 6 ilustra o esquema de preparação das vesículas lipossômicas.

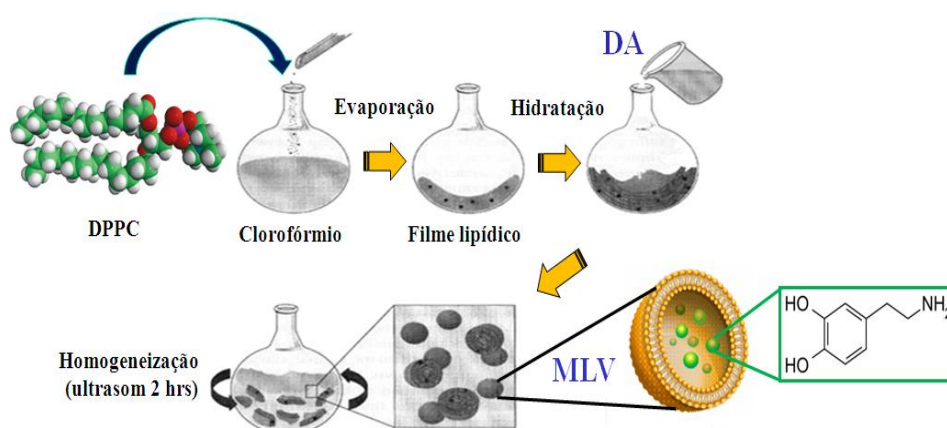


Figura 6 - Esquema de preparação das vesículas lipossômicas mostrando a dissolução do DPPC em clorofórmio, evaporação do solvente, hidratação do filme lipídico com solução de DA, homogeneização e formação dos lipossomos MLV.

4.5 Preparação das amostras de estriados cerebrais de ratos

Dois ratos Wistar machos adultos (aproximadamente 300 g) foram fornecidos pelo biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Os animais foram guilhotinados, seus cérebros foram removidos por inteiro e imediatamente dissecados sobre uma placa de petri em gelo. Com auxílio de pinças curvas, os corpos estriados dos dois hemisférios foram removidos, acondicionados em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e congelados em freezer - 80 °C até o momento da análise. Os tubos foram pesados vazios e com os estriados, para determinação da massa de material. Foram dissecadas duas amostras contendo dois estriados cerebrais de ratos, contendo 109,5 mg e 74 mg. Estas amostras foram homogeneizadas em

100 μL de solução de NaNO_3 0,1 mol L^{-1} , pH 7, por sonicação (Figura 7). Após a homogeneização as amostras foram submetidas à centrifugação com uma ultracentrífuga refrigerada HITACHI modelo *HIMAC CR21GII*, por 20 minutos refrigerada a 4°C, 20000 x g. A fase sobrenadante foi extraída e analisada nos estudos eletroquímicos para detecção de DA.

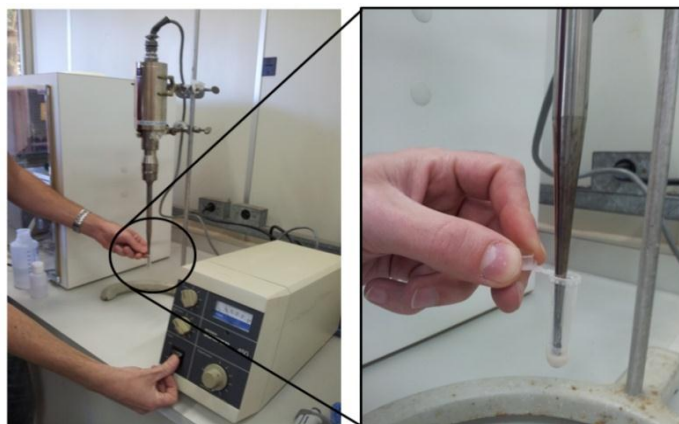


Figura 7 - Etapas da sonicação dos estriados cerebrais de ratos.

4.6 Caracterização dos filmes finos

4.6.1 Espectroscopia de Absorção na região do UV-Vis

As medidas de espectroscopia na região do UV-Vis foram realizadas em um espectrofotômetro CARY 50 BIO, disponível no laboratório do Grupo de Desenvolvimento de Eletrodos Modificados da UEPG (GDEM) para caracterização das soluções dos polieletrólitos, para realização da cinética da deposição dos filmes e para o monitoramento do crescimento dos filmes depositados em substratos de quartzo. As medidas de UV-Vis foram realizadas com as soluções dos precursores, PPV-SO_3 2,5 g L^{-1} , PVS 2,5 g L^{-1} , SiPy^+Cl^- 0,5 g L^{-1} e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$. Também foram realizadas medidas com as diferentes arquiteturas dos filmes $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$, $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_n$, $(\text{PVS/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS})_n$ monitorando-se a absorbância das bandas dos precursores dos filmes.

No estudo cinético de adsorção dos polieletrólitos PVS, PPV-SO_3 e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ obtido sobre substratos de quartzo, foram monitoradas as bandas de absorbância dos polieletrólitos presentes nos filmes LbL nas arquiteturas $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ e $(\text{PVS/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$, preparados em tempos variados de imersão nas soluções dos polieletrólitos (10 segundos a 10 minutos). A cada tempo pré-determinado a deposição era interrompida para obtenção dos espectros. A absorbância foi monitorada a cada espectro até verificar a saturação do processo de deposição.

4.6.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

A espectroscopia de absorção no infravermelho foi realizada no modo transmitância em filmes *drop-coated* de SiPy^+Cl^- , $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, PVS, PPV-SO₃, GOx e nos filmes LbL ($\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$)₃₀, ($\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV}$)₃₀, ($\text{PVS/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$)₃₀, ($\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS}$)₃₀ e ($\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$)₆GOx depositados sobre silício. O equipamento utilizado para essas medidas foi um espectroscópio SHIMADZU IR PRESTIGE 21, disponível no Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CLABMU).

4.6.3 Espectroscopia de espalhamento Raman

A espectroscopia de espalhamento Raman é baseada em transições entre estados energéticos vibracionais de moléculas induzidas por uma radiação eletromagnética incidente. Nesta técnica é aplicada ao sistema uma radiação mais energética que do infravermelho o que pode levar a ocorrência de dispersões. Os fótons interagem com a matéria proporcionando decaimentos radioativos de mesma energia (dispersão elástica ou de Rayleigh) ou de menor energia (dispersão inelástica ou de Raman). Diferente da espectroscopia na região de infravermelho que detecta somente transições que causam alterações no dipolo da molécula, a espectroscopia de Raman detecta transições que causam alterações de polarização na molécula¹⁹⁸. No entanto, é importante ressaltar que estas técnicas espectroscópicas vibracionais são complementares.

Neste trabalho foram realizadas medidas de Raman nos filmes *drop-coated* dos precursores, ou seja, SiPy^+Cl^- , $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, PVS e PPV-SO₃ e nos filme LbL ($\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$)₃₀, ($\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV}$)₃₀, ($\text{PVS/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$)₃₀ e ($\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS}$)₃₀, todos depositados sobre substrato de prata (dispersão coloidal). O equipamento utilizado para essas medidas foi o espectroscópio dispersivo Raman com microscopia ótica (Bruker Senterra), disponível no laboratório CLABMU da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

4.6.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As medidas de MET da solução do nanohíbrido $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão FEI-TECNAI 12 operando numa tensão de 100 KV. As imagens foram capturadas no programa *Imaging Soft System*. As amostras foram

colocadas sobre a tela de cobre (2 mm de diâmetro, 200 mesh) recoberta previamente com FORMVAR (poliacetato de vinila) e com cobertura de carbono em *SPUTTER COATER BALTEC SCD 050*. Tais medidas foram realizadas com o intuito de verificar a distribuição e o tamanho das NP-Pt formadas no nanohíbrido Pt-SiPy⁺Cl⁻. Estas medidas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica da Universidade Estadual de Londrina.

4.6.5 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS) é amplamente utilizada para determinar o diâmetro de partículas com dimensões nanométricas. Entre as aplicações da técnica está a determinação do tamanho de determinadas enzimas, NP metálicas, micelas, polímeros e lipossomos¹⁹⁹.

A técnica baseia-se na análise da variação de intensidade, durante um determinado tempo, da luz medida num ângulo fixo. Se o tamanho da partícula for da mesma ordem de magnitude de comprimento de onda da luz incidente, ocorre uma modificação na intensidade da luz em função do seu ângulo. Assim é possível determinar o diâmetro da partícula²⁰⁰.

O movimento aleatório das partículas em geral é denominado movimento Browniano. Quando as partículas são iluminadas, a intensidade da luz dispersa é dependente do tamanho das partículas, sendo que as menores movem-se mais rapidamente e as maiores mais lentamente. Portanto, o diâmetro hidrodinâmico das partículas pode ser medido pela intensidade do movimento Browniano destas partículas. Este diâmetro pode ser determinado pela equação de Stokes-Einstein (Equação 1).

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (1)$$

Na Equação 1 o **d(H)** é o diâmetro hidrodinâmico, **D** o coeficiente de difusão translacional, **k** a constante de Boltzman, **T** a temperatura absoluta e **η** a viscosidade¹¹⁶.

No trabalho de Moraes *et al.*¹⁶⁶ a técnica DLS foi usada para avaliar a distribuição e o tamanho dos lipossomos de DPPG que foram utilizados para a construção do filme LbL (PAMAM/DPPG)₁₂. Verificou-se que, assumindo o formato esférico para os lipossomos, o diâmetro dos lipossomos variou entre 20 e 400 nm com a maioria dos lipossomos com um tamanho médio de 120 nm.

No presente trabalho, foram obtidas medidas de DLS no equipamento *Zetatrac da Microtac* do laboratório do grupo de polímeros da USP de São Carlos do híbrido $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, para avaliar o diâmetro das NPs-Pt estabilizadas no SiPy^+Cl^- . Também foram realizadas medidas de DLS dos lipossomos DPPC e hidratados com solução de DA.

4.6.6 Potencial Zeta (ζ)

A maioria dos materiais quando em contato com um líquido adquirem uma carga elétrica superficial. O potencial zeta (ζ) pode ser considerado o potencial eletrostático gerado pela acumulação de íons na superfície de um material. É aplicado para determinação da carga de superfície de partículas como nanopartículas metálicas, enzimas e lipossomos. Uma camada elétrica se encontra organizada na superfície da partícula. Esta camada é organizada numa dupla camada, formada por uma região interna ou camada de Stern e a região externa ou camada difusa²⁰¹. Na região interna os íons estão fortemente ligados à superfície e na região externa os íons estão fracamente ligados à superfície. Há uma fronteira dentro da camada difusa em que íons e partículas formam uma entidade estável, denominada de plano deslizante e o potencial existente nesta fronteira é denominado de potencial zeta. A interação do campo elétrico com as partículas carregadas faz com que estas sejam atraídas para o eletrodo de carga oposta. Assim, é possível verificar a velocidade da partícula mediante o campo elétrico. Esta velocidade pode ser denominada de mobilidade eletroforética^{201,201}.

Medidas do ζ dos lipossomos de DMPC contendo DOPH (pró-fármaco de DA) no trabalho já descrito na seção 2.4.1.1, permitiram que Carafa *et al*¹⁶³ evidenciassem a estabilidade das suspensões da composição formulada em sistemas monodispersos com ζ negativo.

No presente trabalho foram realizadas medidas do ζ do híbrido $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ e dos lipossomos utilizando o equipamento MICROTAC ZETATRAC no IFSC/USP, São Carlos.

4.6.7 Microscopia de força atômica (AFM)

As imagens de AFM dos filmes LbL depositados sobre FTO, foram realizadas no laboratório CLABMU na Universidade Estadual de Ponta Grossa obtidas no equipamento SHIMADZU SPM – 99500-J3 no modo de contato, sensor de Si SPM recoberto com Al (NANOWORD) com espessura de 4 μm , comprimento de 125 μm , largura de 30 μm ,

frequência de 320 kHz, e força constante de 42 N/m. O software utilizado foi o SPM manager versão 3.03.

4.6.8 Dicroísmo circular (CD)

A espectroscopia de CD é uma medida da absorbância diferencial entre as duas rotações de luz circularmente polarizada por uma molécula assimétrica²⁰¹. Esta técnica permite verificar a estrutura secundária e terciária das enzimas, possíveis alterações estruturais, enrolamento e estabilidade dos fragmentos²⁰².

As estruturas secundárias apresentam espectros de CD característicos na região do UV (250 -190 nm) que corresponde à absorção dos grupos amida da cadeia peptídica da enzima²⁰³.

O CD realizado em enzimas fornece informações sobre as características da estrutura secundária, mas não fornece informações sobre as posições dos átomos na macromolécula. No entanto, é possível saber se ocorrem mudanças na conformação da enzima e consequentemente, relacionar as características do meio circundante como mudanças de temperatura, de pH e a presença de outras moléculas no solvente que são capazes de modificar a estrutura da enzima afetando a atividade biológica²⁰⁴.

O espectro de CD da estrutura α -hélice apresenta três transições características, sendo uma forte ocorrendo perpendicular ao eixo da hélice que é atribuída à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ (~191- 93 nm), uma fraca ocorrendo paralela ao eixo da hélice atribuída à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ (~208 -210 nm) e outra também paralela ao eixo da hélice atribuída à transição $n \rightarrow \pi^*$ (~222 nm). No entanto, o espectro de CD da estrutura β -folha apresenta duas transições características, sendo uma atribuída à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ (~ 90-200 nm) e outra atribuída à transição $n \rightarrow \pi^*$ (~210-225 nm)²⁰³.

Nesta tese, foram realizadas medidas de CD da solução de GOx 2 mg mL⁻¹ e dos filmes LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆GOx obtidos em diferentes tempos de imersão (5, 15 e 30 minutos), para caracterizar a estrutura conformacional da GOx em solução e imobilizada no substrato de quartzo. Estas medidas foram realizadas no equipamento JASCO J815 Spectrometer com 8 varreduras por medida, disponível no Laboratório de Biofísica do IFSC/USP.

4.7 Medidas eletroquímicas

Os voltamogramas cíclicos (VC), de pulso diferencial (VPD) e de onda quadrada (VOQ) dos filmes LbL contendo diferentes números de bicamadas de $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$, $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_n$, $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS})_n$ depositados sobre substrato FTO (com área de $0,6 \text{ cm}^2$), foram obtidos no potenciostato μ -AUTOLAB Tipo III (AUTOLAB/ECOCHEMIE), disponível no laboratório do GDEM/UEPG. Para estas medidas foi utilizada uma solução de NaNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7 como eletrólito suporte na detecção de DA, AA e AU, na faixa de concentração de $6,7 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Como eletrólito suporte na detecção de H_2O_2 , utilizou-se a solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7, na faixa de $8,6 \times 10^{-5}$ a $9,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Utilizou-se como referência o eletrodo normal de hidrogênio (ENH), como eletrodo auxiliar uma placa de Platina ($1,2 \text{ cm}^2$) e como eletrodo de trabalho o sistema FTO/filme ($0,6 \text{ cm}^2$).

Obtiveram-se os VC com velocidade de varredura de 30 e 50 mV s^{-1} sob temperatura ambiente. Parâmetros da voltametria de pulso diferencial, tais como o potencial de pulso aplicado (E_{pulse}), tempo de pulso (t_{pulse}) e velocidade de varredura (v) foram otimizados para realização das medidas. Os parâmetros instrumentais da VOQ, como frequência de aplicação de pulso de potencial (f), amplitude do pulso de potencial (a) e incremento de potencial (ΔE_s) foram otimizados de modo a permitir a construção de curvas analíticas e, a partir destas, calcular os limites de detecção e de quantificação.

Além das técnicas voltamétricas, realizaram-se medidas de cronoamperometria para determinação de H_2O_2 aplicando um potencial de $1,06 \text{ V}$ em intervalos de adição de 50 s, após 200 segundos de estabilização de corrente, a fim de avaliar a capacidade biossensora do filme LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6\text{GOx}$.

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foi obtida no potenciostato μ -AUTOLAB Tipo III (AUTOLAB/ECOCHEMIE), disponível no laboratório do GDEM. Foi empregada utilizando os filmes LbL contendo a arquitetura $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ com diferentes bicamadas ($n = 3, 6$ e 10). Os diagramas de Nyquist foram obtidos em potencial de circuito aberto, na presença de 5 mmol L^{-1} de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ dissolvidos em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_3 , pH 7, para os filmes LbL preparados e para o eletrodo sem modificação, FTO. Nos estudos de interação na interface dos filmes, utilizaram-se soluções de DA, AA e AU $1,0 \times$

$10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Os valores de resistência de transferência de carga (R_2) e capacitância (C_1) para os eletrodos testados foram determinados com o programa Zview.

As medidas eletroquímicas realizadas com os filmes *drop-coated* ($\text{C/PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$)₃ sobre eletrodos impressos de C e Pt, com dimensões de 3,4 x 1,0 x 0,05 cm da Drop-Sens (DRP-550), eletrodo de referência de *pseudo* prata e contra-eletrodo de Pt, foram realizadas no Laboratório de Bioeletroquímica e Interfaces do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP), utilizando-se um potenciostato μ -AUTOLAB Tipo III (AUTOLAB/ECOCHEMIE). Para estas medidas foi utilizada uma solução de NaNO_3 0,1 mol L^{-1} em pH 7 como eletrólito suporte na detecção de DA e AA em diferentes concentrações com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} sob temperatura ambiente. As soluções de DA e AA foram gotejadas sobre a superfície dos eletrodos de acordo o aparato experimental ilustrado na Figura 8.

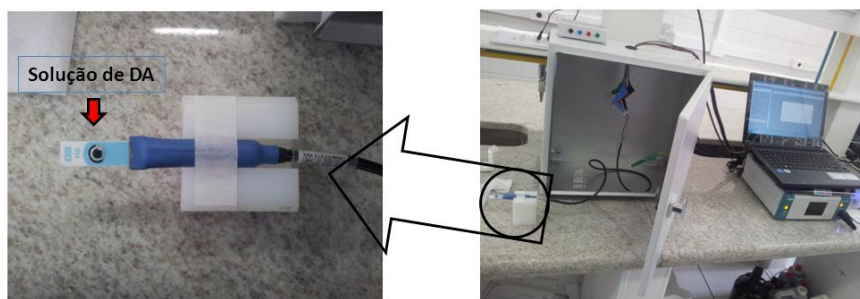


Figura 8- Aparato experimental utilizado para realização das medidas eletroquímicas utilizando o filme *drop-coated* ($\text{C/PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$)₃ contendo a solução de DA sobre a superfície.

Capítulo 5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Síntese das nanopartículas de platina no SiPy⁺Cl⁻

A formação das NPs-Pt estabilizadas no SiPy⁺Cl⁻ foi primeiramente monitorada pela redução da Pt(IV) para Pt(0) observada no espectro de UV-Vis do H₂PtCl₆. Para efeito de comparação, os espectros de UV-Vis das soluções de H₂PtCl₆, 2 mmol L⁻¹, SiPy⁺Cl⁻, 0,5 g L⁻¹ e ácido fórmico 0,1 mol L⁻¹ são ilustrados na Figura 9 (a). Como observado nesta figura, o início da redução da Pt(IV) a Pt metálica é seguido da diminuição na banda em 375 nm atribuída ao íon PtCl₆²⁻ do ácido cloroplatínico. Esta banda desaparece após 684 minutos comprovando a formação das NPs-Pt no SiPy⁺Cl⁻. O surgimento de uma solução de coloração preta (Figura 9 (b)) indica a formação de NPs-Pt. Resultados semelhantes são reportados na literatura como o estudo realizado por Crespilho *et al.*¹⁷ que monitorou a formação das NPs-Pt dentro do dendrímero PAMAM pela redução da banda do íon PtCl₆²⁻ em 375 nm.

Outra confirmação da formação de NPs-Pt foi obtida por medidas de MET. Conforme ilustrado nas Figuras 9 (c) e 9 (d) as imagens de MET do nanohíbrido Pt-SiPy⁺Cl⁻ obtidos a partir de H₂PtCl₆ 2 mmol L⁻¹, indicam boa distribuição das NPs-Pt estabilizadas no polímero SiPy⁺Cl⁻, com um tamanho variando entre 3 e 40 nm. No histograma da distribuição das NP-Pt no SiPy⁺Cl⁻ obtido por medidas de DLS (Figura 9 (b)) pode ser observado uma distribuição das NPs-Pt, com um tamanho entre 3 e 50 nm, com a maioria das NPs-Pt com um tamanho médio de 18,58 nm. Este tamanho é similar a outros de NPs-M reportadas^{205,206}, tal como num valor médio de 20 nm para NP-Pt obtida pelo método do poliol modificado, utilizando o nitrato de prata como um agente modificador estrutural²⁰⁷.

O valor positivo do potencial zeta (Figura inserida, 9 (b)), indicou a existência de estruturas com cargas positivas na estrutura do híbrido Pt-SiPy⁺Cl⁻.

Pelos resultados observados é possível constatar a eficiência do SiPy⁺Cl⁻ como estabilizante. A literatura reporta a utilização de diversas moléculas como estabilizantes para formação de NPs-M. Dentre estas, já é bem consolidado o uso de PAMAM para incorporação de NPs¹⁷. Este dendrímero possui estrutura bem definida, são macromoléculas monodispersas, altamente ramificadas, com estrutura química bem definida e versatilidade química possibilitando a formação de NPs monodispersas por um método relativamente simples em relação a outros métodos como o poliol⁷⁷, utilização de surfactantes⁶², rota de Brust⁷⁰ e rota metalorgânica⁷⁴.

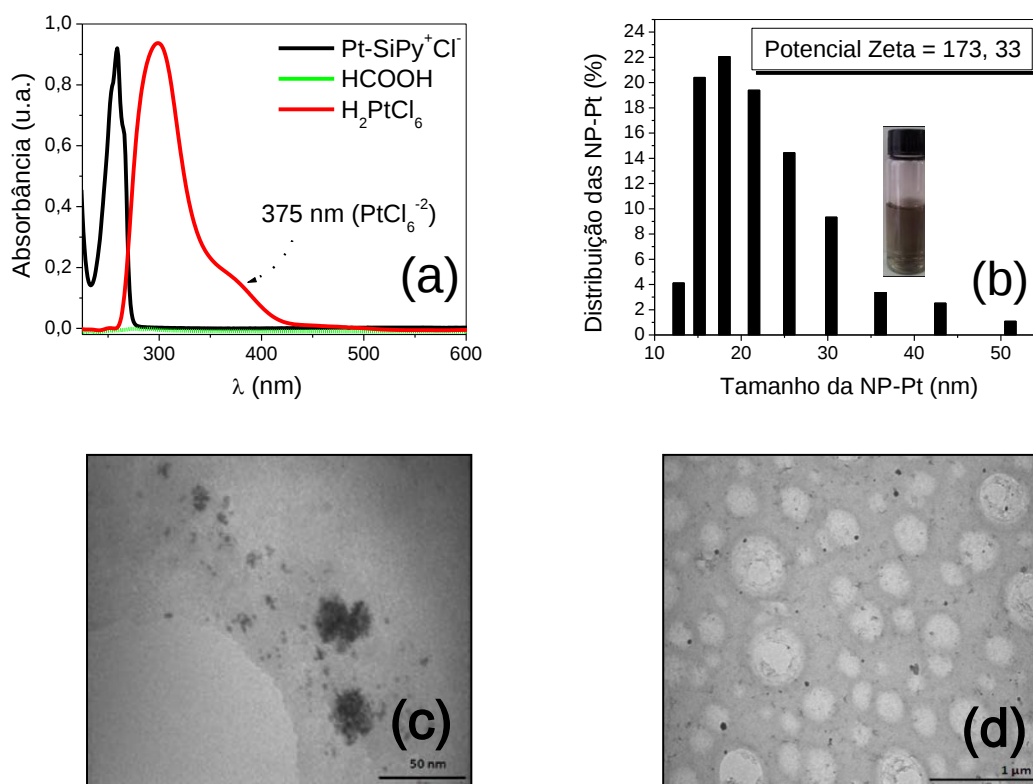


Figura 9 - (a) Espectros de UV-Vis das soluções de Pt-SiPy⁺Cl⁻, HCOOH 0,1 mol L⁻¹ e H₂PtCl₆ 2 mmolL⁻¹ (b) Distribuição de tamanho do Pt-SiPy⁺Cl⁻ (Imagem inserida em 16 d: solução de Pt-SiPy⁺Cl⁻). Imagens de MET do Pt-SiPy⁺Cl⁻ nas aproximações de (c) 23000 vezes e (d) 360000 vezes.

Até o presente momento, a literatura reporta três trabalhos sobre o uso deste silsesquioxano como estabilizante para formação de NPs-M. Dentre estes, dois deles são trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório e descrito nesta tese^{12,13}. Outro já descrito na seção 2.3, descreve a utilização do SiPy⁺Cl⁻ para estabilização de NPs-Au¹⁵. Os autores sintetizaram as NPs-Au misturando 10 mL de uma solução contendo 240 mg de SiPy⁺Cl⁻ com 2, 5 mL de HAuCl₄ 5 x 10⁻³ mol L⁻¹. Na sequência foi adicionado o agente redutor NaBH₄ 0,02 mol L⁻¹. Foram obtidas NPs-Au menores que 20 nm, sendo que a maioria estimada por medidas de DLS apresentaram 6,1 nm. O tamanho de NPs obtido nestes trabalhos está dentro da faixa de tamanho encontrada em outros métodos.

Portanto, a utilização de SiPy⁺Cl⁻ como estabilizante fornece à ciência um novo precursor para incorporação de NPs-M, que pode ser utilizado como um novo material nanoparticulado para obtenção de diversos dispositivos nanoestruturados.

5.2 Preparação e caracterização dos filmes LbL contendo as arquiteturas (PVS/Pt-SiPy⁺Cl)_n, (Pt-SiPy⁺Cl/PVS)_n, (PPV/Pt-SiPy⁺Cl)_n e (Pt-SiPy⁺Cl/PPV)_n.

Inicialmente foram obtidos espectros de UV-Vis das soluções dos precursores PVS, PPV-SO₃ e Pt-SiPy⁺Cl⁻ como ilustrado na Figura 10 (a). As estruturas dos polieletrólitos PPV-SO₃ e PVS são mostradas nas Figuras 10 (b) e 10 (c), respectivamente.

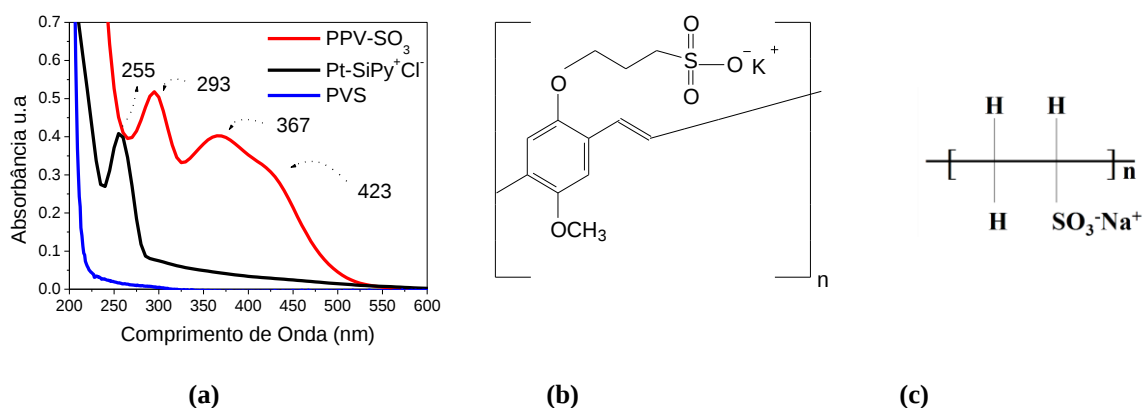


Figura 10 – (a) Espectros de UV-Vis das soluções de PVS (2,5 g L⁻¹), PPV-SO₃ (2,5 g L⁻¹) e Pt-SiPy⁺Cl⁻ (b) Estrutura do PPV-SO₃ e (c) Estrutura do PVS.

Verifica-se na Figura 10 (a), que o espectro do poliânion PVS, não exibiu banda de absorção na região compreendida entre 200 a 600 nm. No entanto, a solução do nanohíbrido Pt-SiPy⁺Cl⁻ apresentou uma banda de absorção em 258 nm, atribuída à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ dos grupos piridínicos do SiPy⁺Cl⁻ ^{1,9} enquanto a solução de PPV-SO₃, apresentou as bandas em 293 e 423 nm atribuídas às transições longitudinais $\pi \rightarrow \pi^*$ e 367 nm, atribuídas às transições transversais de estados deslocalizados nos grupos SO₃⁻ ²⁰⁸.

Após a caracterização espectroscópica por UV-Vis das soluções dos precursores dos filmes LbL, realizou-se a otimização do tempo de imersão dos substratos nas soluções dos polieletrólitos PPV-SO₃ e Pt-SiPy⁺Cl⁻, já que o PVS não exibiu bandas de absorção na região compreendida entre 200 e 600 nm. Esta otimização, foi obtida a partir do estudo cinético de adsorção, a fim de garantir uma maior quantidade de espécies adsorvidas na superfície dos substratos. Para isto, foram realizadas medidas de espectroscopia na região do UV-Vis de filmes LbL contendo a arquitetura (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃. Os filmes foram preparados em diferentes tempos (10 – 600 s) e o crescimento destes filmes foi monitorado pelas bandas de absorção em 255 nm (transição $\pi \rightarrow \pi^*$ dos grupos piridínicos da matriz SiPy⁺Cl⁻), pelas bandas em 293 e 423 (transições longitudinais $\pi \rightarrow \pi^*$ no PPV-SO₃) e pela banda em 367 nm

(transições transversais de estados deslocalizados nos grupos SO_3)²⁰⁸. A Figura 11 (a) ilustra os espectros de UV-Vis obtidos com os filmes obtidos em diferentes tempos na arquitetura $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$.

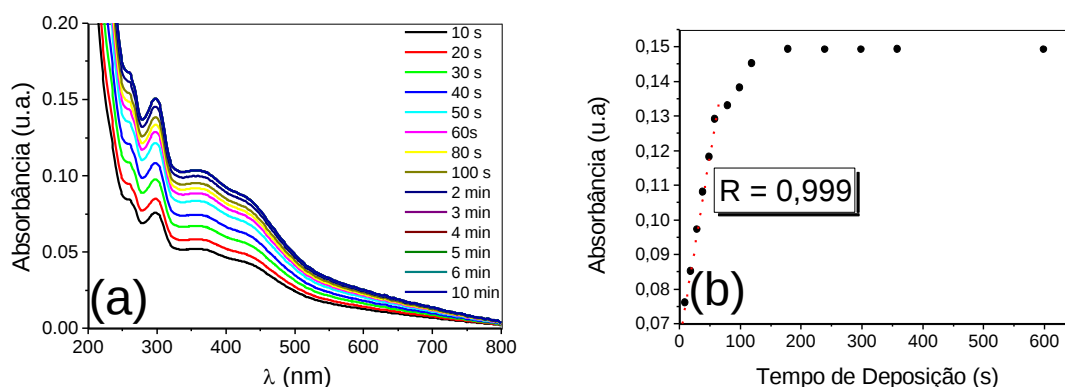


Figura 11- (a) Espectros de absorção na região do UV-Vis de filmes LbLs $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ obtidos em diferentes tempos; (b) gráfico de absorbância (293 nm) vs tempo de deposição.

Os filmes $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ foram preparados sobre a superfície de um mesmo substrato de quartzo a fim de padronizar o processo de adsorção. Sendo assim, após cada medida realizada o substrato era lavado para remoção das espécies e sequencialmente era preparado um novo filme LbL na arquitetura $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ num tempo diferente de imersão. Para esse processo de remoção foi utilizado uma mistura contendo a proporção de 1:1:5 de H_2O_2 , NH_4OH e H_2O destilada.

No gráfico da Figura 11 (b) é perceptível que a deposição das espécies na superfície do substrato no tempo de 10 a 60 segundos apresentou uma correlação linear ($R = 0,999$). No período de tempo de 1 a 3 minutos essa correlação diminuiu ($R = 0,987$) e no período de 3 a 10 minutos não houve variação da absorbância, indicando que se atingiu o máximo de espécies adsorvidas na superfície do substrato. Sendo assim, a preparação dos filmes LbL com a arquitetura $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ foi realizada no tempo de imersão de 3 minutos.

O monitoramento do crescimento das bicamadas dos filmes LbL nas arquiteturas, $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS})_n$, foi realizado por espectroscopia na região do UV-Vis, a partir do acompanhamento do aumento da absorbância da banda em 258 nm, atribuída à presença do $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, como mostrado na Figura 12.

As Figuras 12 (b) evidenciam um aumento linear ($R = 0,992$) para ambos os filmes à medida que as bicamadas são depositadas na superfície do substrato de quartzo. A partir destas observações é confirmado que a mesma quantidade de $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ é adsorvida na superfície do quartzo à cada bicamada depositada. No entanto, com a arquitetura $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$

/PVS)_n, verificaram-se valores de absorvância menores a cada bicamada depositada, em relação à arquitetura (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n. Este comportamento pode estar relacionado às interações entre os precursores e o substrato durante a primeira deposição, as quais influenciam na auto-organização sequencial no filme LbL. Portanto, quando a deposição se inicia com o PVS, é possível constatar maiores valores de absorvâncias nas deposições posteriores, provavelmente porque nesta sequência o PVS é melhor adsorvido na superfície do substrato do que o Pt-SiPy⁺Cl⁻.

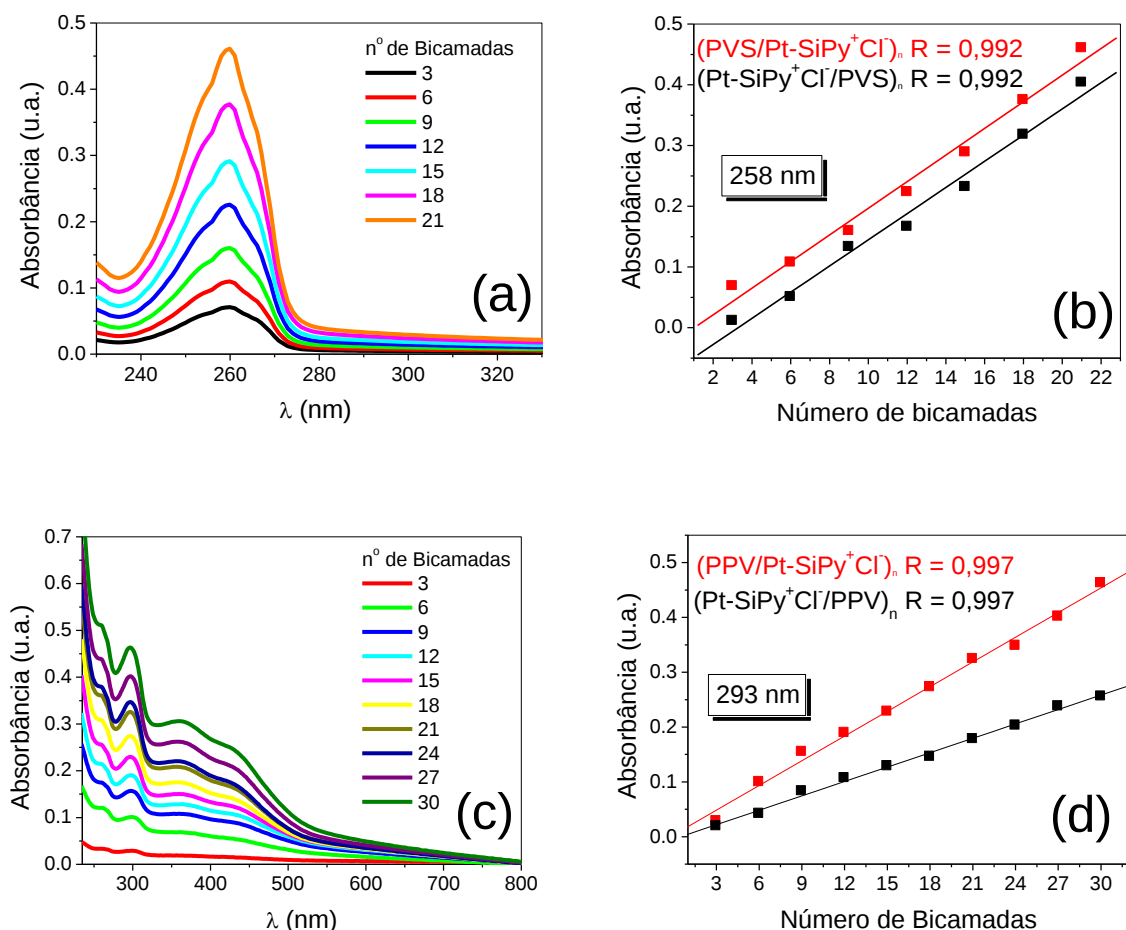


Figura 12- (a) Espectros de UV-Vis dos filmes LbL (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n contendo diferentes bicamadas; (b) Relação entre o número de bicamadas e a absorvância em 258 nm dos filmes LbL (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PVS)_n; (c) Espectros de UV-Vis dos filmes LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n contendo diferentes bicamadas; (d) Relação entre o número de bicamadas e a absorvância em 293 nm dos filmes LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)_n.

Um comportamento similar foi observado no monitoramento da deposição das bicamadas nos filmes LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)_n obtidos em diferentes bicamadas. Em ambos os espectros de UV-Vis dos filmes LbL, foi observada a presença das bandas do PPV-SO₃ em 293, 367 e 423 nm e do Pt-SiPy⁺Cl⁻ em 255 nm, confirmando a

presença destes sobre o substrato, como evidenciado nos espectros do filme $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ na Figura 12 (c). Além disso, foi evidenciado um crescimento linear em 293 nm ($R = 0,997$) para ambas arquiteturas (Figura 12 (d)).

Como observado nos filmes contendo PVS, foi verificado que para arquitetura $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$, houve uma maior absorbância das bandas do que as verificadas no espectro do filme $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_n$. Novamente, este comportamento foi atribuído a melhor organização do filme LbL contendo as NPs-Pt na parte externa.

Comparando-se as taxas de deposição para as diferentes arquiteturas, obtidas pela razão entre a variação de absorbância e a variação no número de bicamadas, pode-se observar que para os filmes $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS})_n$ as taxas de deposição apresentaram valores similares. No entanto, para os filmes $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_n$, foi constatado que a arquitetura $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ apresentou uma taxa cerca de 1,83 vezes maior em relação à observada para a arquitetura $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_n$.

Esta discrepância nas taxas de deposição para as diferentes arquiteturas pode estar diretamente relacionada às diferenças estruturais dos poliânions, pois o PPV-SO_3 apresenta uma estrutura mais ramificada contendo anéis aromáticos, enquanto o PVS contém uma cadeia mais linear. Estas diferentes estruturas podem influenciar na organização dos filmes a cada bicamada depositada e nas interações existentes entre os poliânions e o $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$. Para os filmes contendo PPV-SO_3 , verifica-se que houve deslocamento nas bandas do PPV-SO_3 (em solução) nos espectros dos filmes LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_n$ de 423 para 437 cm^{-1} , 367 para 360 cm^{-1} e 293 para 299 cm^{-1} (Figura 13). Estes deslocamentos ocorrem devido às interações existentes entre os precursores dos filmes.

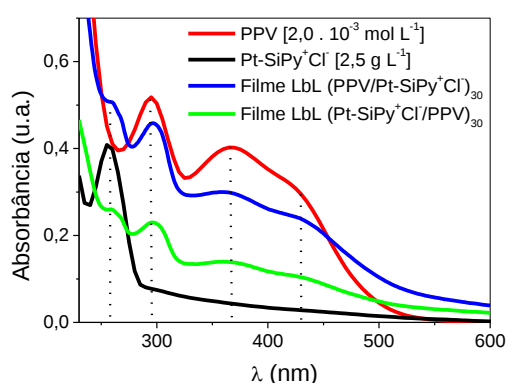


Figura 13- Espectros de UV-VIS da solução 2,5 g L⁻¹ de PPV-SO_3 , solução de $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ e dos filmes LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_{30}$ sobre quartzo.

Com intuito de confirmar a presença dos polieletrólitos nos filmes LbL (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PVS)₄₀ e (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₄₀ foram realizadas medidas espectroscópicas na região do infravermelho dos filmes *drop-coated* dos polieletrólitos precursores, PVS, SiPy⁺Cl⁻, Pt-SiPy⁺Cl⁻, e dos filmes LbL (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PVS)₄₀ e (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₄₀. Os espectros são ilustrados na Figura 14 e os modos vibracionais com seus respectivos números de onda são apresentados na Tabela 5.

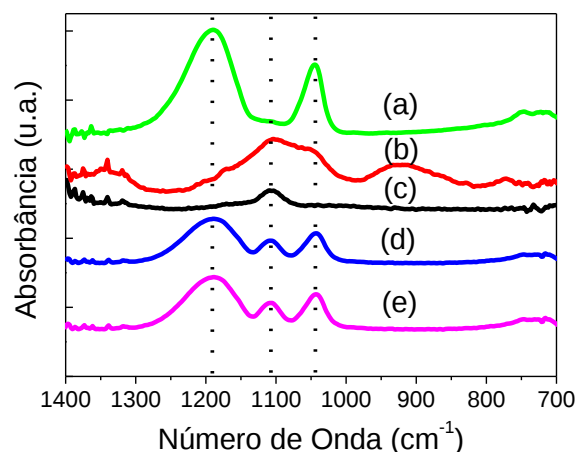


Figura 14- Espectros FTIR de (a) *drop-coated* do PVS, (b) *drop-coated* do SiPy⁺Cl⁻; (c) *drop-coated* do Pt-SiPy⁺Cl⁻; (d) filme LbL (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PVS)₄₀ e (e) filme LbL (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₄₀.

Tabela 5- Número de onda, grupos e modos vibracionais dos precursores PVS, SiPy⁺Cl⁻, e Pt-SiPy⁺Cl⁻ presentes nos filmes sobre o substrato de silício.

Grupos e modos vibracionais	nº de onda (cm ⁻¹) (deste estudo)	nº de onda (cm ⁻¹) (referências)	Ref.
ν assimétrico (S=O)	1191	1194	17
ν assimétrico (S=O)	1045	1049	17
Estrutura de gaiola (Si-O-Si)	1106	1130	209
Estrutura de rede (Si-O-Si)	1054	1030 – 1070	210
ν Si-C e δ (Si-O-Si)	820-980	800-1000	210

No espectro FTIR do SiPy⁺Cl⁻ (Figura 14 (b)), duas bandas largas de absorção do esqueleto Si–O–Si na região compreendida entre 1000 – 1250 cm⁻¹ são observadas. Estas são atribuídas à sobreposição das bandas dos estiramentos simétricos e assimétricos do esqueleto Si–O–Si (1054 e 1106 cm⁻¹, respectivamente)²¹⁰. A segunda banda na região entre 820 e 980 cm⁻¹ é atribuída aos diferentes modos vibracionais com uma larga contribuição das bandas relacionadas à deformação angular do grupo Si–C–H e da banda atribuída ao estiramento da ligação Si–C²¹¹. No entanto, devido à sobreposição destas bandas, não é possível uma

atribuição precisa. Estas bandas são características deste tipo de material e são semelhantes às encontradas em outros estudos envolvendo polímeros de silsesquioxanos^{209,210,211}.

As duas bandas de absorção localizadas no intervalo entre 1000 – 1250 cm^{-1} são características do esqueleto Si–O–Si devido à presença de dois tipos de estrutura, sendo a primeira em 1054 cm^{-1} atribuída à vibração da estrutura de rede e a segunda em 1106 cm^{-1} conferida à estrutura de gaiola do esqueleto Si–O–Si²¹⁰.

A estabilização das NP-Pt no SiPy^+Cl^- induz um forte decréscimo na intensidade da absorção característica nesta região (Figura 14 (c)) causando um desaparecimento das bandas na região entre 820 e 980 cm^{-1} e da banda do estiramento simétrico Si–O–Si da vibração de rede (1054 cm^{-1}). Além disso, a presença das NP-Pt reduz a intensidade da banda do estiramento assimétrico do esqueleto Si–O–Si da estrutura de gaiola (1106 cm^{-1})²¹⁰. Estas observações indicam que a estabilização das NP-Pt no polímero SiPy^+Cl^- provoca um impedimento nos modos vibracionais da estrutura do silsesquioxano, diminuindo os graus de liberdade e consequentemente ocasionando um decréscimo nos estiramentos ou deformações das ligações Si–O–Si, Si–C–H, e Si–C. O fato de somente o modo vibracional da estrutura de gaiola estar ativa pode indicar que embora os modos vibracionais do esqueleto SiPy^+Cl^- estejam estericamente impedidos, os grupos Si–O–Si próximos à superfície das NPs-Pt na gaiola se apresentam praticamente livres para vibrar.

Este tipo de alteração nos modos vibracionais causados por mudanças estruturais foi também observado no estudo com filmes formados a partir de um silsesquioxano polimérico submetido a um tratamento térmico que provocou alteração na intensidade das bandas em 1030-1070 e 1130 cm^{-1} , atribuídas respectivamente à estrutura de rede e estrutura de gaiola do esqueleto Si–O–Si. Este fato foi atribuído pelos autores às mudanças estruturais na cavidade e na estrutura de rede do silsesquioxano estudado²¹⁰.

Além disso, é importante observar que o desaparecimento da maior parte das bandas atribuídas ao esqueleto de Si indicou que as interações entre os PtNPs e o SiPy^+Cl^- apresentam apenas uma natureza estérica, pois a existência de interações químicas deveriam proporcionar deslocamentos nas bandas características da matriz assim como o aparecimento de novas bandas, de acordo com o observado em outros trabalhos^{17,87}.

Os espectros de FTIR dos filmes $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS})_{40}$ (Figura 14 (d)) e $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{40}$ (Figura 14 (e)), confirmaram a presença dos polieletrólitos PVS (Figura 14 (a)) e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ (Figura 14 (c)). Os espectros dos filmes mostraram as bandas características do PVS em 1191 e 1045 cm^{-1} atribuídas aos estiramentos assimétricos do grupo S=O^{17,212} e a

banda característica do $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ em 1106 cm^{-1} atribuída ao estiramento assimétrico do grupo Si-O-Si^{213} . No entanto não foram observados deslocamentos significativos nas bandas dos precursores após a deposição nos filmes LbL.

As caracterizações espectroscópicas vibracionais dos filmes LbL $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_n$ por FTIR no modo de transmissão foram comparadas aos filmes das espécies precursoras, *drop-coated* de PPV-SO_3 , *drop-coated* de SiPy^+Cl^- e *drop-coated* de $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ (Figura 15). No espectro do filme *drop-coated* de PPV-SO_3 (Figura 15 (a)) as bandas em 1189 e 1048 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos simétricos e assimétricos do grupo (S=O) , respectivamente¹⁷.

Da mesma forma que nos filmes LbL contendo PVS e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, neste estudo também comprovou-se a incorporação das NPs-Pt pelo desaparecimento das bandas do SiPy^+Cl^- na região entre 820 e 980 cm^{-1} (Figura 14 (c)) e pela diminuição na intensidade da banda em 1103 cm^{-1} atribuída à estrutura de gaiola do grupo Si-O-Si^{209} .

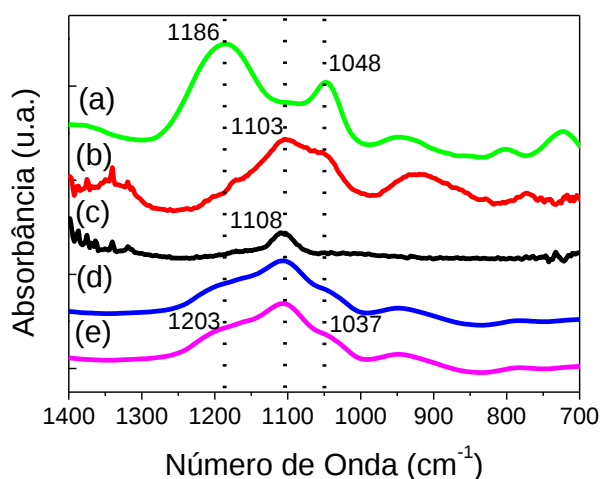


Figura 15- Espectros de FTIR dos filmes (a) *drop-coated* de PPV-SO_3 , (b) *drop-coated* de SiPy^+Cl^- , (c) *drop-coated* de $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, (d) LbL de $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$ e (e) LbL de $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_{30}$.

A confirmação da presença dos precursores PPV-SO_3 e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ nos espectros dos filmes LbL $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$ (Figura 15 (d)) e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_{30}$ (Figura 15 (e)) é comprovada pela existência das bandas do PPV-SO_3 em 1048 e 1189 cm^{-1} atribuídas respectivamente aos estiramentos assimétrico e simétrico do grupo S=O^{215} e das bandas do $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ em 1108 cm^{-1} atribuídas ao estiramento assimétrico do grupo Si-O-Si^{209} .

Foi observado que as bandas em 1048 e 1186 cm^{-1} do PPV-SO_3 (Figure 15 (a)) foram deslocadas de 1048 para 1037 cm^{-1} e de 1186 para 1203 cm^{-1} , respectivamente nos espectros

dos filmes LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃₀ e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)₃₀. Estes deslocamentos ocorrem devido à interação entre os grupos negativos (SO₃⁻) do PPV-SO₃ e os anéis piridínicos (carregados positivamente) do Pt-SiPy⁺Cl⁻ existentes nos filmes LbL. Estudos semelhantes foram observados para filmes LbL contendo ftalocianinas sulfonadas de cobre com SiPy⁺Cl⁻⁹, PANI com ftalocianinas sulfonadas²¹⁴, e Pt-PAMAM com PVS¹². Nestes trabalhos também foram observados deslocamentos de bandas dos precursores dos filmes os quais foram atribuídos às interações existentes nos filmes entre as espécies depositadas.

As medidas de FTIR nos mostraram maiores deslocamentos nas bandas dos filmes LbL contendo PPV-SO₃ e Pt-SiPy⁺Cl⁻ em relação aos filmes contendo PVS e Pt-SiPy⁺Cl⁻. Estes resultados corroboram com as medidas de UV-Vis onde as maiores interações foram evidenciadas nos filmes contendo PPV-SO₃, estrutura mais ramificada, em relação aos filmes contendo PVS, estrutura mais linear.

Tendo em vista à complementaridade das técnicas espectroscópicas de FTIR e Raman, visando verificar modos vibracionais não observados nos espectros de FTIR, foram realizadas medidas de espalhamento Raman dos filmes nas diferentes arquiteturas.

Inicialmente foram obtidos espectros de Raman dos filmes *drop-coated* de PVS, *drop-coated* de SiPy⁺Cl⁻, *drop-coated* de Pt-SiPy⁺Cl⁻ e dos filmes LbL (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PVS)₃₀ e (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃₀ depositados sobre substrato de prata (dispersão coloidal) (Figura 16 (a-e)).

O espectro Raman dos filmes *drop-coated* de SiPy⁺Cl⁻ (Figura 16 (b)) e *drop-coated* de Pt-SiPy⁺Cl⁻ (Figura 16 (c)) apresentaram as bandas em 1028 cm⁻¹ (forte) e 646 cm⁻¹ (média), respectivamente, atribuídas ao modo de respiração do anel de piridínio e a deformação no plano do mesmo anel²¹⁵. Ainda destas bandas, notou-se uma maior intensidade nos espectros dos filmes LbL em relação ao filme *drop-coated* do SiPy⁺Cl⁻ Figuras 16 (d) e (e). Esta observação indica que a automontagem entre o PVS e o Pt-SiPy⁺Cl⁻ nos filmes LbL fornece uma maior quantidade de material na superfície do substrato devido à maior organização nestes filmes¹⁶. A presença do PVS nos filmes *drop-coated* e filmes LbL é confirmada pela banda em 1065 cm⁻¹ atribuída ao estiramento S = O²¹⁶, (Figura 16 (a), (d) e (e)). No entanto, não foram observados deslocamentos das bandas dos precursores no espectro do filme LbL.

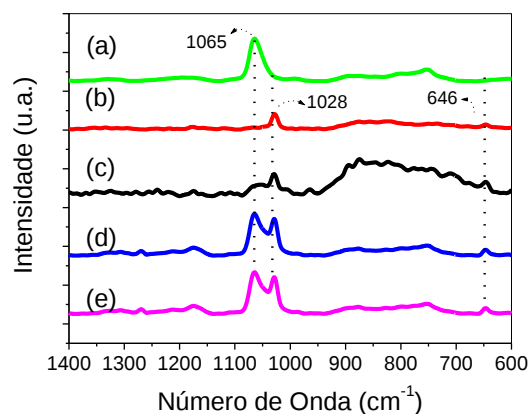


Figura 16- Espectros Raman dos filmes de : (a) *drop-coated* PVS (b) *drop-coated* SiPy⁺Cl⁻, (c) *drop-coated* Pt-SiPy⁺Cl⁻, (d) filme LbL (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃₀ e (e) filme LbL (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PVS)₃₀.

Os espectros de espalhamento Raman dos filmes *drop-coated* contendo SiPy⁺Cl⁻, Pt-SiPy⁺Cl⁻ e PPV-SO₃ e do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃₀, depositados sobre substrato de prata, são ilustrados na Figura 17. Novamente, os espectros do SiPy⁺Cl⁻ e do Pt-SiPy⁺Cl⁻ mostraram as bandas em 1028 cm⁻¹ (forte) e 648 cm⁻¹ (média), atribuídas respectivamente ao modo de respiração do anel piridínio e à deformação no plano do mesmo anel²¹⁵. Os espectros de Raman do PPV-SO₃ apresentam as bandas em 354, 1047, 1197 e 1317 cm⁻¹, atribuídas respectivamente à deformação do anel no plano, deformação C-H do anel benzênico no plano, estiramento simétrico do ânion SO₃ e estiramento simétrico C-C do grupo vinílico^{215,216}. A presença destas bandas dos precursores no filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃₀, assim como a verificação de deslocamentos de bandas nos espectros Raman (Figura 17 (—)) confirmam as interações existentes entre o PPV-SO₃ e o nanohíbrido (Pt-SiPy⁺Cl⁻) (Tabela 6).

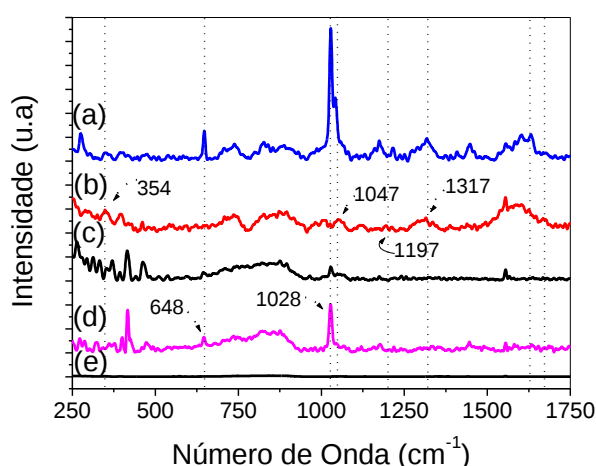


Figura 17- Espectros de espalhamento Raman para os (a) filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃₀ (b) filme *drop-coated* de PPV-SO₃ (c) filme *drop-coated* de Pt-SiPy⁺Cl⁻, (d) filme *drop-coated* de SiPy⁺Cl⁻ e (e) substrato de Ag.

Tabela 6- Bandas observadas nos espectros Raman dos filmes *drop-coated* de SiPy^+Cl^- , $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ e PPV-SO_3 e do filme LbL ($\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$)₃₀.

Bandas (cm^{-1})	(PPV-SO_3) <i>drop</i>	(SiPy^+Cl^-) <i>drop</i>	($\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$) <i>drop</i>	($\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$) ₃₀ LbL
Modo de respiração do anel piridínio	-----	1028 cm^{-1}	1028 cm^{-1}	1026 cm^{-1}
Deformação no plano do anel piridínio	-----	645 cm^{-1}	644 cm^{-1}	648 cm^{-1}
Deformação no plano do anel benzênico	1317 cm^{-1}	-----	-----	1317 cm^{-1}
ν simétrico C-C do vinil	354 cm^{-1}	-----	-----	351 cm^{-1}

Novamente foi constatado por Raman, maiores interações ocorrendo nos filmes LbL contendo PPV-SO_3 ao invés de PVS, pois nas arquiteturas contendo PPV-SO_3 , foram observados deslocamentos nas bandas dos precursores (Tabela 6), diferentemente do observado para as arquiteturas contendo PVS.

Com intuito de verificar a morfologia superficial dos filmes sobre a superfície de FTO, foram realizadas medidas de AFM com os filmes LbL nas diferentes arquiteturas.

A Figura 18 ilustra as imagens de AFM das arquiteturas $(\text{PVS/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ ($n = 12, 20$ e 30 bicamadas) (Figura. 18 (a–c)) e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS})_5$ (Figura 18 (d)). Notou-se de modo geral que todos os filmes revelaram uma morfologia globular similar a observada nos filmes LbL de $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc9}$ e Pt-PAMAM/PVS^{12} . As rugosidades médias destes filmes são listadas na Tabela 7.

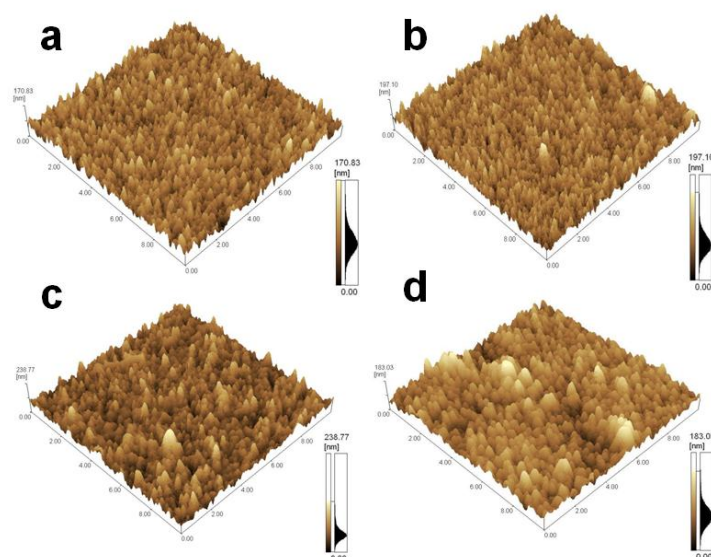


Figura 18- Imagens de AFM dos filmes LbL de (a) $(\text{PVS/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{12}$, (b) $(\text{PVS/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{20}$, (c) $(\text{PVS/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$, e (d) $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS})_5$.

Tabela 7 - Rugosidade média (RMS) do substrato FTO e dos filmes LbL (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n contendo 5, 12, 20 e 30 bicamadas e do filme LbL (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PVS)₅.

Número de bicamadas	Rugosidade (RMS) (nm) (10x10 μm)
FTO	34,433
(PVS/ Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₅	24,024
(PVS/ Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₁₂	19,553
(PVS/ Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₂₀	22,598
(PVS/ Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃₀	27,656
(Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻ /PVS) ₅	24,584

É possível observar um aumento na rugosidade do filme (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n contendo 12 bicamadas (19,553 nm) até o filme contendo 30 bicamadas (27,656 nm). No entanto, é importante ressaltar que durante a deposição das primeiras camadas, as moléculas são depositadas aleatoriamente até o recobrimento total da superfície do substrato e desta forma diminuindo gradativamente a rugosidade do substrato FTO. Esta diminuição pode ser explicada pela mudança da natureza da superfície, pois para o FTO tem-se uma superfície mais dura do que a observada após a deposição dos polieletrólitos. Esta mudança de superfície acarreta uma diminuição na rugosidade na deposição das primeiras camadas verificada comparando a rugosidade da superfície do substrato FTO (34,433 nm) com a rugosidade dos filmes contendo 5 (24,024 nm) e 12 (19,553 nm) bicamadas. Uma vez que as camadas são depositadas, as moléculas adsorvidas formam agregados que provocam um aumento na rugosidade e no tamanho dos grãos à medida que o número de bicamadas aumenta de 12 para 30 bicamadas. Resultados semelhantes foram obtidos para o filme LbL (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc LbL)_n⁹.

Um comportamento semelhante foi observado para as arquiteturas contendo PPV-SO₃. A investigação morfológica dos filmes LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n (n = 5, 10, 15 e 20 bicamadas) depositados sobre lâmina de FTO foi analisada por medidas de AFM (Figura 19).

Destas imagens observou-se uma distribuição homogênea dos grãos de superfície no filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₅ (Figura 19 (a)) e mais heterogênea nos filmes com maiores números de bicamadas (n = 10, 15 e 20) (Figuras 19c-d), onde surgem pequenos aglomerados. Esta constatação é feita com base nos valores de rugosidade média quadrática (Rq), que apresenta um valor baixo de Rq (11,371 nm) para o filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₅ e valores um pouco

superiores para os filmes LbL contendo 10, 15 e 20 bicamadas (12,662, 13,177 e 14,769 nm, respectivamente), como ilustrados nas Figuras 19 (b-d) e apresentados na Tabela 8.

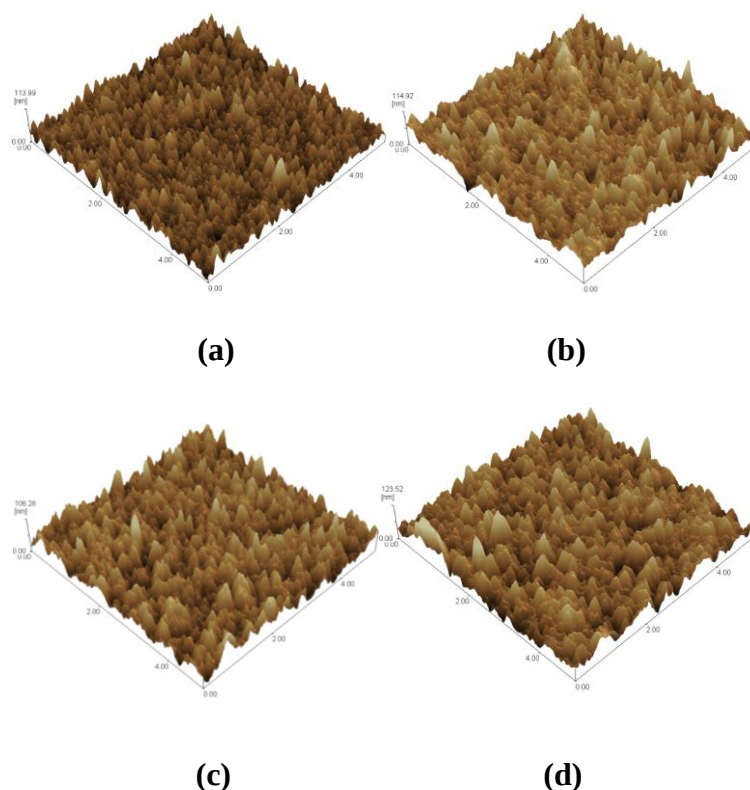


Figura 19- Imagens morfológicas de AFM dos filmes LbL (a) $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_5$, (b) $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{10}$, (c) $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{15}$ e (d) $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_{20}$. A janela de varredura para as imagens foi de $5.5 \mu\text{m}$.

Tabela 8- Rugosidade média dos grãos (nm) da superfície do FTO, dos filmes LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ contendo 5, 10, 15 e 20 bicamadas e do filme LbL $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_5$.

Número de bicamadas	Rugosidade (RMS) (nm) ($10 \times 10 \mu\text{m}$)
FTO	14,86
$(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_5$	11,371
$(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{10}$	12,662
$(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{15}$	13,177
$(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{20}$	14,769
$(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PPV})_5$	11,437

Quando se compara a rugosidade média dos grãos de superfície do substrato FTO (14,86 nm), é perceptível que a deposição dos precursores PPV-SO_3 e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ diminui essa rugosidade, pois além da mudança na natureza de superfície, os polieletrólitos se

depositam nos espaços existentes entre os grãos, preenchendo-os. Porém, à medida que as bicamadas são depositadas, a rugosidade dos filmes LbL tende aumentar novamente, devido à auto-organização que ocorre entre os polieletrólitos. Resultados similares a estes foram obtidos para os filmes LbL (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n, bem como para os filmes (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)_n no trabalho de Jesus et al⁹.

5.3 Caracterização eletroquímica dos filmes (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n, (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PVS)_n, (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)_n

Foram obtidos voltamogramas cíclicos do substrato FTO e dos filmes LbL contendo as arquiteturas (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n, (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PVS)_n, (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)_n utilizando como eletrólito suporte uma solução de NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ em pH na janela de potencial de 0 a 1,4 V. Como pode ser observado na Figura 20, tanto o FTO, quanto os filmes testados, não apresentaram processo redox definido na janela de potencial investigada.

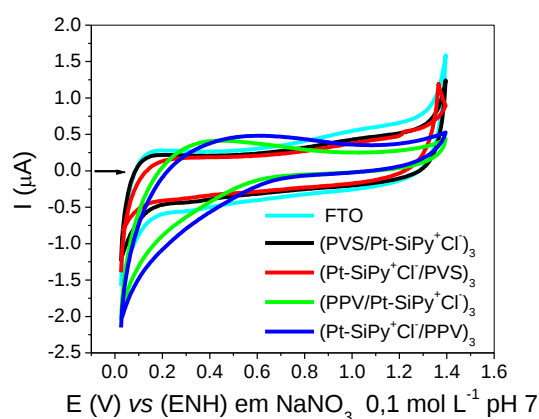


Figura 20- Voltamogramas cíclicos do FTO e dos filmes LbL (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n, (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PVS)_n, (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)_n, em pH = 7 na presença de 0,1 mol L⁻¹ de NaNO₃ ($\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$).

5.3.1 Detecção eletroquímica de DA com os filmes de PVS e Pt-SiPy⁺Cl⁻

Com intuito de avaliar as propriedades eletroquímicas das diferentes arquiteturas dos filmes LbL, foram obtidos voltamogramas cíclicos dos filmes LbL (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PVS)₃ e filme *drop-coated* (Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de DA (1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹) em pH 7, como ilustrado na Figura 21.

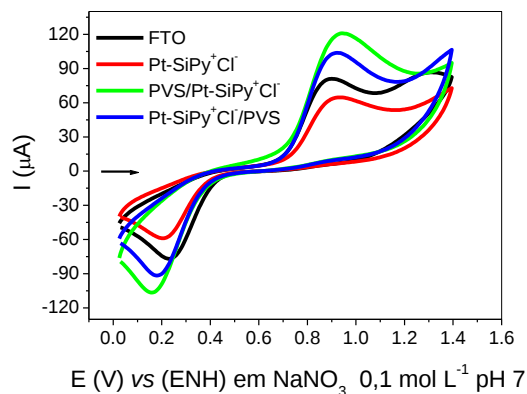


Figura 21- Voltamogramas cíclicos do FTO e dos filmes LbL (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PVS)₃ e filme *drop-coated* (Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ sobre FTO, em pH = 7 na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ DA ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$).

Ao comparar os voltamogramas obtidos dos filmes LbL com o voltamograma do FTO na presença de DA (Figura 21), é possível observar que todos estes eletrodos, (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PVS)₃, (Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e FTO, forneceram apenas um processo redox, atribuído à oxidação da dopamina para dopaminaquinona, com o envolvimento de 2 elétrons²¹⁷, em potenciais de oxidação muito próximos (0,93, 0,92, 0,92, e 0,90 V, respectivamente). No entanto a oxidação da DA ocorre com diferentes intensidades de corrente. As maiores correntes de pico anódicas foram obtidas para os filmes (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PVS)₃ ($I_{pa} = 121,50 \text{ } \mu\text{A}$ e $I_{pa} = 104,22 \text{ } \mu\text{A}$, respectivamente) em relação ao FTO ($I_{pa} = 81,25 \text{ } \mu\text{A}$) e o (Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ ($I_{pa} = 65,43 \text{ } \mu\text{A}$). Estes resultados mostram que a presença do PVS na arquitetura do eletrodo é fundamental para detecção de DA, pois o PVS alternado com o Pt-SiPy⁺Cl⁻ promove uma melhor organização no filme LbL disponibilizando maior quantidade de NPs-Pt sobre o substrato FTO, o que acarreta em uma maior corrente de oxidação para a DA em relação à oxidação verificada para o filme *drop-coated* (Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ ($I_{pa} = 65,43 \text{ } \mu\text{A}$) sem a presença de PVS.

Outro fato a ser destacado é a importância das NPs-Pt na superfície destes eletrodos para o aumento da intensidade de corrente de oxidação de DA, já que o PVS e o SiPy⁺Cl⁻ não são eletroativos como observado em estudo preliminares¹² para filmes contendo apenas estes compostos. No entanto, é importante ressaltar que embora o PVS não seja eletroativo, a presença deste polímero na constituição dos filmes LbL é fundamental para contrabalancear as cargas positivas do Pt-SiPy⁺Cl⁻ e consequentemente auxiliar a auto-organização estrutural dos filmes LbL.

Nas mesmas condições experimentais, também é possível verificar que a sequência de deposição dos polieletrólitos influencia diretamente na intensidade de corrente de oxidação de DA. Nota-se que a intensidade de corrente obtida com o filme $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ é maior ($I_{pa} = 120 \mu\text{A}$) do que a obtida com o filme $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS})_3$ ($I_{pa} = 104 \mu\text{A}$). A maior corrente observada para o filme $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ se deve à presença de NPs-Pt na superfície externa no eletrodo, a qual facilita o processo de transferência de elétrons. Por outro lado, a menor corrente verificada para o filme $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS})_3$ revela que ao invés das NPs-Pt o PVS se encontra mais exposto à solução de DA na cela eletroquímica.

Quando comparados os perfis voltamétricos obtidos com os filmes LbL $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ e $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS})_3$ ($I_{pa} = 121,50$ e $104,22 \mu\text{A}$), respectivamente, também nota-se que estes forneceram maiores correntes de oxidação para a DA em relação ao eletrodo sem modificação, FTO, ($I_{pa} = 81,25 \mu\text{A}$). Isto nos confirma a importância da técnica de automontagem no processo de modificação do eletrodo FTO para construção de sensores para detecção de DA.

Tendo observado que as melhores respostas eletroquímicas para oxidação da DA foram verificadas com o eletrodo contendo as NPs-Pt na parte externa, visando avaliar a dependência da resposta eletroquímica para oxidação de DA com a arquitetura $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ com diferentes bicamadas, foram preparados filmes LbL contendo, 1, 3, 6, 9 e 12 bicamadas. As Figuras 22 (a) e 22 (b) ilustram respectivamente os voltamogramas cíclicos e de pulso diferencial obtidos com estes filmes numa concentração de DA ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

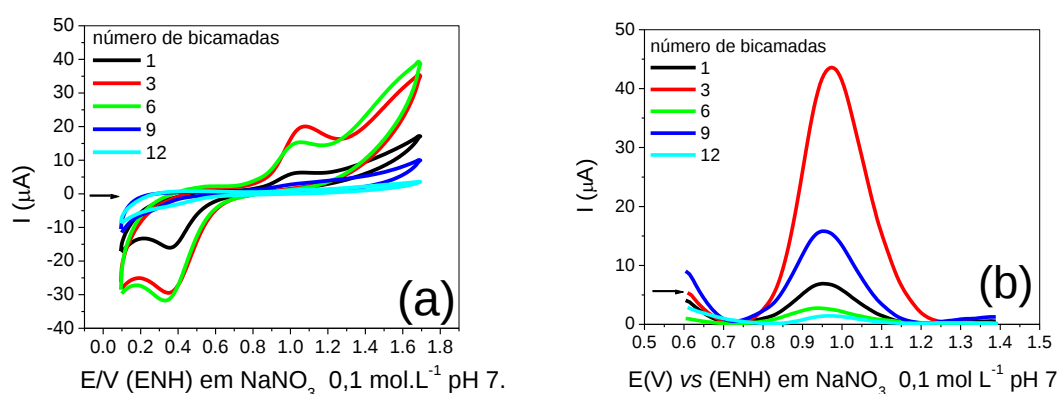


Figura 22- Voltamogramas (a) cíclicos e (b) de pulso diferencial dos filmes LbL $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$, onde $n = 1, 3, 6, 9, 12$ bicamadas, na presença de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ DA ($v = 30 \text{ mV s}^{-1}$).

Verifica-se que entre os filmes estudados contendo diferentes bicamadas, destaque pode ser dado para o filme $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ contendo 3 bicamadas, pois proporcionou uma

maior corrente de oxidação para DA ($I_{pa} = 45 \mu A$) (Figura 22 (b)). Nota-se que de um modo geral, para um maior número de bicamadas a corrente de oxidação de DA diminui. Este fato indica que quando se aumenta o número de bicamadas o eletrodo se torna mais resistivo devido a maior quantidade de material no eletrodo dificultando o processo de transferência de elétrons da solução até a superfície do eletrodo. É importante observar que a deposição de uma única bicamada não é suficiente para propiciar o recobrimento da superfície do FTO necessário para intensificação no sinal de corrente de oxidação de DA. Com três bicamadas auto-organizadas a quantidade de material é suficiente para promover a transferência de elétrons e a intensificação do sinal é atingida. A partir deste número de bicamadas, de um modo geral, ao invés de intensificação no sinal de corrente, têm-se um eletrodo resistivo devido a grande quantidade de material depositado. Um comportamento semelhante a este foi observado com os filmes LbL ($SiPy^+Cl^-/CuTsPc$) sobre FTO na detecção de DA⁹, onde foi observado um aumento na intensidade de oxidação da DA para os filmes LbL contendo de 1 a 5 bicamadas. No entanto, de 5 a 10 bicamadas foi verificada uma diminuição na intensidade de corrente de oxidação para a DA.

Como um dos principais interferentes da DA em tecido cerebral é o AA existindo numa concentração de cerca de 100 a 1000 vezes maior que a concentração de DA²¹⁸, a capacidade sensorial do filme LbL ($PVS/Pt-SiPy^+Cl^-$)₃ para detecção de DA foi analisada na presença deste interferente. A partir dos resultados obtidos (Figura 23) constatou-se que o filme LbL ($PVS/Pt-SiPy^+Cl^-$)₃ na presença de DA apresentou um pico de oxidação em 0,93 V e na presença de AA ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), um pico de oxidação em 1,41 V, o qual é oxidado à ácido desidroascórbico, com o envolvimento de 2 elétrons²¹⁹.

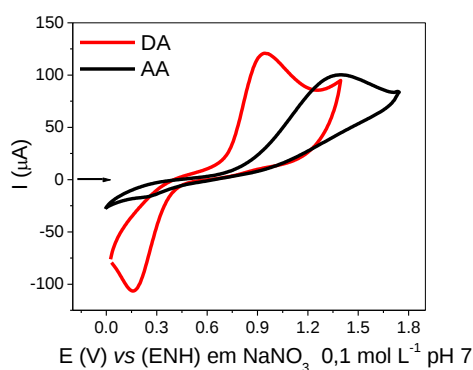


Figura 23- Voltamogramas cíclicos do filme LbL ($PVS/Pt-SiPy^+Cl^-$)₃ na presença de DA e AA, ambos $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em $NaNO_3$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7 e $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$.

Com intuito de verificar a dependência da resposta eletroquímica do filme LbL (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em função da quantidade de DA, foram realizados ensaios variando a concentração deste analito numa faixa de $6,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A partir dos voltamogramas de pulso diferencial obtidos as intensidades de corrente de pico anódicas foram registradas em função da concentração de DA, com os voltamogramas resultantes apresentados na Figura 24 (a).

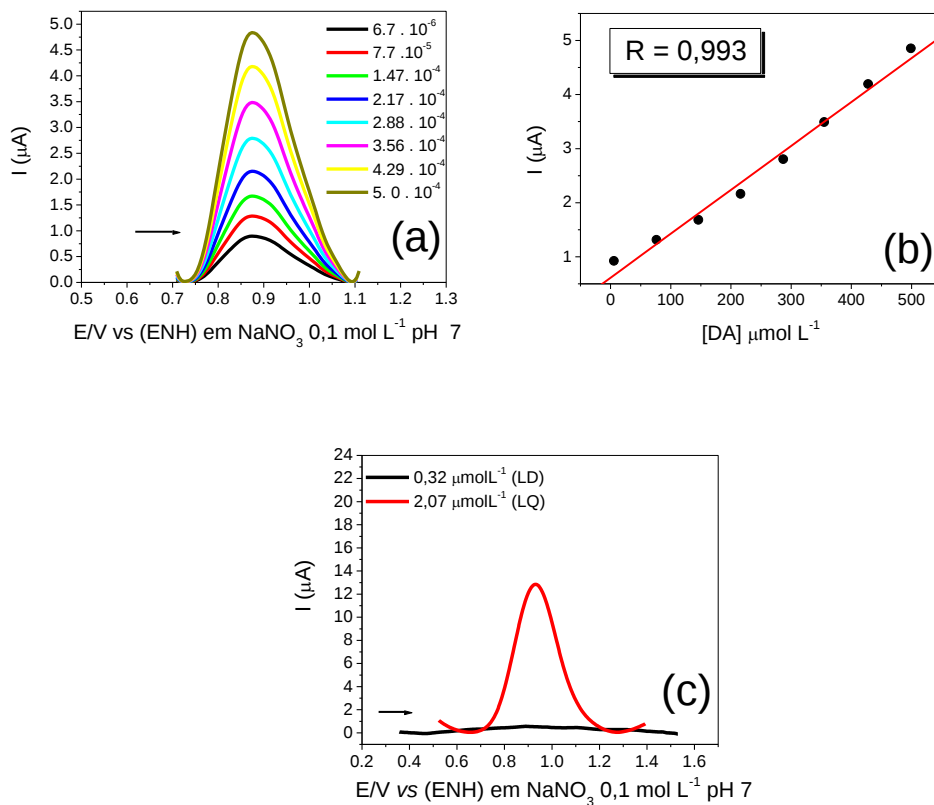


Figura 24- (a) Voltamogramas de pulso diferencial do filme LbL (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de diferentes concentrações de DA ($6,7 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e (b) Curva analítica (c) Voltamograma de onda quadrada obtidos com filme LbL (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de DA ($0,31$ e $2,07 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), em NaNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7 ($v = 30 \text{ mV s}^{-1}$).

Observa-se nos voltamogramas da Figura 24 (a) o aumento das intensidades das correntes de pico anódicas em função da concentração de DA, sem o deslocamento dos potenciais de pico. A partir dos valores obtidos com cinco curvas analíticas como da Figura 24 (b), foi realizada a média aritmética dos resultados para analisar alguns parâmetros como a sensibilidade ($0,008 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), limite de detecção (LD) ($2,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e limite de quantificação (LQ) ($8,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) obtidos do coeficiente angular da equação da curva analítica. Estes valores se encontram na faixa de valores de LD ($10^{-6} - 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$) e LQ ($10^{-5} - 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) encontrados em outros estudos da literatura como sumarizados na Tabela 9.

Experimentalmente, verificou-se que o LQ do filme LbL (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ para determinação de DA, é mais aplicável do que o LD, pois proporciona a possibilidade de determinação de DA, a partir do valor de LQ calculado como ilustra a Figura 24 (c).

Tabela 9- Valores de LD e ΔE obtidos entre DA e AA para diferentes eletrodos.

Eletrodo	Descrição do eletrodo	LD (μmol L⁻¹)	ΔE (mV)	Ref.
GCE-NPs-Au/Ch	LbL de NPs-Au e Colina sobre carbono vítreo (GCE)	0,12	140	148
DB-PE/NPs-Au	LbL sobre diamante dopado com Boro (DB) de poliestireno (PE) e NPs-Au	0,8	200	149
(SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc) ₅	LbL sobre FTO de ftalocianina de cobre e SiPy ⁺ Cl ⁻	10	500	9
GCE- NPs-AU/PI	NPs-Au eletrodepositadas sobre GCE com poli imidazol.	0,7	180	220
Au-PEDOT/NPs-Au	NPs-Au eletrodepositadas sobre poli (3,4-etileno-dioxitiofeno) (PEDOT) sobre eletrodo de Au.	1,55 x 10 ⁻³	230	221
{AuNPs/RGO} ₂₀ /GCE	NPs de Au e óxido de grafeno (RGO) em GCE	0,02	130	222
(PVS/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃	Eletrodo utilizado nesta tese	2,6	550	12

A sensibilidade dos eletrodos na detecção de DA foi determinada pelo coeficiente angular da equação da curva analítica (Figura 24 (b)).

O LD e o LQ foram obtidos através da relação entre a o desvio padrão de valores de correntes registrados nos voltamogramas de 10 brancos com os valores do coeficiente angular da curva e calibração. A partir disso, calculou-se o LD para DA, com a Equação 2, e o LQ com a Equação 3, de acordo com as regras da IUPAC²²³.

$$LD = \frac{3X}{b} [2] \quad LQ = \frac{10X}{b} [3]$$

Onde X é o desvio padrão dos valores de corrente de 10 brancos e **b** é o coeficiente angular da curva analítica. O número 3 e 10 são fatores multiplicadores apropriados²²⁴.

A detecção simultânea de DA e interferentes nos diferentes filmes estudados, (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PVS)₃, (Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, FTO e Pt lisa, foi analisada na presença de DA e AA, ambos misturados em 9,0 x 10⁻⁴ molL⁻¹ em NaNO₃ 0,1 molL⁻¹ em diferentes valores de pHs (1, 3, 7 e 10) (Figura 25).

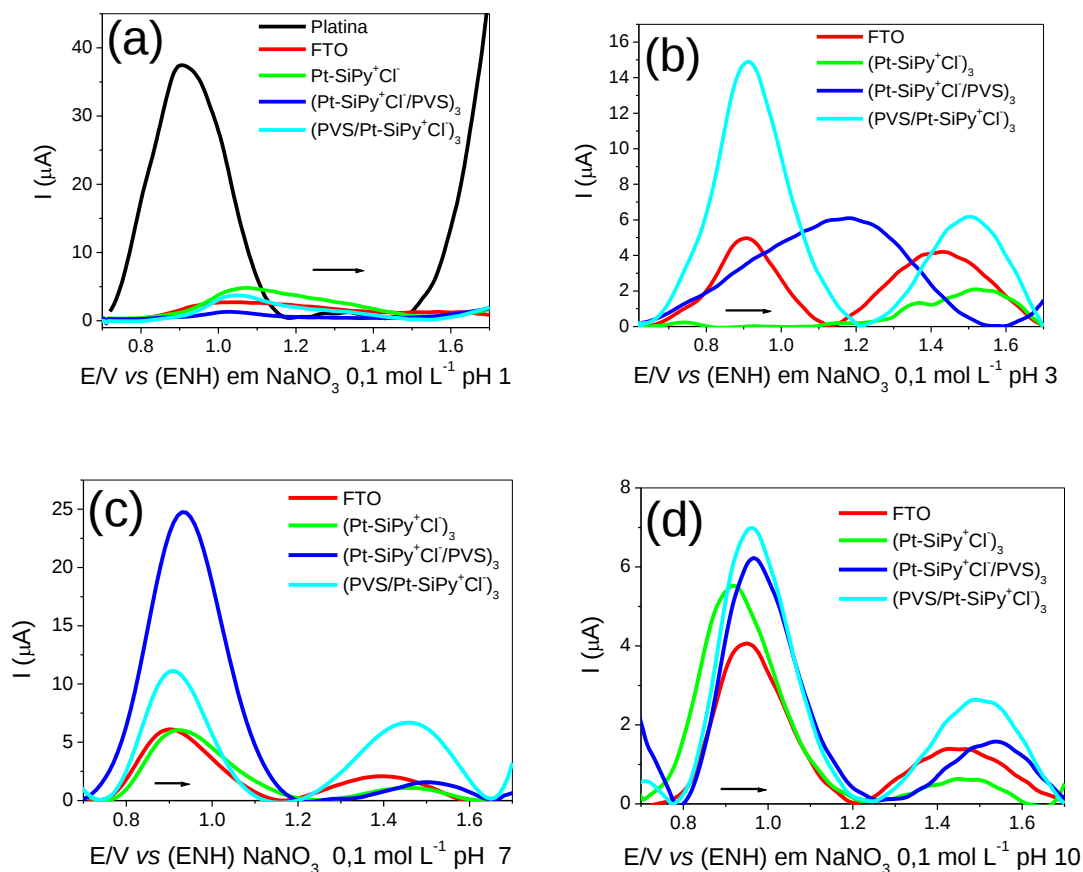


Figura 25- Voltamogramas de pulso diferencial dos eletrodos $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$, $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS})_3$, $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$, FTO e Pt lisa em (a) pH = 1, (b) pH = 3, (c) pH = 7 e (d) pH = 10. Na presença de [DA] e [AA] ambos $9,09 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. $E_{\text{pulso}} = 50 \text{ mV}$; $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ e $t_{\text{pulso}} = 0.07 \text{ s}$ (parâmetros otimizados).

Novamente constatou-se que nos diferentes valores de pHs, o filme LbL $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ forneceu as melhores respostas no processo de detecção de DA, uma vez que com exceção do pH 1, nos demais valores de pHs analisados, este filme apresentou maior diferença de potencial de oxidação entre ambos os analitos, do que os demais eletrodos investigados. No entanto, visando a possibilidade de determinação de DA em amostras biológicas é interessante evidenciar a possibilidades de detecção simultânea de DA em meio ao AA em pH 7 (Figura 25 (c)). Neste valor de pH, o eletrodo $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ promoveu a detecção de DA e AA com uma diferença de potenciais de oxidação igual a 550 mV. Esta diferença de potencial foi superior em relação às observadas com diferentes eletrodos em outros estudos observados na Tabela 9.

Embora alguns eletrodos tenham exibido valores de LD inferiores ao observado com o $(\text{PVS}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$, (Tabela 9) destaque poder ser dado a maior diferença de potencial de oxidação para a DA e o AA (550 mV). No entanto, mesmo que o valor de LD tenha sido

relativamente maior que outros encontrados na literatura, o valor de $2,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ está dentro da faixa encontrada em amostras biológicas. Comparando o desempenho do eletrodo (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ com a do eletrodo (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₅, é possível constatar um menor valor para o LD ($2,6 \mu\text{mol L}^{-1}$) e uma maior diferença de potencial de oxidação entre a DA e o AA (50 mV maior). Este melhor desempenho pode ser atribuído à presença das NPs-Pt presentes na cavidade do SiPy⁺Cl⁻, constituinte do filme (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃. Além disso, o eletrodo (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₅, somente possibilitou a detecção de DA em meio ácido (pH 3) enquanto que com o filme (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ o mesmo aconteceu nos pHs 3, 7 e 10 (Figura 25 (b), 25 (c) e 25 (d)).

É importante ressaltar que em pH 7, a DA (pK_i = 8,93) está carregada positivamente, e o AA (pK_i = 4,17) se encontra na sua forma ionizada aniônica, denominada ascorbato (ABT). Como na última camada do filme LbL (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ tem-se o polícatión, este interage com o ABT e conseqüentemente dificulta o processo de difusão, fato que pode explicar o alto valor de potencial de oxidação verificado para o AA em relação ao potencial de oxidação da DA.

Apesar da importância das NPs-Pt para a resposta eletroquímica da DA e AA, bem como o alto valor de corrente de oxidação obtido com a Pt lisa (Figura 25 (a)), a resposta eletroquímica na detecção simultânea de DA e AA com a Pt lisa não foi eficiente como a observada para os demais eletrodos formados pelos filmes LbLs, pois com a platina lisa não foi possível observar uma separação dos picos de corrente anódicas dos analitos DA e AA nestas condições.

5.3.2 Detecção eletroquímica de DA com os filmes LbL de PPV-SO₃ e Pt-SiPy⁺Cl⁻

A potencialidade sensorial dos filmes LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)_n contendo 3, 6, 10, 15 e 25 bicamadas foram estudados na oxidação de DA. A Figura 26 ilustra os voltamogramas cíclicos destes filmes na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de DA.

Ao analisar os voltamogramas cíclicos da Figura 26 (a), nota-se que da mesma forma que o filme com PVS, o filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ foi o que apresentou um pico de corrente maior (I_{pa} = 76 μA), melhor definido e com boa reversibilidade ($\Delta E_p = 0,77 \text{ V}$) frente ao analito DA. Além disso, comparando com o eletrodo FTO, sem modificação, verifica-se que o filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ proporcionou a eletrocatalise do processo de oxidação da DA, visto que apresentou menor potencial de oxidação da DA (1,0 V) em relação

ao eletrodo de FTO (1,12 V). Este deslocamento de potencial em torno de 120 mV nos mostra a importância da modificação dos eletrodos utilizando os polieletrólitos PPV-SO₃ e Pt-SiPy⁺Cl⁻.

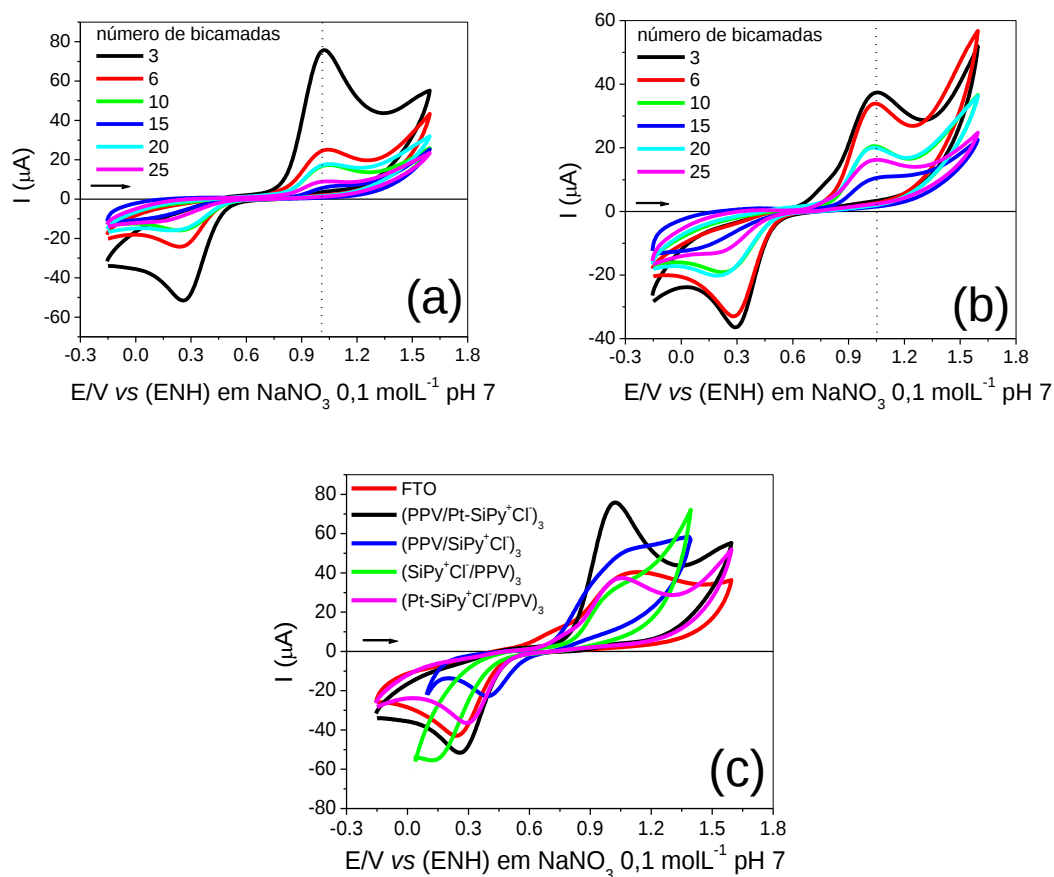


Figura 26- Voltamogramas cíclicos dos filmes LbL (a) (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n (b) (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)_n (c) do substrato FTO, dos filmes LbL (PPV/SiPy⁺Cl⁻)₃, (SiPy⁺Cl⁻/PPV)₃, (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)₃, na presença de DA 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ em NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ pH = 7 e $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

Na comparação das respostas eletroquímicas dos filmes LbL nas duas arquiteturas, (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)₃ (Figura 26 (a) e (b)), percebe-se que há uma dependência da resposta eletroquímica com a sequência de deposição. Novamente o filme com NPs-Pt na parte externa, (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, se mostrou mais eficiente na detecção de DA, pois apresentou uma corrente de pico anódica superior ($I_{pa} = 76 \mu\text{A}$) à obtida com o filme (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)₃ ($I_{pa} = 37 \mu\text{A}$). A importância das NPs-Pt foi evidenciada pelo menor valor de I_{pa} (33,2 e 51 μA) obtido respectivamente com os filmes LbL sem híbrido, (SiPy⁺Cl⁻/PPV)₃ e (PPV/SiPy⁺Cl⁻)₃ (Figura 26 (c)). Portanto, pode-se concluir que a presença

das NPs-M nestes eletrodos modificados facilitou a transferência de elétrons da DA num processo conhecido com salto eletrônico, do inglês *Electron Hopping*^{16,224}.

Visando compreender a contribuição de cada espécie individualmente na superfície do FTO para o processo da detecção de DA, foram comparadas as respostas eletroquímicas obtidas com os eletrodos sem modificação, tais como o eletrodo de Pt *bulk*, FTO e eletrodos *drop-coated* formados por camadas de (PPV-SO₃)₃, (SiPy⁺Cl⁻)₃, (Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (PVS)₃. Os voltamogramas são ilustrados nas Figuras 27 (a) e (b).

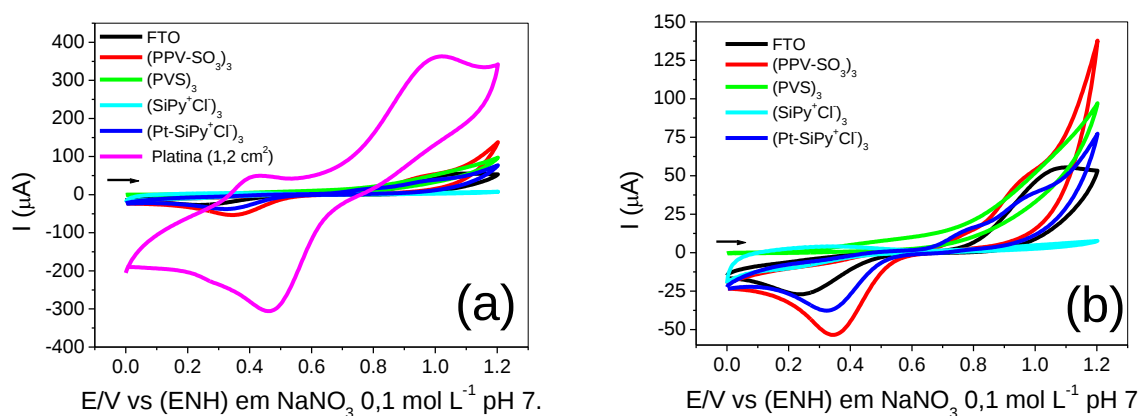


Figura 27- (a) Voltamogramas cíclicos de Pt *bulk*, FTO, *drop-coated* de (PPV-SO₃)₃, (SiPy⁺Cl⁻)₃, (Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (PVS)₃ e (b) destes eletrodos sem Pt *bulk*, em DA 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹, NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹, pH 7 e v = 50 mV s⁻¹

Verifica-se da Figura 27 (a) que os eletrodos (Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (PPV-SO₃)₃ oxidaram a DA em potenciais mais negativos (E_{pa} = 0,96 e 0,95 V, respectivamente), do que observado com o FTO sem modificação (E_{pa} = 1,08 V). Além disto, observa-se que os eletrodos formados apenas por camadas de PVS e (SiPy⁺Cl⁻)₃ não demonstraram resposta para o processo redox da DA, o que comprova que no filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ existe contribuição tanto do PPV-SO₃, um bom condutor, quanto do Pt-SiPy⁺Cl⁻ para detecção de DA, pois o nanocompósito formado durante a construção do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ promove um processo redox bem definido com uma grande intensidade de corrente. Este comportamento ocorre diferentemente do que é observado nos estudos com filmes LbL contendo o PVS ao invés de PPV-SO₃, pois nestes filmes a contribuição no processo de transferência de elétrons se deve apenas à presença do nanohíbrido Pt-SiPy⁺Cl⁻. O PVS é necessário apenas para o processo de preparação dos filmes LbL contrabalanceando as cargas positivas do Pt-SiPy⁺Cl⁻ e o PPV-SO₃ além disso, também auxilia no processo de condução eletrônica na superfície do eletrodo.

A confirmação da melhora da resposta eletroquímica no processo de oxidação de DA utilizando os filmes LbL contendo PPV-SO₃ ao invés de PVS, foi constatada no estudo dos filmes LbL (PVS/SiPy⁺Cl⁻)₃ e (PPV/SiPy⁺Cl⁻)₃, com o SiPy⁺Cl⁻ ausente de NPs-Pt, para que desta forma fosse possível investigar o comportamento exclusivo dos poliânions. A Figura 28 ilustra os voltamogramas cíclicos obtidos com na presença de 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ de DA.

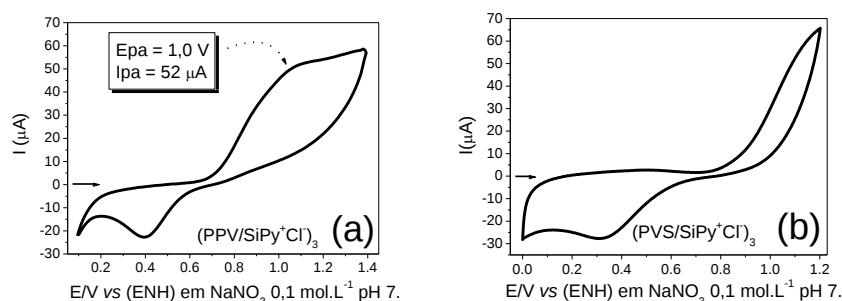


Figura 28- Voltamogramas cíclicos dos filmes LbL de (a) (PPV/SiPy⁺Cl⁻)₃ e (b) (PVS/SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de DA 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ em NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ pH = 7 e $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Nota-se das Figuras 28 (a) e (b) que o filme (PPV/SiPy⁺Cl⁻)₃ apresenta melhor sinal de corrente de oxidação para DA ($E_{pa} = 1,0 \text{ V}$ e $I_{pa} = 52 \text{ μA}$) em relação ao filme (PVS/SiPy⁺Cl⁻)₃ ($E_{pa} = 1,14 \text{ V}$ e $I_{pa} = 59,56 \text{ μA}$). Estes resultados nos confirmam a eficiência no processo de modificação de eletrodos utilizando o PPV-SO₃ não somente como um poliânion presente nos filmes LbL para interações físicas com os policátions, mas sim também, como estrutura ativa no eletrodo para auxiliar processos de transferência na superfície dos eletrodos modificados.

Realizou-se um estudo sistemático de voltametria de onda quadrada para avaliar os melhores parâmetros da técnica para utilização do filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ frente ao analito DA. Os parâmetros experimentais avaliados foram f , a e ΔE_s e os parâmetros otimizados foram $f = 90 \text{ Hz}$, $a = 80 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ (Figura 29).

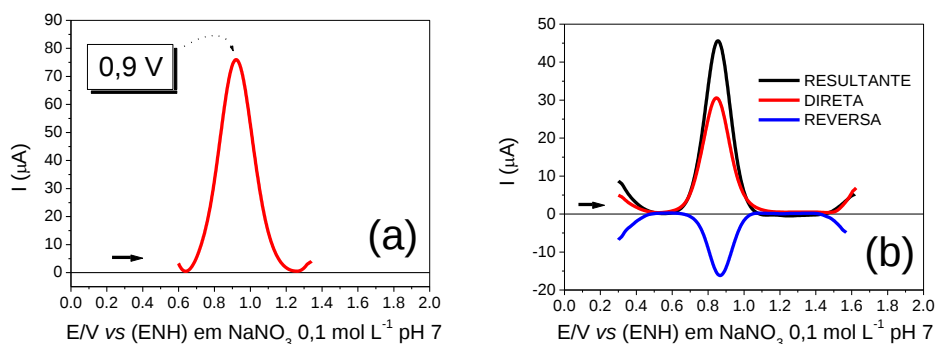


Figura 29- Voltamogramas de onda quadrada (a) e componentes de corrente (b) do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de DA 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹. Parâmetros utilizados: $f = 90 \text{ Hz}$, $a = 80 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

A Figura 29 (a) ilustra o voltamograma de onda quadrada do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na concentração fixa de DA (1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹) obtido nestas condições. Na mesma concentração de DA, obteve-se uma relação das componentes de correntes direta, reversa e resultante (Figura 29 (b)), onde é perceptível a relação de componentes típica de sistemas reversíveis. De acordo com a literatura²²⁵, este resultado nos indica que o sistema pode ser pouco adsorptivo.

A fim de analisar a dependência da resposta eletroquímica do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em função da concentração de DA, foram realizados ensaios variando-se a concentração deste analito na faixa entre 2,0 x 10⁻⁶ a 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ (Figura 30 (a)) e a partir dos voltamogramas obtidos obteve-se uma relação linear (R = 0,998) entre a concentração de DA em função da intensidade de corrente de oxidação sem o deslocamento dos potenciais de pico (Figuras 30 (a) e (b)). Esta medida foi repetida cinco vezes, e a partir dos valores obtidos da média aritmética obteve-se a sensibilidade de 2,7 µmol L⁻¹, um LD de 3,19 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ e um LQ de 2,07 x 10⁻⁶ mol L⁻¹. Estes resultados se encontram na faixa de valores de LD (10⁻⁶ – 10⁻⁹ mol L⁻¹) e LQ (10⁻⁵ – 10⁻⁸ mol L⁻¹) para DA obtidos na literatura como já apresentado na Tabela 9.

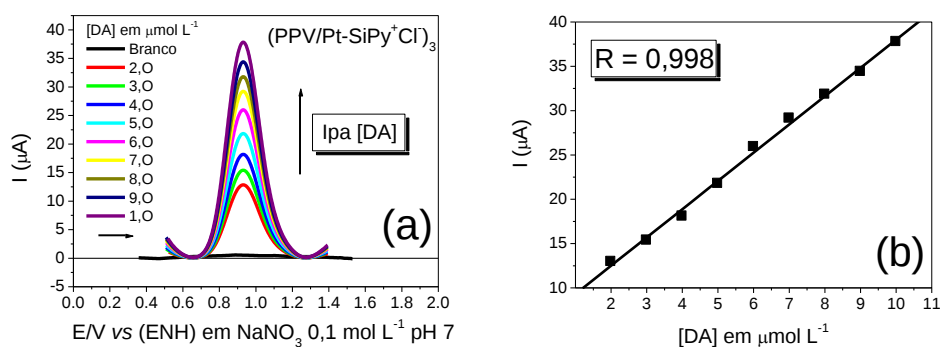


Figura 30 - (a) Voltamogramas de onda quadrada do filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em diferentes [DA] (2,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ à 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹) e (b) Curva analítica. (Parâmetros da onda: $f = 90$ Hz, $a = 80$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV).

Experimentalmente, da mesma forma que verificado para o filme (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, verificou-se que o LQ do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ para determinação de DA, é mais aplicável do que o LD devido a possibilidade de determinação de DA, a partir do valor de LQ calculado como ilustra a Figura 31.

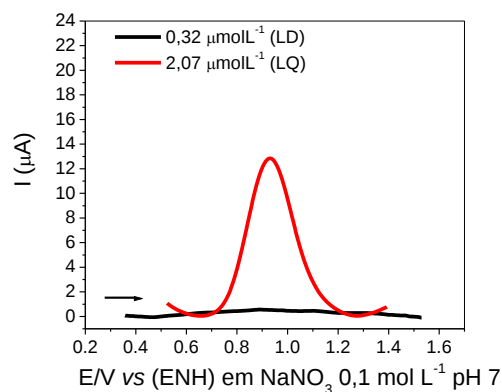


Figura 31 - Voltamogramas de onda quadrada do filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em 0,32 e 2,07 μmol L⁻¹ de DA. (Parâmetros da onda: $f = 90$ Hz, $a = 80$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV).

As propriedades eletroquímicas do filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na detecção simultânea da DA em meio aos interferentes AA e AU, foi avaliada por medidas de voltametria na presença de cada um dos interferentes nas mesmas condições experimentais da DA. Ao analisar os voltamogramas obtidos com estes analitos, ilustrados na Figura 32, verifica-se que estes oxidam em potenciais muito próximos, entre 1,55 e 1,58 V (Figura 32 (a) e (b)).

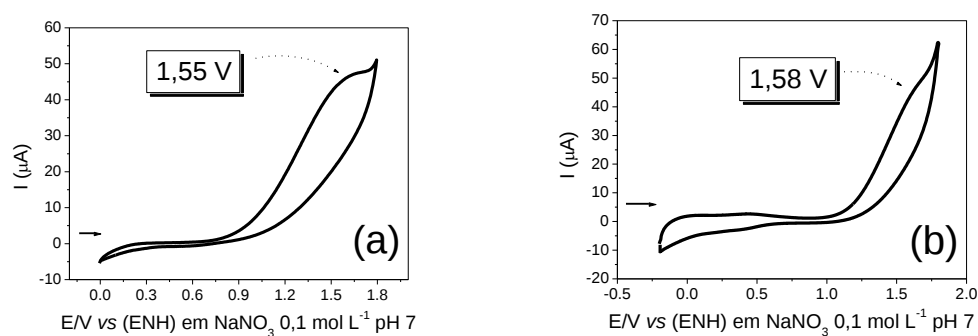


Figura 32- Voltamogramas cíclicos do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de AA (a) e de AU (b), ambos $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; $v = 50$ mV s⁻¹.

O fato dos valores de Epa serem próximos, impossibilitou a detecção simultânea desses interferentes em meio a solução de NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ pH 7, como ilustrado na Figura 33 (a). No entanto, quando a DA é misturada a estes interferentes observa-se a oxidação da DA em 0,9 V e dos interferentes AA e AU entre 1,55 e 1,58 V, resultando uma diferença em torno de 640 mV (Figura 33 (b)). Essa diferença de potencial entre os analitos DA e AA se destaca em relação à literatura, como no trabalho de Wang *et al.*²²¹ ($\Delta E = 180$ mV), Atta *et al.*²²² ($\Delta E = 230$ mV) e Jesus *et al.*⁹ ($\Delta E = 500$ mV). Além disto, a diferença de potencial é ligeiramente maior que a obtida com o filme LbL (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ ($\Delta E = 550$ mV). Porém a diferença obtida não é tão promissora quando se compara com o resultado obtidos para

os três analitos (DA, AA e AU) utilizando-se um eletrodo de carbono contendo um polieletrólito de estrutura similar, tal como o cloreto de 3-*n*-propil-1-azonia-4-azabicyclo [2.2.2] octanosilsesquioxano (SiDbCl)²²⁶. Neste trabalho os autores obtiveram uma diferença de potencial de 240 mV para DA e AA e 140 mV para DA e AU. No entanto, a diferença entre os potenciais de oxidação da DA dos interferentes AA e AU obtida com o filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ foi consideravelmente maior.

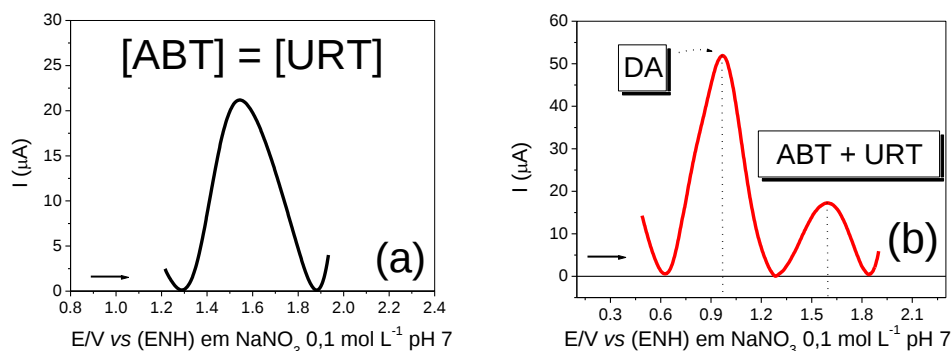


Figura 33- Voltamogramas de onda quadrada do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de (a) AA e AU misturados na concentração $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e (b) DA, AU e AA misturados na concentração $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Parâmetros utilizados: $f = 90 \text{ Hz}$, $a = 80 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

A fim de otimizar a detecção simultânea, realizou-se um estudo eletroquímico do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em diversos valores de pH do eletrólito suporte NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ e o resultado deste estudo é ilustrado na Figura 34 (a). Em pH 7 verifica-se uma diferença de potencial de oxidação da DA e dos interferentes ligeiramente maior (640 mV), além de uma maior corrente para DA ($I_{pa} = 52,23 \text{ } \mu\text{A}$). Como já mencionado, 5.3, em pH 7, os interferentes AA e AU se encontram ionizados na forma de ABT e URT, pois os valores de pKa destas espécies são 4,17 para o AA e 5,5 para o AU, diferente da DA, que apresenta um pKa igual a 8,93. Pelo fato da DA ser encontrada nas amostras biológicas em pH fisiológico, juntamente as espécies ABT e URT, estipulou-se esse pH para continuação dos estudos eletroanalíticos.

Também foi realizado um estudo eletroquímico para a escolha do eletrólito suporte para a detecção simultânea de DA em meio aos interferentes AA e AU (Figura 34 (b)). Testou-se os eletrólitos NaNO₃, Na₂SO₄, NaCl, tampão fosfato, tampão BR e PBS na concentração de 0,1 mol L⁻¹, pH 7 e em solução com a presença de $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de DA, AA e AU. Apenas foi observada a detecção simultânea com os eletrólitos NaNO₃, Na₂SO₄ e NaCl e o melhor resultado de pico de oxidação anódico da DA foi obtido com o uso do NaNO₃ (110, 83 μA), em comparação com os eletrólitos Na₂SO₄ (26, 92 μA) e NaCl (26,47

μA). As melhores respostas eletroquímicas obtidas com estes sais em relação aos eletrólitos de tampão podem ser explicadas pela maior estrutura molecular dos tampões o que de certa forma dificulta a mobilidade iônica. Além disso, as melhores repostas eletroquímicas evidenciadas com o NaNO_3 pode ser atribuída a menor diferença de mobilidade iônica entre o cátion Na^+ e o ânion NO_3^- , em relação ao íons dos sais Na_2SO_4 e NaCl . Além disso, este último contém cloreto que adsorve na superfície das NPs-Pt.

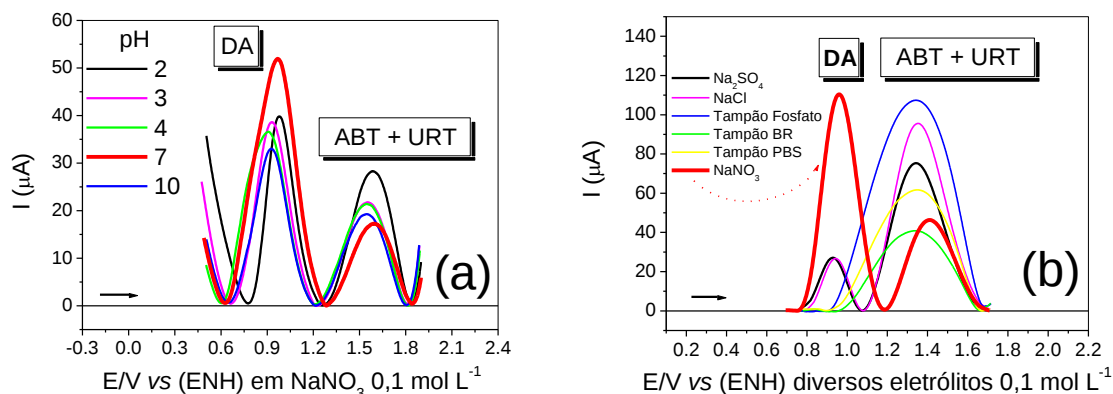


Figura 33- Voltamogramas de onda quadrada do filme LbL $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ na presença de (a) AA e AU misturados na concentração $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em NaNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pHs; e (b) DA, AU e AA misturados na concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos suporte ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7$). Parâmetros utilizados: $f = 90 \text{ Hz}$, $a = 80 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

5.3.3 Estudo comparativo entre os filmes $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ e $(\text{PVS/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$

Os resultados eletroquímicos obtidos com as diferentes arquiteturas de filmes LbL na presença de DA, indicaram que os filmes $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ e $(\text{PVS/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ forneceram os maiores incremento no processo de oxidação. Isto pode ser melhor evidenciado a partir da comparação dos resultados encontrados para os LD, LQ e ΔE de oxidação da DA em meio à interferentes como mostrado na Tabela 10.

Tabela 10- Valores de LD, LQ e ΔE obtidos entre DA, AU e AA para os filmes contendo as arquiteturas $(\text{PVS/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ e $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$.

Eletródos	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	ΔE (mV)
$(\text{PVS/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$	2,6	8,6	550
$(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$	0,32	2,07	640

Os menores valores de LD e LQ obtidos para o filme contendo PPV-SO₃ como poliânion e a maior diferença entre os potenciais de oxidação de DA em meio aos interferentes, pode ser atribuída à condutividade do PPV-SO₃ inexistente no PVS. Além disso, pode ser relacionadas às maiores interações comprovadas pelas medidas de FTIR e Raman que foram atribuídas à estrutura aromática e mais ramificada do PPV-SO₃ em relação ao PVS. A seguir, serão exploradas as respostas eletrocatalíticas no processo de oxidação da DA com estes filmes com intuito de estabelecermos um estudo comparativo entre os polieletrólitos estudados.

O processo de transporte de carga na detecção de DA sobre a superfície dos filmes (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, foi investigado pela relação entre I_{pa} e a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) na presença de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de DA com (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de DA com (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ (Figura 35 (a)). A partir do fator de correlação obtido, pode-se observar uma relação linear entre I_{pa} vs $v^{1/2}$, para ambas arquiteturas, logo, o processo redox da DA sobre o eletrodo é controlado por difusão, como esperado para sistemas catalíticos²²⁷. Esta relação pode ser dada pela equação de Randles-Sevcik⁴⁶ (Equação 4).

$$ip = \pm 2,69 \cdot 10^{-5} n^{\frac{3}{2}} A C D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} \quad (4)$$

Onde ***ip*** é a corrente de pico; ***n*** é o número de elétrons envolvidos na reação redox; ***A*** é a área do eletrodo (cm²); ***C*** é a concentração das espécies reduzidas ou oxidadas (mol cm⁻³); ***v*** é a velocidade de varredura (V s⁻¹) e ***D*** é o coeficiente difusional (cm² s⁻¹).

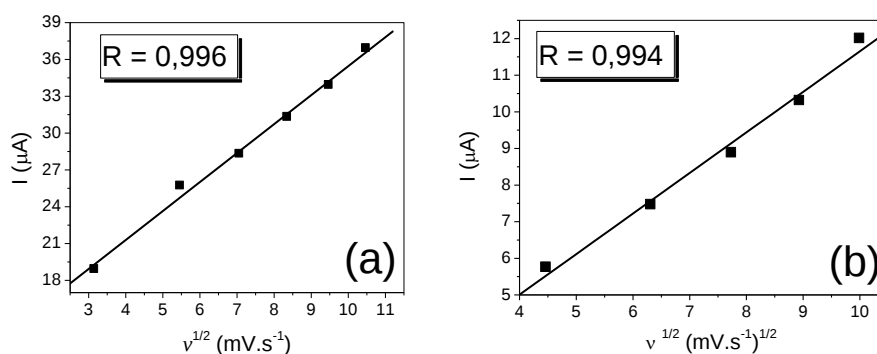


Figura 35- Gráficos da relação entre a corrente de oxidação e a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) na presença de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de DA (a) (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ (b) em $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de DA (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ e pH 7, em diferentes velocidades de varredura.

Baseado no estudo de Nicholson e Shain²²⁸, foram realizados ensaios eletrocatalíticos com os filme LbL (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em solução $1,0 \times 10^{-3}$ molL⁻¹ de

DA variando-se a velocidade de varredura. Após obtenção do gráfico de $I_{pa}/v^{1/2}$ vs v , apresentados na Figura 36 (a) e 36 (b), verificou-se a redução do sobrepotencial pela eletrocatalise do processo redox da DA em ambas arquiteturas. Portanto, a correlação de Nicholson e Shain, descrita na Equação 5, sugere que o processo de transferência de elétrons é auxiliado pela presença do nanohíbrido $Pt-SiPy^+Cl^-$ no eletrodo modificado.

$$i = nFA C_o^* \sqrt{\pi D_o b} x(bt) \quad (5)$$

Onde i é a corrente de oxidação; n é o número de elétrons envolvidos na reação redox; F é a constante de Faraday; A é a área do eletrodo (cm^2); C é a concentração das espécies reduzidas ou oxidadas ($mol\ cm^{-3}$); D é o coeficiente difusional ($cm^2\ s^{-1}$) e $x(bt)$ é a resolução da Equação 6.

$$x(bt) = \frac{1}{\sqrt{\pi}} \sum_{j=1}^{\infty} (-1)^{j+1} \frac{\sqrt{\pi}^j}{\sqrt{(j-1)!}} \times e^{[(-\frac{j\alpha n_a F}{RT})(E-E^0 + \frac{RT}{\alpha n_a F} \ln \frac{\sqrt{\pi} D_o b}{k_s})]} \quad (6)$$

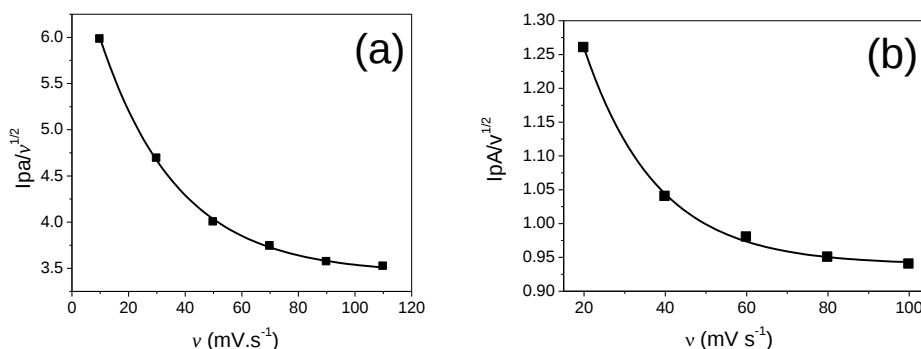


Figura 36 - $I_{pa}/v^{1/2}$ em função da velocidade de varredura, obtidos com o filme LbL (a) (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (b) (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de $1,0 \times 10^{-3}\ mol\ L^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-4}\ mol\ L^{-1}$ de DA, respectivamente, em $NaNO_3\ 0,1\ mol\ L^{-1}$ e pH 7, em diferentes velocidades de varredura.

Visando avaliar a estabilidade do sinal eletroquímico do filme LbL (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ no processo redox da DA, foram realizados estudos de repetibilidade em $1,0 \times 10^{-3}\ mol\ L^{-1}$ de DA para (PVS/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ e $1,0 \times 10^{-4}\ mol\ L^{-1}$ de DA para (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, com aquisição de 100 ciclos de varredura para ambas arquiteturas. O perfil voltamétrico do filme LbL na presença de DA foi avaliado em relação à estabilidade da corrente faradaica e dos valores dos potenciais de pico anódico.

É possível notar a partir dos gráficos da Figura 37 (a) e 37 (b) que não houve variações significativas de corrente, nem de potencial para oxidação da DA para as duas arquiteturas investigadas. Isto nos mostra a possibilidade de realização de várias medidas com estes eletrodos sem alterações nas respostas eletroquímicas já que ambos os filmes investigados, mesmo com valores de correntes diferentes, foram estáveis.

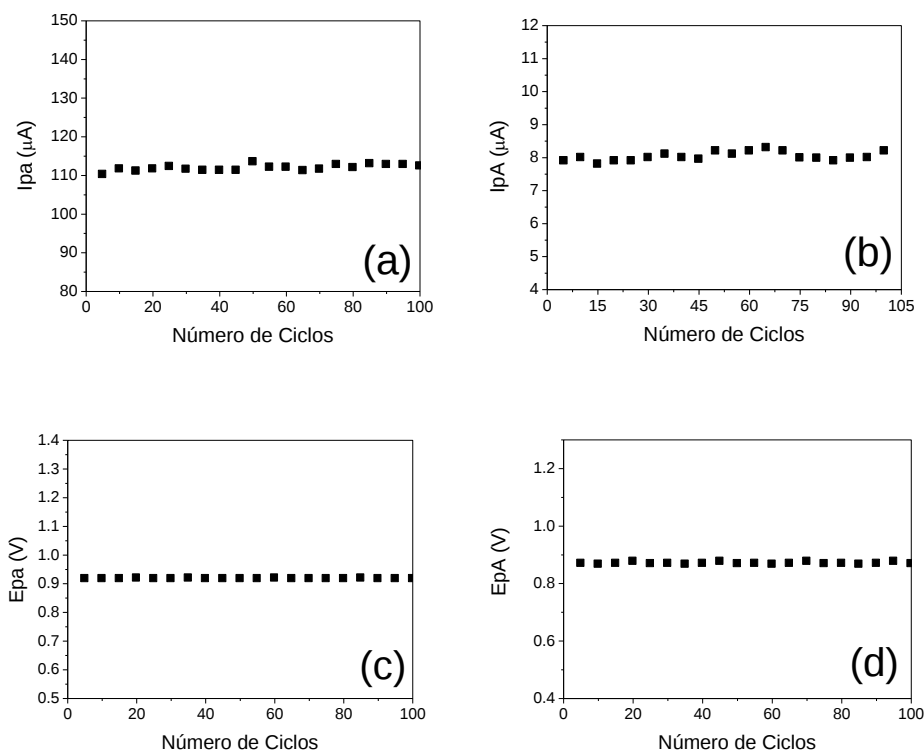


Figura 37- Correlação entre (a) I_{pa} e o número de ciclos para o filme $(PVS/Pt-SiPy^+Cl^-)_3$ (b) I_{pA} e o número de ciclos para o filme $(PPV/Pt-SiPy^+Cl^-)_3$, (c) E_{pa} e o número de ciclos, obtida com o filme LbL $(PVS/Pt-SiPy^+Cl^-)_3$, (d) E_{pA} e o número de ciclos, obtida com o filme LbL $(PPV/Pt-SiPy^+Cl^-)_3$ na presença de DA, $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$.

5.4 Caracterização do filme $(PPV/Pt-SiPy^+Cl^-)_3$ por Raman após eletroquímica

Tendo verificado as melhores respostas eletroquímicas no processo de oxidação de DA com o filme LbL $(PPV/Pt-SiPy^+Cl^-)_3$, foi realizado um estudo a partir de medidas de espalhamento Raman, visando compreender as interações que ocorrem na superfície deste filme frente à DA e os interferentes AA e AU. Para isto, os filmes LbL com a arquitetura $(PPV/Pt-SiPy^+Cl^-)_3$ obtidos sobre Ag (dispersão coloidal) foram varridos em 15 ciclos de varreduras na presença de DA bem como na presença da mistura dos três analitos. Além destes filmes, filmes *drop-coated* de DA, AA e AU foram obtidos para efeitos de comparação. Posteriormente foram realizadas medidas de espalhamento Raman sobre tais

filmes. Os espectros obtidos destas medidas são ilustrados na Figura 38 e as principais bandas são sumarizadas na Tabela 11.

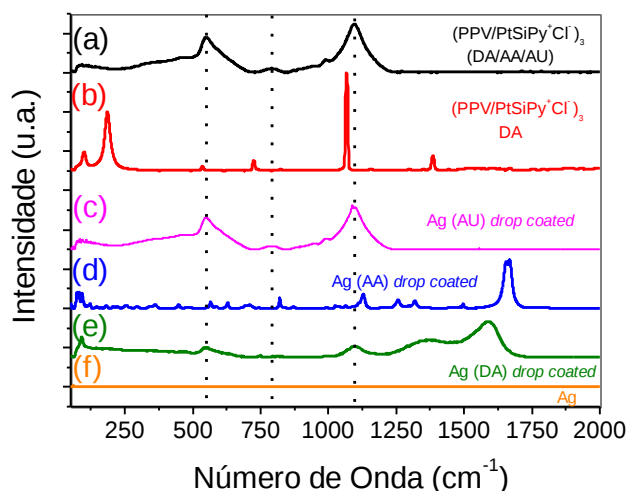


Figura 38- Espectros Raman de (a) filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em DA, AA e AU ambos 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹; (b) filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em DA 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹; filmes *drop-coated* de (c) AU, (d) AA, (e) DA e (f) substrato de Ag (dispersão coloidal).

Tabela 11- Bandas de espalhamento Raman com suas respectivas atribuições obtidas dos espectros após a ciclagem dos filmes LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em DA, AA e AU ambos 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹; filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em DA 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹; filmes *drop-coated* de AU, AA, DA e substrato de Ag. (dispersão coloidal).

Bandas (cm ⁻¹)	Atribuições
1115 (DA)	$\nu_{\text{simétrico}} (\text{C} - \text{N})$ ²²⁹
1620 (DA)	$\nu_{\text{assimétrico}} (\text{C} - \text{N})$ primária ²²⁹
540 (DA)	$\nu_{\text{simétrico}} (\text{Ph-O})$ ²¹⁵
1114 (AU)	$\nu_{\text{simétrico}} (\text{C} - \text{N})$ ²¹⁵
542 (AU)	ν esqueleto (HN – C = O) ²²⁹
1775 (AA)	$\nu(\text{C} = \text{O})$ do grupo éster ²²⁹

Ao analisar o espectro obtido com o filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de DA, AA e AU (Figura 38 (a)) confirmou-se a presença do AU pelas bandas em 1114 cm⁻¹ do estiramento simétrico de (C – N) e em 542 cm⁻¹ do estiramento do esqueleto de HN – C = O. As bandas referentes ao AA (Figura 38 (d)) deveriam aparecer no espectro da Figura 38 (a), no entanto como elas são menos intensas que as bandas do AU (Figura 38 (c)) elas provavelmente se sobrepõem e desta forma não aparecem. Além disso, não é verificada a

presença das bandas de DA como a banda em 1620 cm^{-1} do estiramento assimétrico de (C– N) primária. Este fato levou-nos a constatar que tanto o ABT quanto o URT, por serem carregados negativamente, interagem com a superfície positiva do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ o que dificulta a permeabilidade destes analitos até as NPs-Pt, exigindo um potencial para oxidação desta espécie maior em comparação com o potencial de oxidação da DA. É perceptível que o mesmo não ocorre com a DA que por não ter este tipo de interação com a superfície do eletrodo, apresenta um maior acesso as NPs-Pt presentes no filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ exigindo um potencial para oxidação menor. Estas interações podem explicar a grande diferença de potencial entre os potenciais de oxidação da DA e os potenciais de oxidação dos interferentes AA e AU.

5.5 Espectroscopia de impedância eletroquímica dos filmes (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n

5.5.1 Estudo com diferentes bicamadas de (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foi empregada para investigar as propriedades de transferência de elétrons na superfície dos filmes LbL contendo a arquitetura (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n com diferentes bicamadas ($n = 3, 6$ e 10). A Figura 39 (a) mostra os diagramas de Nyquist obtidos em potencial de circuito aberto, na presença de 5 mmol L^{-1} de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ dissolvidos em $0,1\text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_3 , pH 7, para os filmes LbL preparados e para o eletrodo sem modificação, FTO. Os valores de resistência de transferência de carga (R_2) e capacitância (C_1) para os eletrodos testados são sumarizados na Tabela 12.

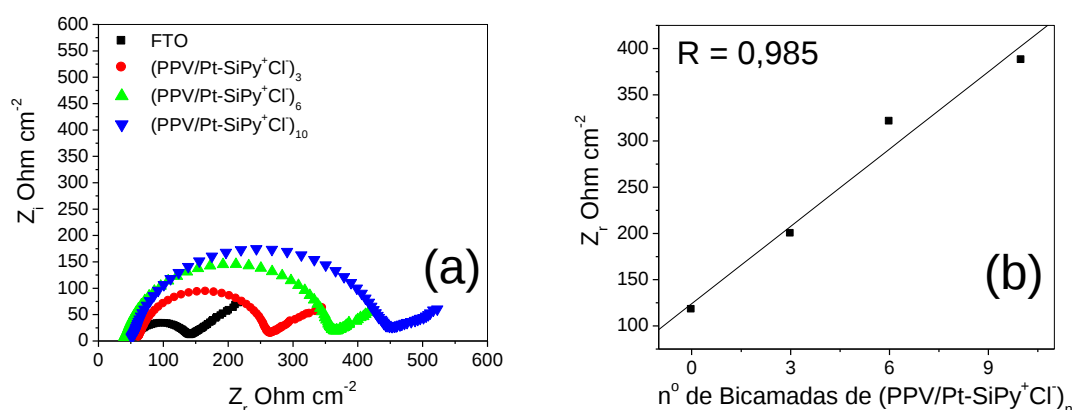


Figura 39- (a) Representação Nyquist para os eletrodos FTO, (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ e (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₁₀ na presença de 5 mmol L^{-1} de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ preparados em $0,1\text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_3 , pH 7, em potencial de circuito aberto com frequência 10 KHz–100 mHz e amplitude 10 mHz. (b) Relação entre o número de bicamadas de (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n e R_2 .

É possível verificar nos diagramas de Nyquist da Figura 39 (a), que a modificação do eletrodo FTO com os polieletrólitos PPV-SO₃ e Pt-SiPy⁺Cl⁻, leva a um aumento no valor de R₂ que passa de 117,54 Ω cm⁻² (FTO) a 199,77 Ω cm⁻² (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na deposição das três primeiras bicamadas. Sequencialmente, verifica-se que à medida que o número de bicamadas aumenta, o valor de R₂ aumenta gradativamente passando de 199,77 Ω cm⁻² (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ para 321,12 Ω cm⁻² no filme LbL contendo 6 bicamadas (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ e para 387,29 Ω cm⁻² no filme LbL contendo 10 bicamadas (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₁₀ (Figura 39 (b)).

Tabela 12- Resistência de transferência de carga e capacitância calculados utilizando o programa ZView a partir dos semicírculos obtidos com os eletrodos FTO, (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ e (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₁₀ na presença de 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] dissolvidos em 0,1 mol L⁻¹ de NaNO₃, pH 7.

Eletrodo	R ₂ (Ω)	C ₁ (F)
FTO	117,54	3,57 x 10 ⁻⁶
(PPV/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃	199,77	4,63 x 10 ⁻⁶
(PPV/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₆	321,12	4,86 x 10 ⁻⁶
(PPV/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₁₀	387,29	5,11 x 10 ⁻⁶

O aumento observado na resistência de transferência de carga nos filmes com mais bicamadas, pode ser explicado pelo fato de que o aumento no número de bicamadas implica numa maior quantidade de espécies depositadas na superfície do FTO. Esta maior quantidade de espécies presentes nos filmes dificulta o acesso por difusão na superfície do eletrodo. Estas observações corroboram com os resultados verificados nas imagens de AFM (Figura 19), onde os filmes LbL com menos bicamadas se mostraram mais homogêneos devido a melhor distribuição das espécies na superfície do substrato e consequentemente menor rugosidade. Também estão de acordo com os resultados eletroquímicos realizados com os filmes contendo diferentes bicamadas, com destaque para o filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃. Este exibiu maiores valores de corrente de oxidação para DA (I_{pa} = 76 µA), em relação aos demais filmes contendo mais bicamadas, que se mostraram mais resistivos. (Figura 26). Desta forma, devido a menor rugosidade de superfície dos filmes com menos bicamadas, a difusão é maior na superfície destes filmes, acarretando um menor valor de R₂. Além disso, embora o filme contendo 3 bicamadas de (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ tenha se mostrado mais resistivo que o FTO, os resultados eletroquímicos de voltametria, indicaram que a presença dos precursores PPV-SO₃ e Pt-SiPy⁺Cl⁻ no filme, forneceram um incremento na corrente de oxidação da DA em cerca

de 26 μA , num potencial de 120 mV menos positivo, em relação ao eletrodo FTO ($I_{pa} = 40 \mu\text{A}$). Isto nos mostra a importância da modificação do eletrodo.

A análise dos valores de C_1 observados na Tabela 12 nos permite verificar um pequeno aumento no valor de C após a modificação do eletrodo FTO ($C = 3,57 \times 10^{-6} \text{ F}$) a partir dos precursores PPV- SO_3 e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$. Além disso, é observado que os valores de C aumentam com o aumento no número de bicamadas que passa de $4,63 \times 10^{-6} \text{ F}$ no filme $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ para $5,11 \times 10^{-6} \text{ F}$ no filme $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{10}$. Estas observações acerca dos valores de C_1 nos mostram que com o aumento da quantidade de espécies na superfície do FTO, aumenta-se também a capacidade do filme em agir como um meio onde se permite o alinhamento de íons (polarização do dielétrico).

A impedância de Warburg (W), analisada as baixas frequências, também é observada nos diagramas de Nyquist da Figura 39 (a). O fator W é representado por uma região linear a 45° do eixo real na representação de Nyquist²³² e está relacionado ao limite difusional da espécie eletroativa $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ presente na superfície dos filmes LbL.

Com base nas observações realizadas a partir dos diagramas de Nyquist da Figura 39 (a), um modelo de circuito equivalente foi proposto (Figura 40).

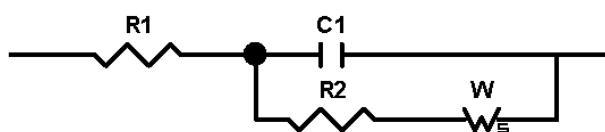


Figura 40- Circuito equivalente proposto para os eletrodos FTO, $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$, $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6$ e $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{10}$ na presença de 5 mmol L^{-1} de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ dissolvido em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_3 , pH 7.

O circuito contém a resistência do eletrólito (R_1), um capacitor referente à dupla camada elétrica (C_1), a resistência de transferência de carga (R_2) e uma componente difusional W . Diversos estudos tem aplicado este modelo de circuito equivalente como ferramenta fundamental para elucidar processos existentes na superfície de filmes LbL²³⁰.

Este circuito equivalente é similar ao de outros filmes LbL encontrados na literatura, como o filme LbL $(\text{PPV/PSS})_3$ formado por poli (estireno sulfonado) (PSS) e poli (p-fenilenovinileno) depositados sobre eletrodo de ouro, que exibiu o mesmo comportamento. Neste trabalho os autores investigaram a condutividade de polímeros em filmes finos²³¹.

5.5.2 Impedância do filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] na presença de DA, AU e AA em diferentes pHs

Medidas de EIE foram realizadas com o filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de AA contendo 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] em diferentes valores de pH. Sabendo-se que o pKa do AA é 4,17, em valores de pH superiores a 4,17 o AA se encontra na sua forma aniônica ABT. Sendo assim, alterações de pH podem influenciar as interações existentes na interface eletrodo/solução como mostrado nos diagramas de Nyquist da Figura 41. A Tabela 13 mostra os valores de R2 e C1 calculados a partir dos diagramas de Nyquist utilizando o programa ZView.

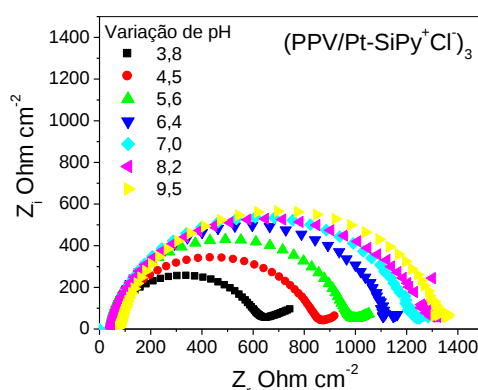


Figura 41- Representação Nyquist (impedância imaginária x impedância real) do filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de AA e 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] preparados em 0,1 mol L⁻¹ de NaNO₃ em diferentes pH.

Tabela 6- R2 e C1 calculados a partir dos diagramas de Nyquist utilizando o programa ZView.

pH	R2 (Ω)	C1 (F)
3,8	575,99	7,879 x 10 ⁻⁶
4,5	776,27	6,234 x 10 ⁻⁶
5,6	923,49	6,151 x 10 ⁻⁶
6,4	1058,2	5,071 x 10 ⁻⁶
7	1142,9	5,688 x 10 ⁻⁶
9,2	1202,1	6,995 x 10 ⁻⁶
9,5	1266	5,864 x 10 ⁻⁶

É possível verificar que o aumento de pH provoca um aumento nos valores de R2 na superfície do filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃. Este aumento, pode ser atribuído à ionização das moléculas de AA que ocorre com o aumento de pH. Após a ionização do AA, este fica

carregado negativamente na forma de ABT que por sua vez, interage eletrostaticamente com os grupos positivos piridínicos do híbrido $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ na superfície externa do filme e dificulta a aproximação do analito até as NPs-Pt, ocasionando o aumento na resistência de transferência de carga. Esta pronunciada interação entre o ABT e a superfície do filme LbL $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ também foi observada pelas medidas de Raman realizadas com o filme após medidas eletroquímicas (Figura 38). Além disso, é importante ressaltar que os valores de R_2 observados são relativamente altos em comparação com os observados nos estudos de EIS com os filmes LbL $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ na ausência de AA (Tabela 12). Portanto, é evidente que a interação entre o AA e a superfície do filme $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ promove um aumento significativo no valor de R_2 (Tabela 13). Isto explica o alto valor de potencial necessário para a oxidação do AA (em torno de 1,55 V) observado nos estudos eletroquímicos com voltametria cíclica (Figura 33).

Neste sentido, um comportamento semelhante é esperado para EIE do filme $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ na presença de AU em diferentes pHs, já que este também exige um alto valor de potencial de oxidação (1,58) como foi verificado nos estudos voltamétricos (Figura 33). No entanto, a solubilidade do AU é afetada com diferentes valores de pHs, dificultando a realização deste estudo.

A Figura 42 ilustra os diagramas de Nyquist obtidos com o filme LbL $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ na presença de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DA contendo 5 mmol L^{-1} de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em diferentes valores de pH. Abaixo do pH 8,93 a DA se encontra carregada positivamente e acima do pH 8,93 ocorre a desprotonação da DA o que a deixa neutra. A Tabela 14 mostra os valores de R_2 e C_1 calculados a partir dos diagramas de Nyquist utilizando o programa ZView.

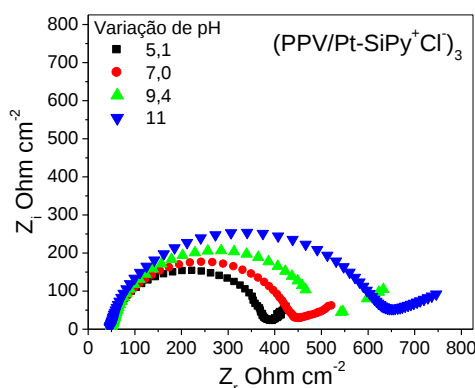


Figura 42- Representação Nyquist (impedância imaginária x impedância real) para o filme $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ na presença de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de DA e 5 mmol L^{-1} de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, ambos preparados em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_3 em diferentes pH.

Tabela 7- R2 e C1 calculados a partir dos diagramas de Nyquist utilizando o programa ZView.

pH	R2 (Ω)	C1 (F)
5,1	334,11	$4,782 \times 10^{-6}$
7,0	387,29	$5,114 \times 10^{-6}$
9,4	451,78	$4,834 \times 10^{-6}$
11,0	575,99	$7,879 \times 10^{-6}$

Ao analisar os valores de R2 na Tabela 14, é verificado um aumento significativo nos valores de R2 com o aumento de pH. É possível verificar que independente da forma da DA, neutra ou positiva, existe uma interação entre a superfície do eletrodo e as moléculas de DA, interação esta que é comprovada pelo aumento nos valores de R2. No entanto esta interação é menos intensa do que a observada entre o ABT e a superfície do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ numa mesma condição experimental (Figura 41).

Da análise dos diagramas de Nyquist ilustrados na Figura 43 determinaram-se os valores de R2 e C1 listados na Tabela 15. Destes dados confirma-se as diferentes intensidades nas interações existentes entre a superfície do filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença dos analitos estudados ($1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de DA, AA e AU, em pH 7).

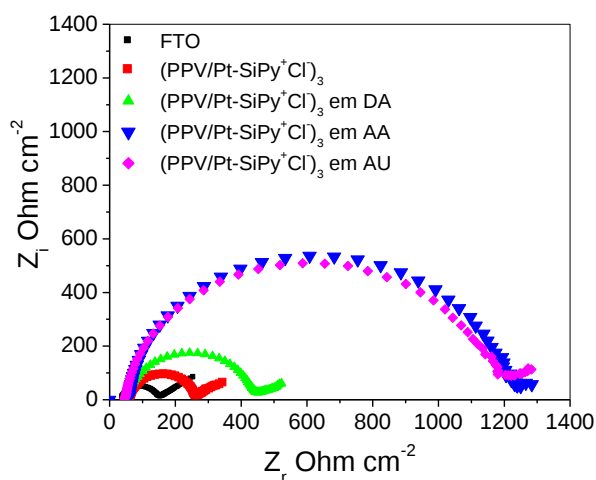


Figura 43- Representação Nyquist para os eletrodos FTO, (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆]; em $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de DA + 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆]; em $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AA + 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆]; em $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de AU + 5 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆]. Ambos em 0,1 mol L⁻¹ de NaNO₃ e pH 7.

Tabela 8- R2 e C1 calculados a partir dos diagramas de Nyquist utilizando o programa ZView.

Eletrodo	R2 (Ω)	C1 (F)
FTO	117,54	$3,57 \times 10^{-6}$
(PPV/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃	199,77	$4,63 \times 10^{-6}$
(PPV/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃ + DA	387,29	$5,114 \times 10^{-6}$
(PPV/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃ + AA	1142,9	$5,688 \times 10^{-6}$
(PPV/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₃ + AU	1127,9	$7,978 \times 10^{-6}$

É possível verificar que o filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ apresenta interações semelhantes na presença do ABT e URT devido aos valores similares de R2, sendo 1142,9 e 1127,9 $\Omega \text{ cm}^{-2}$, para ABT e URT, respectivamente. Para o filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença dos analitos ABT e URT, a impedância de Warburg surge discretamente nas regiões de baixa frequência devido os maiores valores de R2, já que valores altos de R2 implicam na ocorrência de limites difusionais em frequências baixas²³².

Os valores de R2 observados para o filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença dos analitos ABT e URT são significativamente maiores do que na presença de DA (387,29 $\Omega \text{ cm}^{-2}$). Além disto, o valor de R2 obtido com o filme na presença de DA é significativamente maior do que o valor de R2 observado para o filme na ausência de DA (199,77 $\Omega \text{ cm}^{-2}$). Este aumento também explica o valor relativamente alto no potencial de oxidação da DA (0,9 V) observado nos estudos voltamétricos (Figura 30) comparado a outros valores de potenciais encontrados para outros eletrodos como 0,32 V²²¹, 0,12 V²²³, 0,49 V²²². Os resultados de EIE obtidos nesta seção também foram discutidos aplicando o modelo de circuito equivalente proposto e representado na Figura 40.

5.6 Detecção de DA encapsulada em lipossomos com o filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃

Ainda sobre o estudo de detecção de DA, realizou-se o encapsulamento da DA em lipossomos para analisar a possibilidade da detecção eletroquímica deste neurotransmissor, mimetizando sua presença intracelular e extracelular em meios biológicos contendo interferentes como o AA e o AU. Esta estratégia, acerca do estudo de determinação de DA encapsulada em lipossomos é nova, pois não há relatos na literatura sobre este estudo. Para este propósito, inicialmente realizaram-se medidas de DLS para averiguar o tamanho das vesículas lipossômicas contendo a DA e verificou-se que a maioria dos lipossomos hidratados com a solução de DA apresentaram um diâmetro médio de 687 nm (Figura 44). Este valor é

cerca de duas vezes menor que o encontrado para as vesículas de DPPC sem a DA encapsulada, em torno de 1100 nm²³³. Esta diferença de diâmetro dos lipossomos com e sem DA, além de comprovar a presença da DA nos lipossomos, evidencia a eficiência da encapsulação, pois a presença de uma substância polar como a DA nos lipossomos auxilia na compactação destas estruturas. Estudos similares foram realizados por Zhang, Y. *et al.*²³⁴, que verificaram por DLS diferentes diâmetros de lipossomos contendo composições distintas de poli (dopamina) PDA, polietileno glicol (PEG), poli (álcool vinílico) (PVA), e poli (N-vinil-pirrolidona).

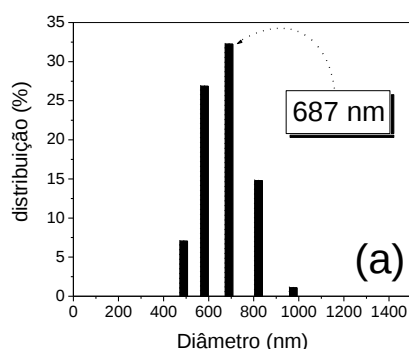


Figura 44- Distribuição de tamanho dos lipossomos contendo DA.

Após a formação de vesículas lipossômicas foram preparados filmes LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl)₃, visto que em ensaios eletroquímicos anteriores esta arquitetura se destacou na oxidação de DA em meio aos interferentes AA e AU em NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ (pH 7). As Figuras 45 (a-d) ilustram respectivamente os voltamogramas cíclicos e de onda quadrada obtidos com este filme na presença do lipossomo DPPC sem e com DA.

Verifica-se nos voltamogramas das Figuras 45 (c) e 45 (d) um processo de oxidação em torno de 0,92 V atribuído à oxidação da DA encapsulada, já que em ensaios anteriores utilizando a DA livre este analito oxidou nesse mesmo potencial ($E_{pa} = 0,91$ V). Após foi realizado um estudo sistemático de voltametria de onda quadrada com o filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl)₃ na presença do lipossomo DPPC contendo DA (LIPO-DA) para avaliar os melhores parâmetros para a detecção de DA. Os melhores parâmetros obtidos foram $f = 10$ Hz, $a = 70$ mV e $\Delta E_s = 1$ mV.

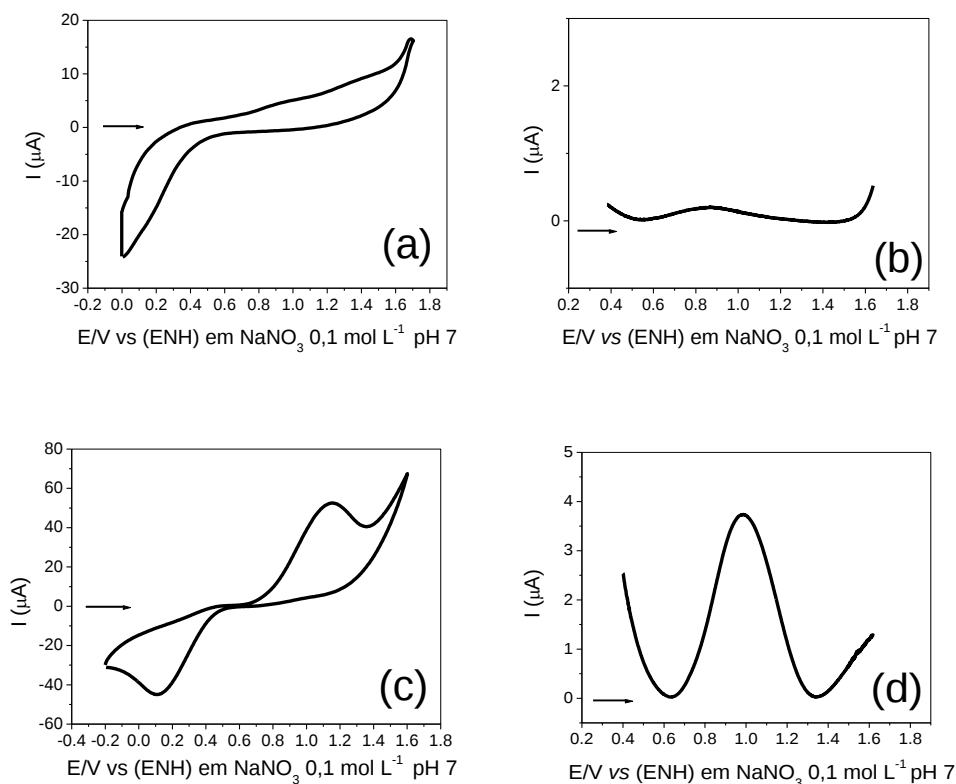


Figura 45- (a) Voltamograma cíclico (b) Voltamograma de Onda Quadrada do filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença do lipossomo de DPPC sem DA em NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ (pH 7). (c) Voltamograma cíclico (d) Voltamograma de onda quadrada do filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença do lipossomo de DPPC com DA encapsulada em NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ (pH 7).

Uma vez otimizadas as condições experimentais, os analitos AA e AU ($6,25 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) foram acrescentados à cela eletroquímica contendo o LIPO-DA com intuito de verificar o efeito de interferentes na detecção de DA encapsulada. Conforme observado nas Figuras 46 (a) e (b) tanto o AA quanto o AU oxidam no mesmo potencial (1,25 V). Além disso, observa-se que a corrente de oxidação de DA na presença do AU é mais intensa (3,27 μA) do que a observada para DA na presença de AA (0,79 μA). O potencial de oxidação para os interferentes AA e AU é cerca de 320 mV mais positivo que o potencial de oxidação da DA encapsulada, logo, este resultado nos mostra a possibilidade de detecção simultânea da DA encapsulada no lipossomo de DPPC em meio a estes interferentes.

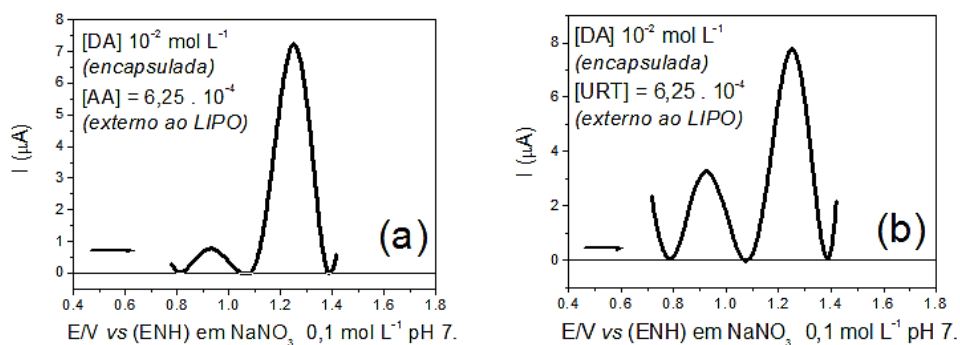


Figura 46- Voltamogramas de onda quadrada do filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença do LIPO-DA em (a) AA, (b) AU ambos $6,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ (pH 7). Parâmetros utilizados: $f = 10 \text{ Hz}$, $a = 70 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 1 \text{ mV}$.

No estudo seguinte adicionaram-se os dois interferentes AA e AU na cela contendo a DA encapsulada e mais uma vez houve sobreposição das correntes de oxidação dos interferentes AA e AU no potencial de 1,25 V, como ilustrado na Figura 47. No entanto, embora os potenciais de oxidação dos interferentes tenham sobrepostos, o fato da DA encapsulada oxidar em potencial mais negativo possibilita a detecção simultânea deste neurotransmissor em meio aos interferentes. Ressalta-se ainda que dos resultados da detecção simultânea com a DA livre na presença de AA e AU realizados em ensaios anteriores com o filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, foi constatada uma diferença do potencial de oxidação da DA e interferentes de 640 mV e este valor é cerca de 320 mV maior que a diferença de potencial obtida nos testes com da DA encapsulada. Portanto é perceptível que a presença do lipossomo de DPPC na cela eletroquímica antecipa os potenciais de oxidação dos interferentes, mas não influencia no potencial de oxidação da DA.

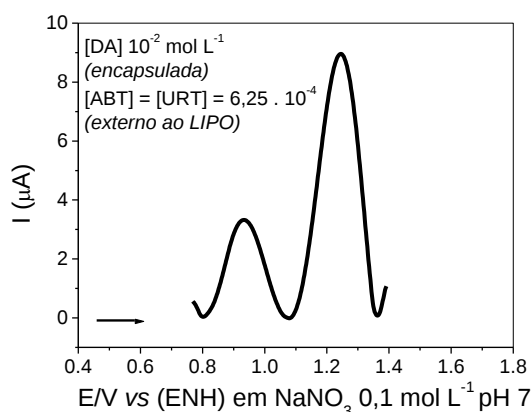


Figura 47- Voltamogramas de onda quadrada do filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença do LIPO-DA e AA e AU misturados ambos $6,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ (pH 7). Parâmetros utilizados: $f = 10 \text{ Hz}$, $a = 70 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 1 \text{ mV}$.

Pode-se explicar o alto potencial de oxidação dos interferentes devido à interação entre o $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ da superfície do eletrodo com o interferentes, pois nas condições experimentais em que os testes foram realizados, tanto com DA livre quanto com a DA encapsulada, o AA e o AU se encontram ionizados nas formas aniônicas de ABT e URT, fato prejudicial ao processo difusional de transferência de carga.

Quando se encapsula a DA no lipossomo verifica-se uma diminuição de cerca de 320 mV no potencial de oxidação dos interferentes. O lipossomo contendo DA ao se aproximar da superfície do eletrodo pode minimizar a interação existente entre o $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ e as espécies aniônicas ABT e URT. Esta minimização nas interações pode ser atribuída à competitividade entre os interferentes e os lipossomos que também podem interagir com a superfície do filme $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$. Ao mesmo tempo em que alguns lipossomos interagem com o $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ do eletrodo, o ABT e URT ficam mais livres para se aproximarem das NPs-Pt, exigindo desta forma um potencial para oxidação dos interferentes menor (1,25 V) que o verificado nos estudo sem os lipossomo (1,60 V).

É importante ressaltar que mesmo ocorrendo a antecipação no potencial de oxidação dos interferentes em meio a DA encapsulada, a diferença de potencial de 320 mV entre os potenciais de oxidação é um excelente valor comparando com outros trabalhos encontrados na literatura, mostrados na Tabela 9.

Tendo verificado a capacidade sensorial do filme LbL $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ *in vitro*, tanto para DA livre, quanto para a DA encapsulada em lipossomos, resolveu-se testar o comportamento deste eletrodo modificado no processo de detecção de DA *in vivo*. Para este teste, foram realizadas medidas eletroquímicas em estriados cerebrais de ratos.

5.7 Detecção de DA em estriado cerebral de ratos com o filme LbL $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ e *drop-coated* de $(\text{C/PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$

Primeiramente foram dissecadas três amostras de estriados de ratos contendo 40, 52 e 57 mg cada. Estas amostras foram sonicadas individualmente em 5 mL de solução de NaNO_3 0,1 mol L^{-1} , pH 7. Após total homogeneização destas amostras elas foram submetidas à centrifugação por 20 minutos na temperatura de 4°C. A fase sobrenadante foi analisada eletroquimicamente por voltametria de onda quadrada utilizando o filme LbL $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$, depositado sobre FTO, como eletrodo de trabalho. O objetivo destes testes era verificar a capacidade sensorial do filme $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ no processo de detecção de DA presente nos estriados cerebrais. No entanto, não foi possível detectar a DA nas amostras

analisadas, uma vez que baseado nas medidas anteriores, esperava-se que a oxidação da DA ocorresse num potencial próximo a 0,9 V.

Além disso, é conhecido de medidas de HPLC reportadas na literatura^{143,144} que a concentração de DA nos estriados é cerca de 8 ug de DA por g de tecido. Extrapolando-se este valor, tem-se aproximadamente 320 ng de DA por amostra estudada. Como as amostras foram diluídas para 5 mL, devido à capacidade volumétrica mínima da cela eletroquímica, estas ficaram com uma concentração aproximada de 64 ng/mL. Logo, este valor equivale a uma concentração de $3,38 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, cujo valor é menor que o limite de quantificação encontrado em ensaios anteriores para o filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de DA (LQ = $2,07 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). Devido à impossibilidade de detecção da DA com o filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ consequente da baixa concentração de DA na cela eletroquímica e visando contornar esta limitação, uma nova estratégia foi proposta.

A nova proposta experimental para detecção de DA em estriados cerebrais de ratos consistiu na modificação de eletrodos impressos de carbono utilizando a técnica *drop-coating*. Antes da análise nas amostras de estriados, realizaram-se estudos prévios do filme *drop-coated* (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de analitos padrões (DA e AA). Para isto, soluções de PPV-SO₃ e Pt-SiPy⁺Cl⁻ foram gotejadas sobre a superfície dos eletrodos impressos obtendo-se o filme *drop-coated* (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃. Cada solução foi gotejada alternadamente por três vezes sobre a superfície dos eletrodos impressos iniciando com a solução de PPV-SO₃ e finalizando com a solução de Pt-SiPy⁺Cl⁻, almejando um filme *drop-coated* com arquitetura similar a do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃.

Diferente dos testes realizados com o filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ sobre FTO, nos eletrodos impressos, a solução de DA em NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹, pH 7, foi adicionada diretamente na superfície do eletrodo na concentração desejada. Desta forma, foi possível investigar a potencialidade sensorial do filme *drop-coated* (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em concentrações menores de DA, de modo a estudar a mesma faixa de concentração encontrada nos estriados cerebrais de ratos.

As Figuras 48 (a) e (b) ilustram respectivamente os voltamogramas cíclicos obtidos com o filme *drop-coated* (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença de diferentes concentrações de DA (31 µmol L⁻¹ e 700 µmol L⁻¹).

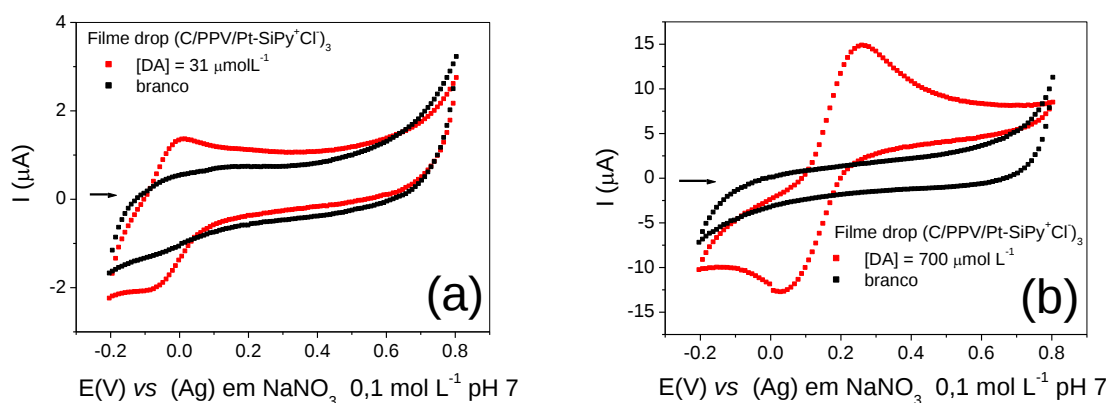


Figura 48- Voltamogramas cíclicos do filme *drop-coated* (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl)₃ na presença de (a) 31 μmol L⁻¹ de DA e (b) 700 μmol L⁻¹ de DA. ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$).

Nos voltamogramas obtidos pode-se notar que na concentração de 31 μmol L⁻¹ a DA é oxidada em 0,002 V e este potencial é menor do que o observado na concentração de DA igual a 700 μmol L⁻¹ ($E_{pa} = 0,26 \text{ V}$).

Para averiguar a dependência do potencial de oxidação de DA em função da concentração, foram estudadas outras faixas de concentração de DA (1 a 700 μmol L⁻¹ e de 1 μmol L⁻¹ a 1 x 10⁴ μmol L⁻¹), cujos resultados são ilustrados nas Figuras 49 (a) e (b). Neste estudo constatou-se que à medida que a concentração aumenta o potencial de oxidação de DA se desloca para regiões mais positivas. Um exemplo disto é que no intervalo de concentração de DA compreendido entre 1 a 700 μmol L⁻¹ (Figura 49 (a)), verifica-se um deslocamento no potencial de oxidação de DA cerca de 12,4 mV e no intervalo ainda maior (1 a 1 x 10⁴ μmol L⁻¹) (Figura 49 (b)), o deslocamento é mais afetado (506 mV).

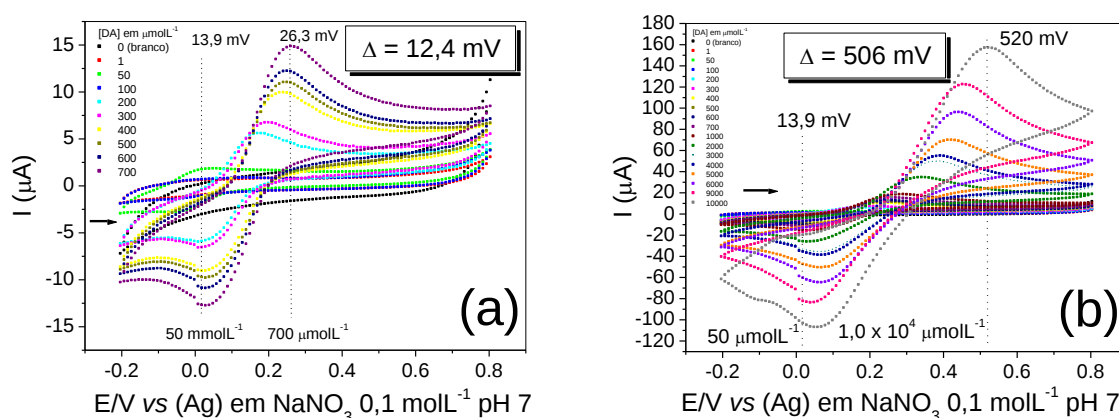


Figura 49- Voltamogramas cíclicos do filme *drop-coated* (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl)₃ na presença de diferentes concentrações de DA (a) 1 a 700 μmol L⁻¹ e (b) 1 a 1 x 10⁴ μmol L⁻¹ ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$).

A dependência do potencial de oxidação de DA e a concentração é explicada em termos da interação da DA com as NPs-Pt presentes na superfície do eletrodo (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl)₃. Quando a concentração de DA é baixa todas as moléculas de DA são oxidadas de tal forma que o processo de transferência de elétrons é auxiliado pelas NPs-Pt, que nestas concentrações de DA, se encontram em grande parte disponíveis para eletrocatalisarem a oxidação deste analito e desta forma exigem um potencial de oxidação menos positivo. Com o aumento da concentração de DA, a quantidade de dopaminaquinona (DQ) próxima à superfície do eletrodo é maior gerando uma competitividade do processo redox e desta forma, dificulta o acesso de DA até as NPs-Pt, o que exige um maior potencial para oxidar a DA. À medida que a concentração de DA aumenta, a quantidade de DQ também aumenta, acarretando o deslocamento no potencial de oxidação de DA, pois a competitividade implica na exigência de um potencial cada vez mais positivo.

Comportamento semelhante foi verificado por Barnes *et al.*²³⁵, que investigaram a oxidação e os efeitos de adsorção de DA sobre um micro-eletrodo de platina em diferentes líquidos iônicos. Os autores observaram que a oxidação de DA ocorreu em três etapas sobre a superfície do eletrodo. De acordo com os autores, primeiramente a DA é oxidada à semi-quinona (0,6 V) (*etapa 1*), que sequencialmente se oxida à quinona (0,75 V) (*etapa 2*), a qual por sua vez, é convertida a um radical catiônico (1,1 V) (*etapa 3*) que provavelmente reage sequencialmente (1,8 V). Estes autores constataram que a semi-quinona formada em 0,6 V, adsorve sobre a superfície do micro-eletrodo de platina, fazendo com que as demais etapas oxidativas ocorram em potenciais mais positivos.

Um comportamento semelhante foi observado por Rao, *et al.*²³⁶ que observaram um deslocamento para potenciais mais positivos na oxidação de DA sobre NPs-Au dispersas em MWCNTs depositados em carbono vítreo. Os autores atribuíram o deslocamento ao fato de que, em concentrações baixas a DA oxida mais facilmente na superfície do eletrodo, exigindo um potencial menor, mas à medida que a concentração de DA aumenta, ocorre adsorção na superfície do eletrodo ocasionando uma proporção incompatível entre as NPs e a concentração de DA o que leva a um deslocamento para potenciais de oxidação mais positivos.

Uma vez conhecido o comportamento da DA, o estudo posterior foi avaliar o comportamento do filme *drop-coated* (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl)₃ na presença do interferente AA. Para efeito de comparação, a Figura 50 ilustra o voltamograma cíclico obtido com o filme *drop-coated* (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl)₃ na presença de DA e AA, ambos na concentração de 10

$\mu\text{mol L}^{-1}$. Destes voltamogramas é observado que a DA apresenta um processo redox definido ($E_{pa} = 0,1 \text{ V}$ e $E_{pc} = 0,02 \text{ V}$), diferente do AA, o qual não demonstra processo redox definido. A ausência do sinal do AA mostra que este resultado será interessante para a detecção de DA em amostras biológicas, tal como os estriados cerebrais, pois este eletrodo é seletivo à DA.

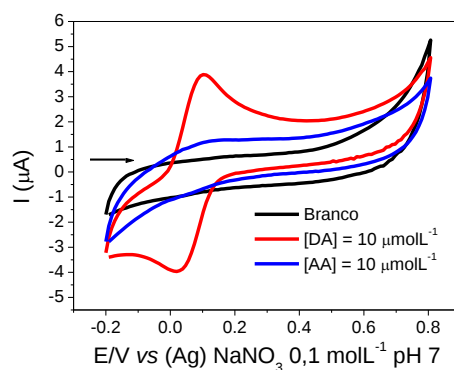


Figura 50- Voltamogramas cíclicos do filme *drop-coated* $(\text{C}/\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ na presença de DA e AA, ambos $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$).

Na investigação do transporte de carga na superfície do filme $(\text{C}/\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$, a relação I_{pa} vs $v^{1/2}$ na presença de $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 51 (a)) e $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 51 (b)) de DA, indicou uma relação linear com valores de $R = 0,994$ e $R = 0,989$, respectivamente. Isto indica que o processo redox deste analito sobre o eletrodo é controlado por difusão, para ambas as concentrações²²⁷.

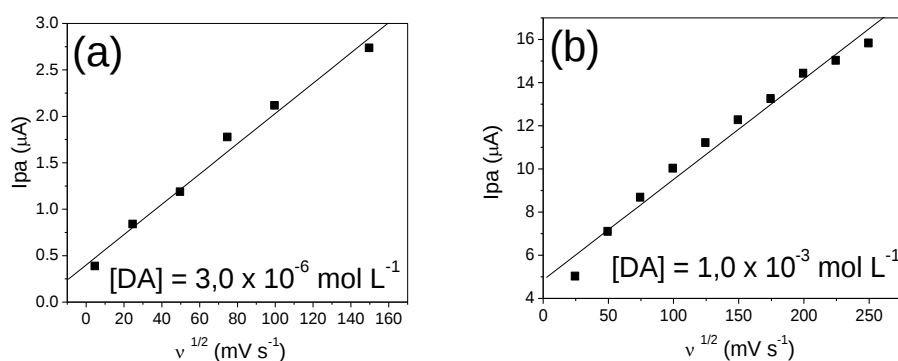


Figura 51- Gráfico da relação entre o I_{pa} e $v^{1/2}$ na presença de DA: (b) $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e (d) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Além do eletrodo impresso de carbono modificado, a oxidação da DA foi estudada no eletrodo impresso de platina e de carbono sem modificação para atestar a viabilidade da modificação da superfície do eletrodo. A escolha pela modificação do eletrodo de carbono ao invés do de platina, se deve ao fato de que o carbono não apresenta processo redox na faixa de

potencial investigada para determinação de DA. Como pode ser visto na Figura 52 (a) e (b), nas menores concentrações de DA (3 e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$) o eletrodo modificado formado pelo filme *drop-coated* $(\text{C/PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ foi o único que apresentou um processo redox definido, porém na concentração superior ($60 \mu\text{mol L}^{-1}$) todos estes eletrodos foram eficazes na detecção de DA (Figura 52 (c)). Apesar dos eletrodos de Pt e carbono apresentarem um par redox ($E_{pa} = -0,015 \text{ V}$ e $E_{pc} = -0,007 \text{ V}$ e $E_{pa} = 0,35 \text{ V}$ e $E_{pc} = -0,05 \text{ V}$, respectivamente), verifica-se que a corrente de oxidação da DA é menos intensa ($I_{pa} = 0,92$ e $1,09 \mu\text{A}$, respectivamente) que a observada com o filme *drop-coated* $(\text{C/PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ ($I_{pa} = 1,80 \mu\text{A}$).

Ao comparar os eletrodos com Pt, nota-se que a intensificação da corrente obtida no filme *drop-coated* $(\text{C/PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ pode ser atribuída à presença das NPs-Pt, as quais fornecem maior área ativa no eletrodo em comparação com a platina *bulk* no eletrodo impresso de Pt. Além disto, foi observado que a oxidação da DA ocorre em potencial menos positivo nos eletrodos contendo platina do que no eletrodo impresso de carbono ($E_{pa} = 0,33 \text{ V}$). Estas constatações evidenciam a importância da platina na detecção de DA, principalmente quando esta se encontra na forma de NPs.

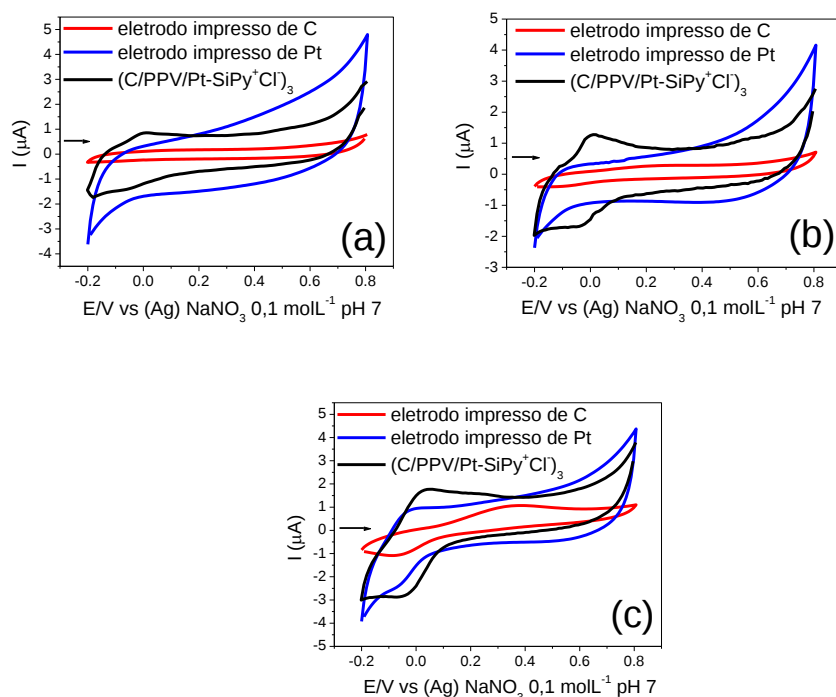


Figura 52- Voltamogramas cíclicos dos eletrodos $(\text{C/PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$, impresso de Pt e impresso de C nas concentrações de DA: (a) $3 \mu\text{mol L}^{-1}$ (b) $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (c) $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$).

A fim de verificar a contribuição das espécies constituintes do filme (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ no processo de transferência de elétrons, foram preparados sobre o eletrodo impresso de carbono filmes *drop-coated* com os precursores PPV-SO₃ (C/PPV-SO₃)₃ e Pt-SiPy⁺Cl⁻ (C/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃. Estes eletrodos foram comparados com os eletrodos impressos de carbono, impresso de platina e com o filme (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na determinação de DA nas concentrações de 60 µmol L⁻¹ (Figura 53 (a)) e 1,0 x 10³ µmol L⁻¹ (Figura 53 (b)).

Na concentração de 60 µmol L⁻¹ de DA, verifica-se na Figura 53 (a) que os filmes (C/PPV-SO₃)₃ e (C/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ também detectam este analito. No entanto, com estes filmes a DA é oxidada em potenciais mais positivos, com E_{pa} = 0,32 e 0,33 V respectivamente para (C/PPV-SO₃)₃ e (C/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃. Embora os precursores proporcionem a oxidação da DA em potenciais mais positivos, quando combinados, o compósito (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ oxida a DA em um potencial mais negativo (E_{pa} = 0,03 V). A vantagem deste resultado é que quanto menor o potencial de oxidação, menos interferentes estarão sujeitos a oxidarem nesta faixa de potencial.

Em 1,0 x 10³ µmol L⁻¹ de DA (Figura 53 (b)), todos os eletrodos testados apresentam o processo redox da DA e novamente nota-se que a combinação da mistura PPV-SO₃ e o Pt-SiPy⁺Cl⁻ durante a formação do filme *drop-coated*, proporciona a oxidação da DA em potencial menor, sendo 0,28 V para (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, 0,41 V para (C/PPV-SO₃)₃ e 0,46 V para (C/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃. Outra constatação é que os eletrodos (C/PPV-SO₃)₃ e (C/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ oxidaram a DA em potencial mais negativo que o potencial de oxidação de DA verificado com o eletrodo impresso de carbono sem modificação (E_{pa} = 0,51 V), evidenciando a vantagem da modificação da superfície eletródica.

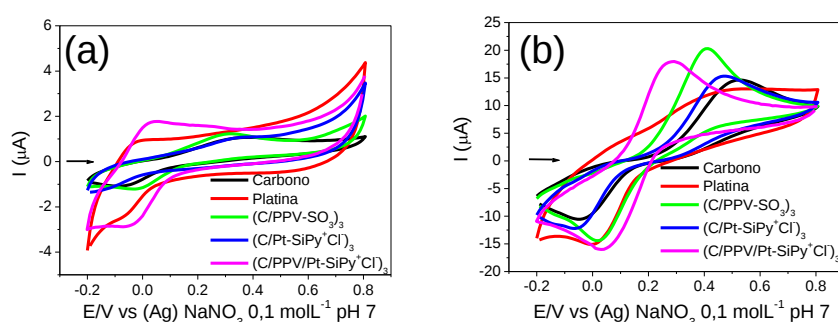


Figura 53- Voltamogramas cíclicos dos eletrodos impressos de Pt, e de C (sem modificação e modificados) e (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃, nas concentrações de DA: (a) 60 µmol L⁻¹ e (b) 1,0 x 10³ µmol L⁻¹ (v = 50 mV s⁻¹).

Conhecida a potencialidade do filme *drop-coated* (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na oxidação da DA, partiu-se para as amostras de estriados cerebrais de ratos, contendo 74 e 109,5 mg de

tecido. No voltamograma cíclico obtido na presença da solução contendo 109,5 mg de estriado (Figura 54 (a)) pode ser visto um processo redox com $E_{pa} = 0,17$ V e $I_{pa} = 7,03$ V, atribuído ao processo redox da DA, enquanto que na concentração inferior (74 mg de tecido) o processo não é definido.

Para confirmar a atribuição do processo redox do estriado, comparou-se os voltamogramas cíclicos obtidos com o filme *drop-coated* $(C/PPV/Pt-SiPy^+Cl^-)_3$ em $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DA em NaNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com e sem estriado (Figura 54 (b)), ou seja, foram adicionados $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DA na amostra de estriado. Destes voltamogramas nota-se que o aumento no potencial de oxidação de DA na solução contendo o estriado ($E_{pa} = 0,17$ V) se deve ao efeito de matriz que desloca o potencial de oxidação da DA em relação ao observado com a solução sem estriado ($E_{pa} = 0,08$ V). Além disso, é possível observar que o voltamograma referente à oxidação de DA presente no estriado apresentou uma queda ôhmica maior que o voltamograma referente à oxidação de DA em meio de NaNO_3 . A presença desta deformação por queda ôhmica também pode ser atribuída ao efeito de matriz. Para melhor visualizar os valores de E_{pa} de oxidação da DA integrou-se os valores de corrente em função do potencial aplicado dos voltamogramas apresentados na figura 54 (a) a fim de eliminar os efeitos de carregamento da dupla camada e de queda ôhmica. Fitou-se os dados obtidos da integração por meio de uma gaussiana no intervalo de potencial de $-0,1$ V a $0,25$ V (Figura 54 (c)).

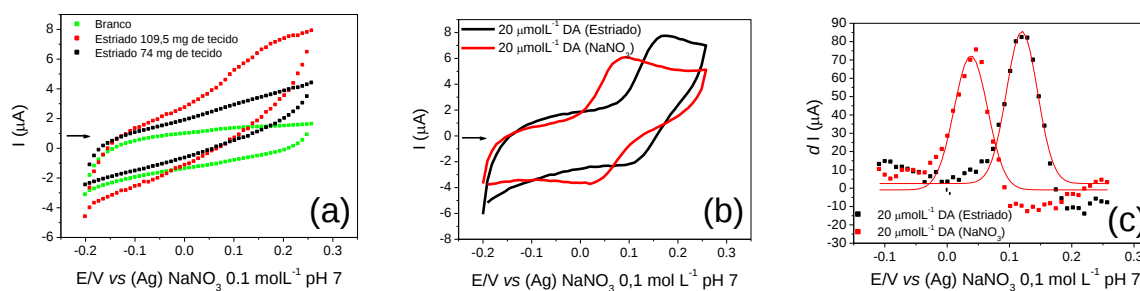


Figura 54- Voltamogramas cíclicos do filme *drop-coated* $(C/PPV/Pt-SiPy^+Cl^-)_3$ em amostras de estriados (a) contendo 74 e 109,5 mg; (b) contendo $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DA e sem estriado ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$); (c) gráficos da gaussiana dos valores integrados de I_{pa} da DA provenientes dos voltamograma cíclicos no intervalo de potencial de $-0,1$ a $0,25$ V.

A confirmação do processo redox da DA no voltamograma cíclico do filme *drop-coated* $(C/PPV/Pt-SiPy^+Cl^-)_3$ na presença do estriado, foi obtida pela adição de padrão na amostra com $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DA e verificou-se um aumento na corrente de oxidação como ilustrado na Figura 55.

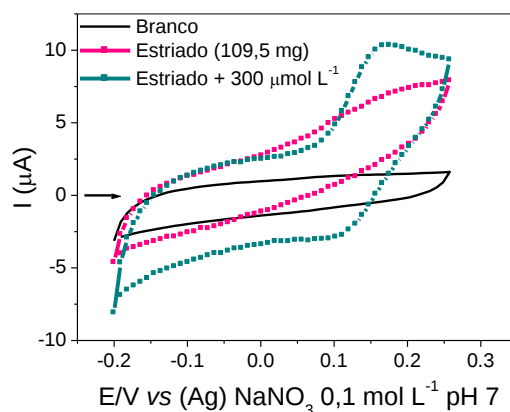


Figura 55- Voltamogramas cíclicos do filme *drop-coated* (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ na presença do estriado e na presença do estriado com adição de 300 μmol L⁻¹ de DA em NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ (v = 50 mV s⁻¹).

Visando determinar a concentração de DA presente no estriado (109,5 mg), foram realizadas medidas eletroquímicas com o filme (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em diversas concentrações de DA (Figura 56 (a)). Foram obtidas as integrais e gaussianas dos valores de corrente de oxidação para DA retirados dos voltamogramas cíclicos (Figura 56 (b)) e deste gráfico, obteve-se a curva de calibração (Figura 56 (c)), a partir da qual, encontrou-se 42,54 μmol L⁻¹ de DA presente na amostra.

Estudos de determinação de DA em estriados cerebrais de ratos realizados por HPLC^{143,144} mostram que a quantidade de DA no estriado é aproximadamente 8 μg por grama de tecido. Sendo assim, para a quantidade de estriado investigada (109,5 mg) deveria haver cerca de 46,2 μmol L⁻¹ de DA. Este valor é muito próximo a 42,54 μmol L⁻¹ encontrado pelas medidas eletroquímicas realizadas com o eletrodo formado com o filme (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃. Este resultado comprova a eficiência do sensor construído e nos proporciona uma nova ferramenta para determinação de DA em amostras biológicas, visto que a detecção eletroquímica como descrita neste trabalho, é mais rápida que a determinação por HPLC, pois medidas eletroquímicas não requerem a utilização de coluna de separação, o que de certa forma encarece o procedimento experimental.

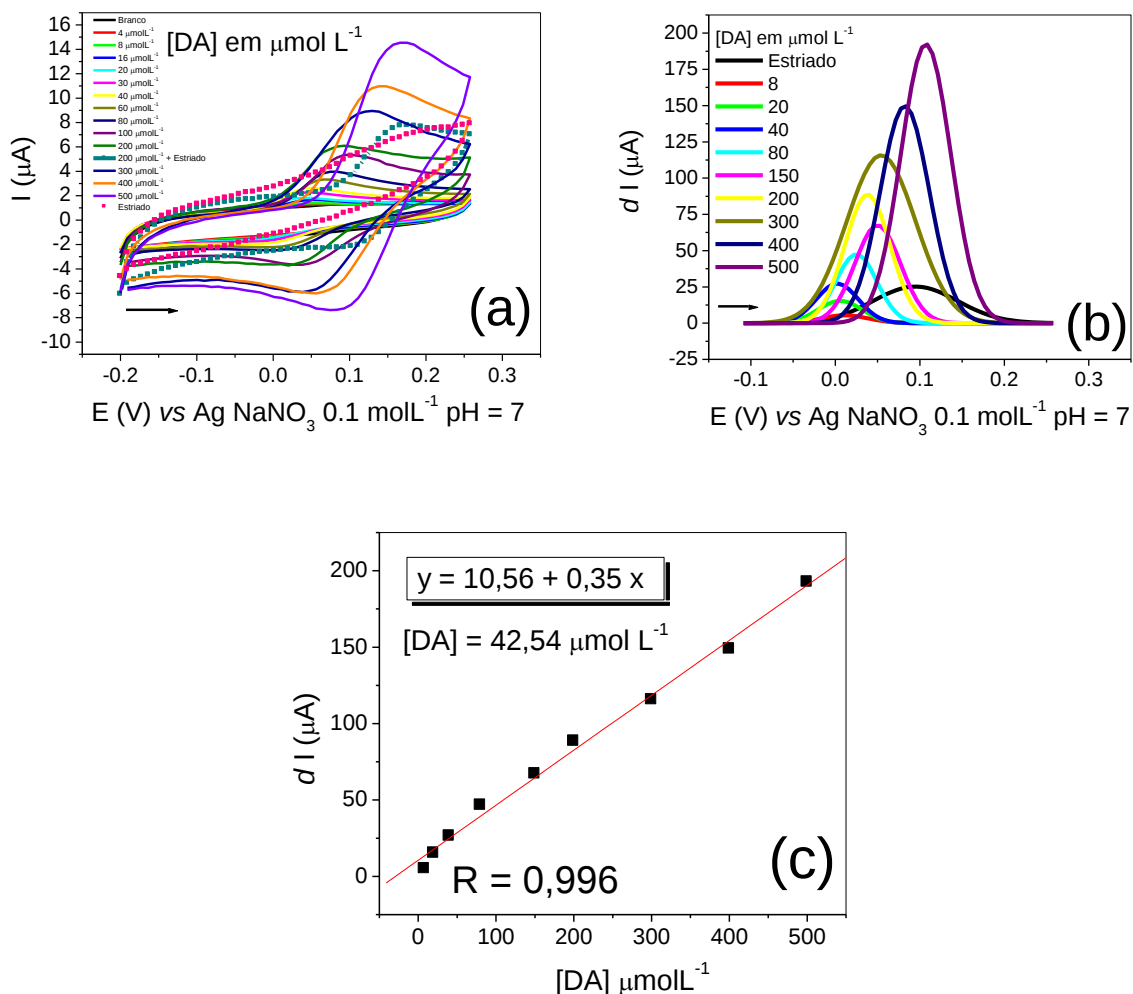


Figura 56- (a) Voltamogramas cíclicos do filme *drop-coated* (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ em diferentes concentrações de DA; (b) gráficos da gaussiana dos valores integrados de I_{pa} da DA provenientes dos voltamograma cíclicos no intervalo de potencial de -0,1 a 0,25 V; (c) curva de calibração obtida em diferentes concentrações de DA ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$).

5.8 Detecção de H₂O₂ com filmes LbL de PPV-SO₃ e Pt-SiPy⁺Cl⁻

Tendo em vista a importância da detecção de H₂O₂ em reações enzimáticas de GOx visando a determinação indireta de glicose, foram realizados estudos eletroquímicos com os filmes LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)_n e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)_n contendo 1, 3, 6, 10 e 15 bicamadas, frente a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H₂O₂ em PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7. Na análise dos voltamogramas obtidos (Figura 57) verifica-se que os filmes LbL oxidam o H₂O₂ num potencial em torno de 1,06 V (Figura 57 (a), por voltametria cíclica, e no potencial de 0,85 V (Figura 57 (b) por voltametria de pulso diferencial). Este menor valor de potencial de oxidação verificado com a

voltametria de pulso diferencial se deve ao fato desta técnica ser mais sensível que a voltametria cíclica.

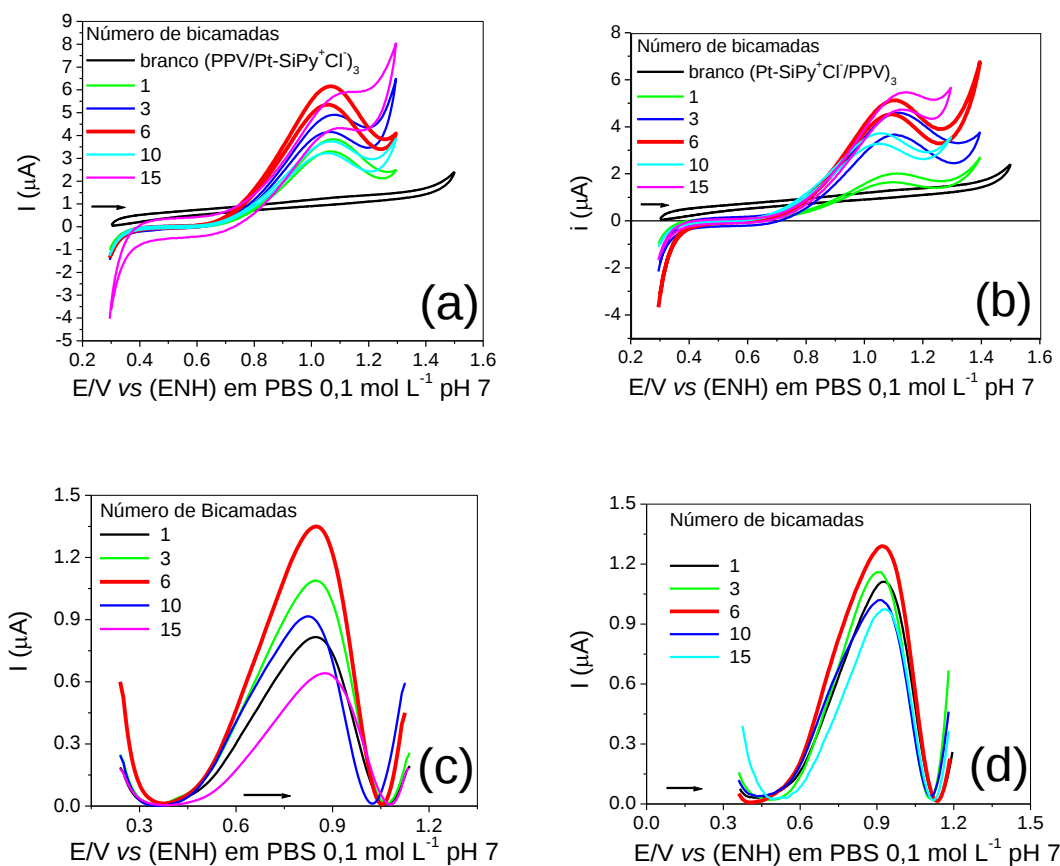


Figura 57- Voltamogramas cíclicos de (a) filme $(PPV/Pt-SiPy^+Cl)_n$ (b) filme $(Pt-SiPy^+Cl/PPV)_n$; Voltamogramas de pulso diferencial de (c) filme $(PPV/Pt-SiPy^+Cl)_n$ e (d) filme $(Pt-SiPy^+Cl/PPV)_n$, $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$.

Em ambas as arquiteturas, os filmes LbL com 6 bicamadas forneceram picos de corrente de oxidação mais intensos em potenciais ligeiramente mais baixos. Além disso, da mesma forma que para a oxidação da DA, o filme $(PPV/Pt-SiPy^+Cl)_6$, onde as NPs-Pt se encontram na superfície do filme expostas à solução, apresentou I_{pa} maior (6,23 μA) (Figura 57 (a)) do que com o filme $(Pt-SiPy^+Cl/PPV)_6$ ($I_{pa} = 5,15 \text{ μA}$), para uma mesma concentração de H_2O_2 (Figura 57 (b)).

A viabilidade da modificação do eletrodo FTO é confirmada pela comparação dos voltamogramas obtidos com o FTO sem modificação. É perceptível que as correntes de oxidação do H_2O_2 aparecem mais acentuadas utilizando os filmes LbL $(PPV/Pt-SiPy^+Cl)_6$ e $(Pt-SiPy^+Cl/PPV)_6$ do que as evidenciadas no voltamograma obtido apenas com o FTO ($I_{pa} = 2,79 \text{ μA}$), como ilustra a Figura 58 (a). Desta forma, é possível constatar que a presença dos

modificadores PPV-SO₃ e Pt-SiPy⁺Cl⁻ na superfície do FTO auxiliam a determinação do peróxido, otimizando o processo redox deste analito.

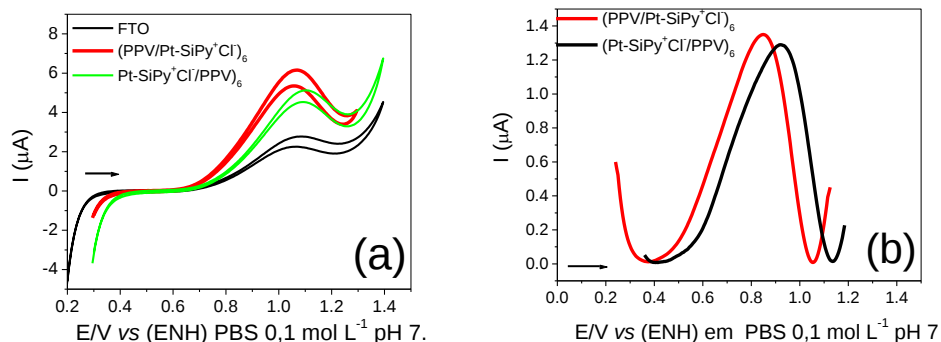


Figura 58 - (a) Voltamogramas cíclicos do FTO, dos filmes LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)₆ na presença de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de DA (b) Voltamogramas de pulso diferencial dos filmes LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ e (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)₆ em $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de H₂O₂.

Ao comparar as respostas eletroquímicas obtidas com os filmes LbL contendo 6 bicamadas, constata-se que o filme LbL com a arquitetura (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ exibiu melhores respostas ($E_{pa} = 1,06$ V e $I_{pa} = 6,23$ μA) do que as observadas para o filme (Pt-SiPy⁺Cl⁻/PPV)₆ ($E_{pa} = 1,10$ V e $I_{pa} = 5,15$ μA) (Figura 58 (a)). Estas observações evidenciam que a sequência de deposição nos filmes LbL influencia consideravelmente a resposta eletroquímica, da mesma forma que foi verificado nos estudo de determinação de DA. Novamente, confirma-se que a presença de NPs-Pt na superfície externa dos filmes auxilia no processo de transferência de elétrons promovendo a eletrocatalise do H₂O₂. Isto pode ser comprovado pela análise eletroquímica do filme LbL sem as NPs-Pt (PPV/SiPy⁺Cl⁻)₆ na presença de H₂O₂, que não exibiu o processo redox referente ao H₂O₂ como mostrado na Figura 59.

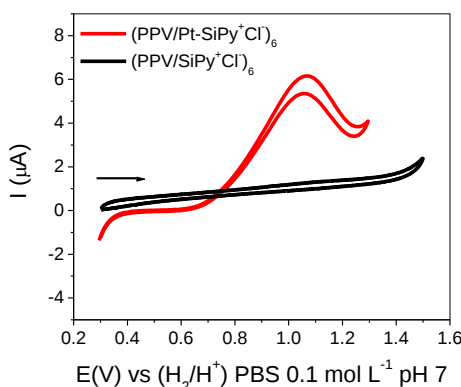


Figura 59- Voltamogramas cíclicos de (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ e (PPV/SiPy⁺Cl⁻)₆ LbL films na presença de [H₂O₂] = $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em 0,1 mol L⁻¹, PBS (pH 7) a 30 mVs⁻¹.

Um comportamento semelhante foi observado no estudo realizado por Tsai *et al.*²³⁷, que constataram que a atividade eletrocatalítica do H_2O_2 é proporcionada pela presença de NPs-Pt no eletrodo modificado com NPs-Pt e nanotubos de carbono. Wu *et al.*²³⁸, observaram que o filme contendo 6 bicamadas de quitosana, NPs-Au, GOx e polianilina sobre eletrodo de Pt mostraram melhores respostas amperométricas numa faixa de 0.5–16 mM com um LD de 7, 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os autores atribuíram estas respostas à presença de NPs-Au na superfície do eletrodo, que aumentaram a área superficial, promovendo a imobilização da GOx e aceleraram o processo de transferência de elétrons do H_2O_2 formado na reação enzimática devido à excelente condutividade.

Tendo em vista o melhor desempenho do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ para determinação de H_2O_2 , observou-se da relação entre I_{pa} e a raiz quadrada da velocidade de varredura (Figura 60 (a)), que o processo redox do H_2O_2 é controlado por difusão²²⁷. Além disso, verificou-se que o eletrodo (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ promoveu uma redução do sobrepotencial de ativação do H_2O_2 , o que de acordo com a correlação de Nicholson e Shain²²⁸, sugere um processo de transferência de elétrons auxiliado pela presença do Pt-SiPy⁺Cl⁻ e do PPV-SO₃ no eletrodo modificado, como ilustra a Figura 60 (b).

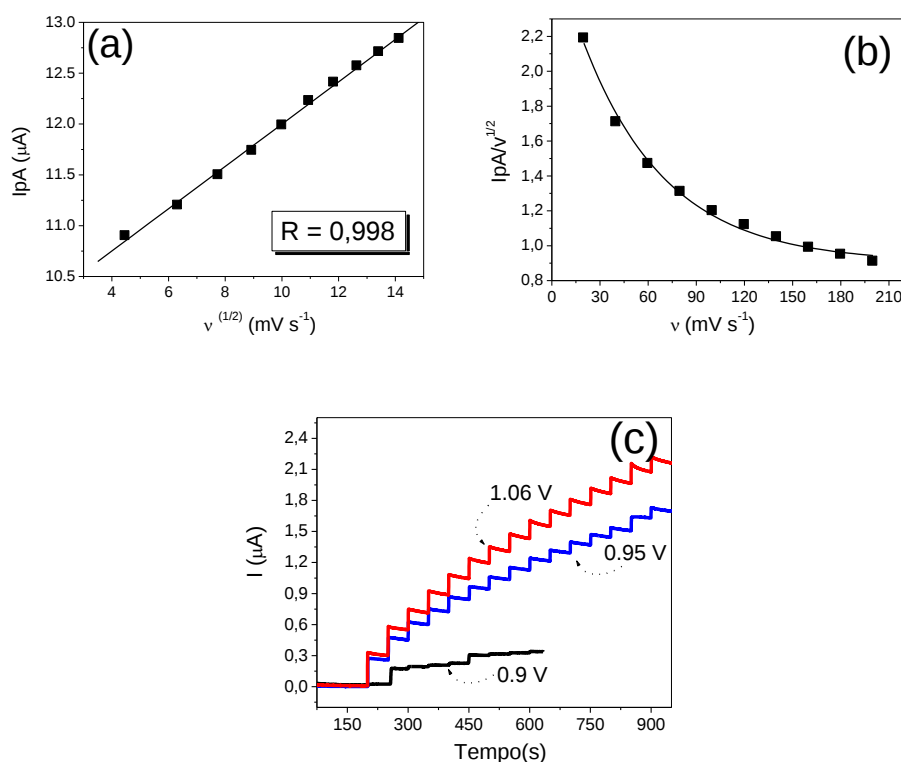


Figura 60- (a) Relação entre a I_{pa} e a raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 ; (b) Gráfico de $I_{pa}/v^{1/2}$ em função de $v^{1/2}$ do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ em H_2O_2 $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (c) cronoamperogramas em diferentes concentrações de H_2O_2 (intervalo da adição = 50 s).

Nas Figuras 58 (a) e 58 (b) verifica-se que com o filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ oxidou o peróxido em 1,06 V (por voltametria cíclica, Figura 58 (a)) e em 0,84 (por voltametria de pulso diferencial, Figura 58 (b)). Portanto, com intuito de averiguar o melhor potencial para oxidação do H₂O₂ realizaram-se medidas de cronoamperometria com o filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆, nos potenciais 0,9, 0,95 e 1,06 V, para detecção de H₂O₂. Como pode ser visto nos cronoamperogramas ilustrados na Figura 60 (c), o Epa em 1,06 V é mais sensível à oxidação do H₂O₂, pois apresentou maior intensidade no sinal de corrente de oxidação a cada adição de H₂O₂ e consequentemente resultou em uma melhor correlação linear (R = 0,998) em diferentes concentrações do analito.

5.9 Preparação, caracterização e aplicação do biossensor (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ GOx

Após comprovada a oxidação do H₂O₂ pelo filme LbL, imobilizou-se a enzima glicose oxidase (GOx) sobre o filme LbL, obtendo-se a arquitetura (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆GOx. A deposição enzimática sobre o filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ foi realizada na última camada similar à outros estudos^{182,223}, devido à quantidade de enzima ser suficiente para propiciar a reação enzimática que ocorre na interface eletrodo-solução. Outros trabalhos relatam a utilização na GOx como poliânion na construção de filmes LbL, pois muitas vezes a quantidade de GOx depositada na última camada não é suficiente para reação enzimática^{180,182,120}. A compreensão da estrutura conformacional (α -hélice) da enzima GOx imobilizada na superfície do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ foi obtida por medidas de CD da solução de GOX 2 mg mL⁻¹ preparada em PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7. Foram observadas nos espectros da solução de GOX, Figura 61 (a), as transições características do espectro de CD da estrutura α -hélice, sendo 193 nm (transição forte perpendicular ao eixo da hélice), 206 e 216 nm (ambas paralelas ao eixo da hélice)²⁰³. A presença destas bandas no espectro da solução de GOx, comprova a estabilidade conformacional da enzima na solução preparada sob as condições de imobilização.

Objetivando verificar a relação entre o tempo de imersão e a manutenção estrutural da GOx, filmes LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ foram imersos na solução de GOx 2 mg mL⁻¹ em diferentes tempos de imersão (5, 15 e 30 minutos). Ao analisar os espectros dos filmes (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆GOx (Figura 61 (b)), averiguou-se as bandas de absorção características da conformação α -hélice nos espectros dos filmes obtidos em todos estes tempos. Além disto, é evidente que uma maior absorbância das transições nos filmes com 15 e 30 minutos de

imersão, pois uma maior quantidade de enzima está disponível na superfície destes eletrodos, em relação às quantidades de GOx no filme $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6\text{GOx}/5$ minutos. No entanto, para garantir maior quantidade de enzima na superfície do eletrodo, escolheu-se o tempo de 30 minutos para a imobilização da GOx.

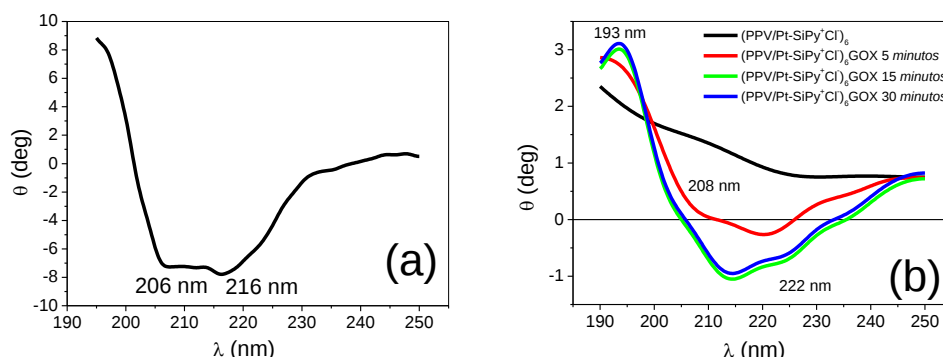


Figura 61- Espectros de CD (a) 0,015 mg mL⁻¹ de solução de GOx em 0,1 mol L⁻¹ de PBS, pH 7; e (b) filmes LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6$ e $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6\text{GOx}$, preparados em diferentes tempos de imersão da GOx, sobre quartzo.

Além disso, é evidente a ocorrência de deslocamentos das bandas de absorção da GOx imobilizada em relação à GOx em solução (206 para 208 nm, e 216 para 222 nm, respectivamente), os quais podem ser atribuídos às interações existentes entre a superfície do filme $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6$ e a enzima GOx. Nas condições em que a solução de GOx foi preparada, a enzima se encontra carregada negativamente, isto nos evidencia que além de interações secundárias também há interações eletrostáticas entre a enzima e a superfície externa positiva do filme, como ilustrado no esquema da Figura 62. Estes resultados mostram a eficiência do processo de imobilização enzimática, preservando a estrutura secundária da GOx. Semelhante comportamento foi observado por Ren *et al.*²³⁹, que observaram deslocamentos nas bandas da enzima GOx e com menor intensidade no compósito GOx/ZnO em relação a GOx pura, fato que comprovou que a GOx interage com a superfície das nanopartículas de ZnO.

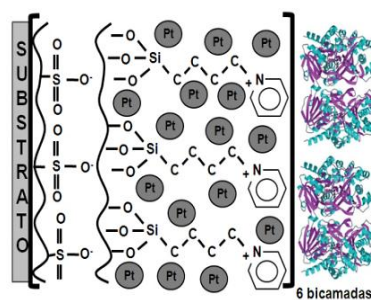


Figura 62- Representação de um filme LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6\text{GOx}$ contendo 6 bicamadas.

Para investigar as interações existentes entre a GOx e o $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ presente na superfície do filme LbL $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6\text{GOx}$, foram obtidos espectros de FTIR dos filmes *drop-coated* (GOx), $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$ e $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6\text{GOx}$ (Figura 63).

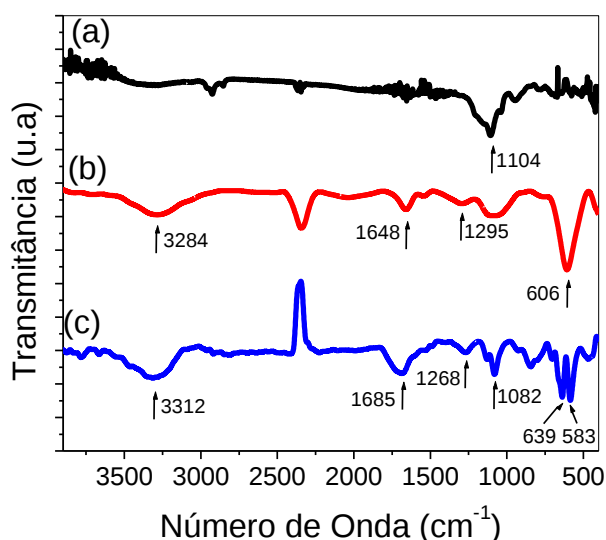


Figura 63 - Espectros de FTIR dos filmes (a) LbL $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$, (b) *drop-coated* (GOx) e (c) LbL $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6\text{GOx}$, depositados sobre silício.

O espectro do filme LbL $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$ (Figura 63 (a)) indicou a presença das bandas características dos precursores PPV-SO_3 e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ como já discutido na seção 5.2 (Figura 15). É possível verificar no espectro do filme *drop-coated* (GOx) (Figura 63 (b)) as bandas atribuídas aos estiramentos C=O das ligações peptídicas de amida I em 1536 cm^{-1} e as bandas atribuídas à deformação no plano do grupo N-H e estiramento C-N dos grupos peptídeos de amida II em 1648 cm^{-1} ²⁴⁰. Estas bandas foram deslocadas no espectro do filme LbL $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6\text{GOx}$ (Figura 63 (c)) de 1536 para 1589 cm^{-1} e de 1648 cm^{-1} para 1685 cm^{-1} . Estes deslocamentos são atribuídos às interações eletrostáticas existentes entre a superfície positiva do filme $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6$ e as cargas negativas da GOx.

A presença das bandas de amida I e amida II nos indica que houve conservação na estrutura secundária da GOx após a imobilização enzimática sobre o filme LbL. Resultados similares são reportados em outros trabalhos da literatura^{241,242,243} como no trabalho de Jesus *et al.*²⁴⁴ que verificaram deslocamentos das bandas de amida I de 1536 para 1546 cm^{-1} e das bandas de amida II de 1650 para 1654 cm^{-1} no filme LbL $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx}/\text{Nafion})$. No entanto, estes deslocamentos foram mais discretos do que os observados para o filme LbL $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6\text{GOx}$, o que nos indica que as interações eletrostáticas

entre o $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ e a GOx são mais efetivas do que as interações entre SiPy^+Cl^- e GOx no filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx}/\text{Nafion})$.

Além disso, também são observadas no espectro do filme *drop-coated* (GOx) as bandas de amida A (3284 cm^{-1}), amida III (1295 cm^{-1}), amida IV e/ou amida V (670 cm^{-1})^{244,245} que são deslocadas após a imobilização da GOx sobre o filme LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6$ GOx para 3312, 1268 e 583-639, respectivamente. A banda A ocorre essencialmente devido aos estiramentos vibracionais N-H²⁴⁵. A banda de amida III é uma banda complexa e depende da natureza das cadeias laterais e das ligações de hidrogênio²⁴³. As bandas de amida IV e V ocorrem devido à deformação OCN e deformação fora do plano de NH, respectivamente²⁴⁵. No espectro do filme *drop-coated* (GOx) (Figura 63 (b)) as bandas amida IV e V aparecem sobrepostas (606 cm^{-1}) enquanto no espectro do filme LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6$ GOx (Figura 63 (c)) as bandas aparecem bem nítidas ($583\text{-}639\text{ cm}^{-1}$) o que pode ser atribuído a melhor organização no filme LbL comparado com o filme *drop-coated* GOx.

A banda do PPV-SO₃ em 1138 cm^{-1} atribuída ao estiramento assimétrico (S=O)¹⁷ e as bandas do SiPy^+Cl^- em 1106 e $820\text{-}980\text{ cm}^{-1}$ atribuídas respectivamente à estrutura de gaiola (Si-O-Si)^{209,210} e contribuições de estiramento Si-C e deformação de (Si-O-Si)²¹⁰ (Figura 63 (a)) também são deslocadas após imobilização enzimática de 1138 para 1191 cm^{-1} , 1106 para 1082 cm^{-1} e $820\text{-}980$ para $790\text{-}975\text{ cm}^{-1}$. Estes deslocamentos também são atribuídos às interações eletrostáticas no filme LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6$ GOx. A Tabela 16 mostra os modos vibracionais e os valores de números de onda verificados nos espectros da Figura 63.

Tabela 9- Número de onda, grupos e modos vibracionais dos precursores PPV-SO₃, SiPy^+Cl^- , e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ e GOx presentes nos filmes *drop-coated* (GOx), filme LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$ e filme LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6$ GOx sobre o substrato de silício.

Grupos e modos vibracionais	nº de onda <i>drop-coated</i> GOx (cm^{-1})	nº de onda $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_{30}$ (cm^{-1})	nº de onda $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6/\text{GOx}$ (cm^{-1})
ν assimétrico (S=O)	—————	1138	1191
Estrutura de gaiola (Si-O-Si)	—————	1106	1082
ν Si-C e δ (Si-O-Si)	—————	820-980	790-975
δ (N-H) no plano e ν C-N da amida II	1648	—————	1685
ν (C=O) das ligações peptídicas da amida I	1536	—————	1589
ν amida III	1295	—————	1268
ν amida IV e/ou V	606	—————	583-639
ν amida A	3284	—————	3312

Depois da obtenção do filme $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6\text{GOx}$, este foi testado eletroquimicamente frente a concentração de $9,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de glicose, a fim de avaliar a potencialidade do filme como biossensor na detecção indireta de glicose, a partir da oxidação do H_2O_2 gerado no meio reacional enzimático. Ao analisar o voltamograma da Figura 64 (a), obtido com o filme LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6\text{GOx}$ na presença de glicose é possível constatar o perfil voltamétrico do processo redox do H_2O_2 em torno de 1,06 V, evidenciando a atividade da enzima GOx já que o filme contendo 6 bicamadas $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6$ sem a GOx imobilizada, não apresentou resposta na oxidação da glicose (Figura 64 (a)). Isto nos evidencia a importância da imobilização enzimática.

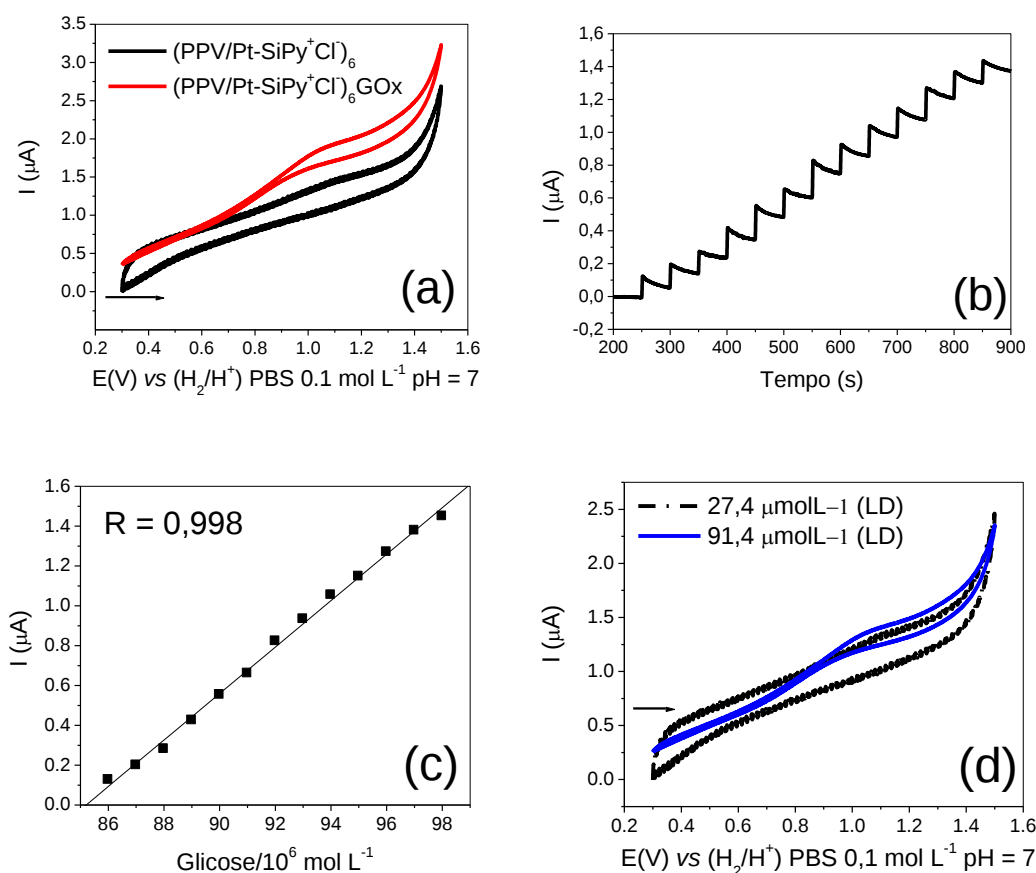


Figura 64- (a) Voltamograma cíclico do filme LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6\text{GOx}$ na presença de glicose $9,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (b) cronoamperometria do filme LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6\text{GOx}$ em diferentes [glicose] (intervalo = 50 s), $E = 1,06 \text{ V}$; (c) curva de calibração obtida na faixa de $8,7 \times 10^{-5}$ a $9,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (d) Voltamogramas cíclicos do filme $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6\text{GOx}$ na presença de glicose 27,4 e 91,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, NaNO_3 , 0,1 pH 7, $v = 30 \text{ mV s}^{-1}$.

A dependência da resposta eletroquímica do filme LbL $(\text{PPV}/\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6\text{GOx}$ em função da quantidade de glicose foi analisada por medidas de cronoamperometria aplicando-se um potencial de 1,06 V na faixa de concentração de H_2O_2 de $8,7 \times 10^{-5}$ a $9,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

(Figura 64 (b)). A partir das intensidades de corrente de pico anódica observadas nos voltamogramas, obteve-se a relação entre I_{pa} em função da concentração de H_2O_2 , como ilustra a Figura 64 (c). Dos resultados da curva analítica (Figura 64 (c)) encontrou-se $1,17 \mu\text{mol L}^{-1}$ de sensibilidade, $27,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LD e $91,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LQ, resultados estes que se encontram dentro dos valores relatados na literatura ($10^{-6} - 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) (Tabela 17), nos evidenciando a eficácia da imobilização enzimática no filme LbL estudado.

Verifica-se que o LQ do filme LbL $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6\text{GOx}$ para determinação de glicose, é mais aplicável do que o LD, da mesma forma que o observado para os filmes $(\text{PVS/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ e $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ na determinação de DA, pois possibilita a determinação de glicose a partir do valor de LQ calculado como mostra a Figura 64 (d).

A determinação da cinética enzimática e a avaliação da atividade biológica da enzima da GOx imobilizada no filme $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_6\text{GOx}$ foi obtida a partir da constante Michalis-Menten (k_m^{app}). Para isso, realizaram-se medidas de cronoamperometria adicionando-se alíquotas de $50 \mu\text{L}$ de uma solução estoque de glicose $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em uma cela eletroquímica contendo 10 mL de tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, de modo a verificar a saturação dos sítios ativos da enzima GOx a partir do momento que não houve mais variação do sinal de corrente de oxidação do H_2O_2 formado durante a reação enzimática (Figura 65 (a)). Dos valores de corrente de oxidação, obteve-se o gráfico de dupla recíproca (Figura 65 (b)), a partir da equação de Lineweaver-Burk¹⁸².

$$\frac{1}{I_{ss}} = \frac{1}{I_{\max}} + \frac{k_m^{app}}{I_{\max} C_{\text{glicose}}} \quad [7]$$

Onde I_{ss} é a corrente verificada após adição da glicose, $I_{\max}$ é a corrente máxima obtida na concentração de glicose suficiente para saturar os sítios ativos da enzima e C_{glicose} é concentração de glicose. Do gráfico de dupla recíproca foi determinada a constante k_m^{app} com um valor de 2.64 mmol L^{-1} , a qual é semelhante a outros valores de constante encontrados em estudos na literatura (Tabela 17). Este valor representa a concentração de glicose necessária para que a metade do valor de corrente de oxidação máxima seja alcançada, ou seja, indica a cinética reacional do sistema enzima-substrato.

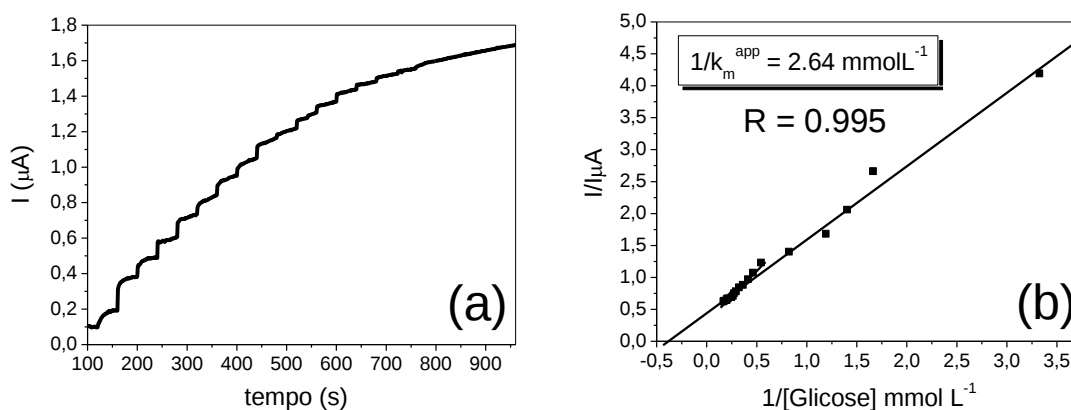


Figura 65- (a) Cronoamperograma do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆GOx em diferentes concentrações de glicose; (b) gráfico de dupla recíproca, ou Lineweaver-Burk.

Com intuito de averiguar o tempo de vida do biossensor (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆GOx, foram realizadas medidas eletroquímicas por voltametria cíclica com o mesmo biossensor em diferentes dias como mostrado na Figura 66.

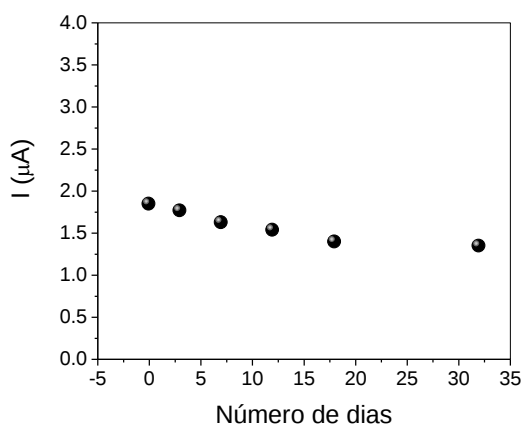


Figura 66- Tempo de vida do biossensor (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆GOx: I_{pa} x número de dias.

Foi verificado que a enzima GOx imobilizada no biossensor manteve sua atividade mesmo após 32 dias. Embora a corrente de oxidação do H₂O₂ gerado na reação enzimática tenha diminuído, esta diminuição é insignificante possibilitando a utilização deste biossensor por um intervalo de tempo relativamente grande. No entanto, vale-se ressaltar que para uma melhor manutenção da atividade enzimática, o biossensor deve ser armazenado a 4⁰ C.

Tabela 10- Valores de limite de detecção, sensibilidade e da k_m^{app} obtidas com o biossensor (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ GOx e outros relatados na literatura.

Biossensores	LD μmolL^{-1}	Sensibilidade $\mu\text{A}/\text{mmolL}^{-1} \text{cm}^{-2}$	k_m^{app} mmolL^{-1}	Ref.
(PPV/Pt-SiPy ⁺ Cl ⁻) ₆ GOx	27,4	1,17	2,64	Nesta tese
GOx/SWNT/PVI/Os/SPCE	100	14,6	N	179
GOD/Pt/OMC/Au	50	0,38	2,18	152
PVP-Os/GOX-SWNT	N	56	21,5	182
PEI/{GOD/PEI} ₃ /CNT/GC	N	106.57	0.95	182
SWCNT ISFETs	N	28.4	14.2	246
GC/TU/GOx	6	5.73	3.42	247

Obs. N = não relatado.

Quando se compara o desempenho do biossensor (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆GOx, com o desempenho de outros biossensores encontrados na literatura (Tabela 17), ênfase pode ser dada ao baixo valor de LD (27.4 $\mu\text{mol L}^{-1}$) encontrado com filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆GOx. A maioria dos biossensores na literatura que exibem baixos valores de LD, contêm em sua constituição algum tipo de mediador redox^{179,180}. Neste trabalho, o baixo valor observado para o LD do filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆GOx é atribuído a presença das NPs-Pt que auxiliam o processo de transferência de elétrons na superfície do biossensor.

Capítulo 6. Conclusões

O estudo investigativo relacionado às interações das NPs-Pt estabilizadas no SiPy^+Cl^- , assim como, as interações do nanohíbrido $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ com diferentes estruturas moleculares, tais como, o PVS, PPV-SO₃ e a enzima GOx, representam a maior contribuição científica desta tese para a Ciência. A versatilidade do material investigado na construção de sensores e biossensores eletroquímicos para substâncias diversas como, DA, AA, AU, glicose e H₂O₂, deve ser destacada, visto o método simples de obtenção dos sensores a partir da técnica LbL.

A investigação nesta tese reúne uma gama de técnicas exploradas que corroboraram nas constatações evidenciadas com os diferentes materiais mencionados.

As imagens de MET e o histograma de distribuição obtido pelas medidas de DLS nos indicaram uma boa distribuição destas estabilizadas no polímero SiPy^+Cl^- . O valor obtido de potencial zeta com o $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ nos confirma a capacidade do híbrido em atuar como polycation na construção de filmes LbL, e por este motivo, se mostrou eficiente na construção de filmes finos alternado com os poliânions sulfonados, tais como o PVS e o PPV-SO₃. Medidas de UV-Vis, FTIR e Raman confirmaram a presença deste polycation interagindo com os grupos sulfônicos tanto com o PVS quanto com o PPV-SO₃ nas diferentes arquiteturas de filmes LbL. Espectros de UV-Vis confirmaram o crescimento dos filmes a partir da deposição das bicamadas de polieletrólitos e indicaram uma maior absorbância nos filmes contendo a arquitetura sequencial $(\text{PVS/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ e $(\text{PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$. Resultados das imagens de AFM corroboraram com medidas de UV-Vis e indicaram que esta arquitetura promoveu melhor organização das estruturas supramoleculares.

Resultados da comparação dos filmes LbL construídos a partir dos precursores PVS e $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$, mostraram que o filme LbL $(\text{PVS/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ foi o que apresentou as melhores respostas eletroquímicas no processo de oxidação da DA em relação ao filme na arquitetura $(\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PVS})_3$ em função da presença das NPs-Pt na parte externa do eletrodo. Além disso, a utilização deste filme como sensor eletroquímico possibilitou a detecção simultânea da DA em meio ao interferente AA fornecendo uma diferença entre os potenciais de oxidação igual a 550 mV em pH 7, valor este excelente, quando comparado a outros encontrados na literatura tais como 140 mV¹⁴⁸, 200 mV¹⁴⁹, 180 mV²²¹ e 230 mV²²².

A substituição do PVS por PPV-SO₃, na arquitetura dos filmes proporcionou um incremento nas respostas eletroquímicas do sensor frente à DA. Dentre estas respostas, o

filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ oxidou a DA com um sinal de corrente de oxidação mais intenso e além disso, detectou simultaneamente a DA em meio aos interferentes AA e AU com uma diferença de potencial igual a 640 mV em pH 7, ou seja, 90 mV maior do que a obtida com o filme com PVS.

O filme (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ também se mostrou eficiente na oxidação de DA encapsulada nos lipossomos formados a partir de DPPC, promovendo uma diferença de 350 mV entre o potencial de oxidação da DA encapsulada no lipossomo e os interferentes AA e AU não encapsulados. A menor diferença nos potenciais de oxidação encontrada nos estudos com a DA encapsulada em relação aos estudos com DA livre, pode ser explicada pela competitividade gerada pela presença dos lipossomos próximos à superfície do eletrodo que podem interagir com o Pt-SiPy⁺Cl⁻ da superfície deixando os ânions ABT e URT mais livres para se aproximarem das NP-Pt e desta forma antecipar o potencial de oxidação destes interferentes. Na ausência dos lipossomos, os ânions ABT e URT interagem com a superfície positiva e a aproximação destas espécies até as NP-Pt é dificultada decorrente das interações, fator que exige um potencial mais positivo para a oxidação destes interferentes. O processo de detecção de DA em lipossomos se mostrou eficiente para mimetizar a detecção de DA em tecidos, atuando como um protótipo de modelo biomimético.

Nos estudos de determinação eletroquímica de DA presente em estriados cerebrais de ratos, verificou-se que o filme *drop-coated* (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ oxidou DA num potencial mais negativo do que o verificado com filme LbL sobre FTO, bem como oxidou a DA presente no estriado contendo 109,5 mg de tecido, cuja concentração de DA determinada pela equação da curva de calibração foi 42,54 μmol L⁻¹, valor este próximo ao obtido por medidas de HPLC evidenciadas em trabalhos relatados na literatura^{143,144}.

Embora o aumento de concentração de DA tenha proporcionado um deslocamento no potencial de oxidação para potenciais mais positivos, na faixa de concentração baixa, presente em amostras de estriado, o filme *drop-coated* (C/PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₃ exibiu as melhores respostas eletroquímicas em relação aos eletrodos impressos de C e Pt. Isto nos evidencia a importância do processo de modificação do eletrodo.

Para o processo de detecção de H₂O₂ foi verificado que as melhores respostas foram obtidas com o filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ onde observou-se a oxidação do H₂O₂ em 1,06 V. Neste potencial, verificou-se a partir de medidas de cronoamperometria melhor relação entre a concentração do analito e a corrente de pico anódico, do que nos potenciais 0,90 e 0,95 V. Este resultado permitiu avaliar a potencialidade do filme LbL como biossensor na detecção

indireta de glicose. Para isto, medidas de CD comprovaram a preservação da estrutura conformacional da GOx na solução preparada e na GOx imobilizada na superfície do filme LbL (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆. Além disso, comprovou-se a eficiência do nanohíbrido Pt-SiPy⁺Cl⁻ para estabilizar a GOx na superfície do filme pelas medidas de CD, onde evidenciou-se a conservação da estrutura da GOx. Deste estudo também se conclui que a preservação estrutural da GOx na superfície do filme se mostrou determinante para obtenção da cinética enzimática determinada pela constante $k_m^{app} = 2,64 \text{ mmol L}^{-1}$. Parâmetros como, a boa sensibilidade e os baixos limites de detecção e quantificação obtidos com o biossensor (PPV/Pt-SiPy⁺Cl⁻)₆ GOX nos mostraram a capacidade e eficiência para detecção de H₂O₂ em reações enzimáticas.

Com base no acima exposto, é importante considerar a importância do PPV-SO₃ na construção dos sensores eletroquímicos, uma vez que este polímero já desempenha importante papel na construção de sensores fotoluminescentes. Os resultados observados até o momento com este polímero nos evidenciam a possibilidade de obtenção de sensores distintos e com altas potencialidades sensoriais.

Da mesma forma, os resultados obtidos nesta tese, nos mostram a alta capacidade sensorial dos filmes obtidos com o nanohíbrido Pt-SiPy⁺Cl⁻, inédito no campo da pesquisa. A versatilidade deste nanohíbrido foi comprovada pela sua utilização como polícatión para a formação de filmes LbL, como modificador de sensores de DA em amostras reais e também como modificador de biossensor de glicose. Aliado à técnica LbL, o uso do nanohíbrido como modificadores de superfícies eletródicas comprovou a possibilidade da aplicação em sensores eletroquímicos de DA e glicose, em substituição aos métodos quantitativos convencionais que geralmente apresentam um custo elevado e são mais demorados.

Capítulo 7. Perspectivas Futuras

Tendo em vista a originalidade da utilização do nanohíbrido $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ na constituição de superfícies eletródicas, muitos nanocompósitos podem ser investigados combinados com este novo material. Neste sentido algumas sugestões para trabalhos futuros são descritos nos tópicos a seguir.

- Testar outros redutores na rota de síntese das NPs-Pt e avaliar os diâmetros de NPs obtidas por DLS e TEM.

- Sintetizar outras NPs-M tais como Au e Ag nas cavidades do polímero SiPy^+Cl^- e utilizar os híbridos obtidos no processo de detecção de DA e H_2O_2 , para confrontar a influências da utilização de diferentes NPs-M.

- Realizar medidas de difração de Raio-X de diferentes NPs-M incorporadas ao SiPy^+Cl^- .

- Realizar um estudo de condutividade de híbridos com diferentes NPs-M incorporadas ao SiPy^+Cl^- por espectroscopia de impedância eletroquímica.

- Avaliar a capacidade do nanohíbrido $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ para imobilização de diferentes enzimas.

- Estudar a toxicidade do nanohíbrido $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ frente à sistemas biológicos.

- Investigar diferentes arquiteturas de filmes LbL alternando o nanohíbrido $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ com outros poliânions, além do PVS e PPV-SO_3 .

- Confrontar os resultados obtidos nos estudos eletroanalíticos da oxidação de DA em estriados com outras técnicas como o HPLC.

- Investigar o processo de detecção de DA encapsulada em outros tipos de lipossomos além do DPPC.

- Realizar um estudo eletroquímico com os filmes *drop-coated* de $(\text{C-PPV/Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-)_3$ na oxidação de DA em meio a outros interferentes como a L-DOPA e epinefrina, visto que com os filmes LbL sobre FTO o potencial verificado para os analitos foi relativamente alto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Gushikem, Y.; Benvenutti, E. V.; Kholin, Y. V. **Synthesis and applications of**
- ² Lin, C. X.; Qiao, S. Z.; Yu, C. Z.; Ismadji, S.; Lu, G. Q. **Periodic mesoporous silica and organosilica with controlled morphologies as carriers for drug release.** *Micropor. Mesopor. Mater.* v. 117, p. 213-219, 2009.
- ³ Dahmouche, K.; Santilli, C. V.; Pulcinelli, S. H.; · Ferreira, R. A. S.; Carlos, L. D.; Bermudez, V. Z.; Craievich, A. F. **Nanostructure and luminescent properties of sol-gel derived europium-doped amine functionalised hybrids.** *J. Sol-Gel Sci. Technol.* v. 37, p. 99-104, 2006.
- ⁴ Lucho, A. M. S.; Panteleimonov, A. V.; Kholin Y. V.; Gushikem, Y. **Simulation of adsorption equilibria on hybrid materials: Binding of metal chlorides with 3-n-propylpyridinium silsesquioxane chloride ion exchanger.** *J. Colloid Interface Sci.* v. 310, p. 47-56, 2007.
- ⁵ Polshettiwar, V.; Varma, R. S. **Pd-N-heterocyclic carbene (NHC) organic silica: synthesis and application in carbon-carbon coupling reactions.** *Tetrahedron.* v. 64, p. 4637-4643, 2008.
- ⁶ Lucho, A. M. S.; Oliveira, E. C.; Pastore, H. O.; Gushikem, Y. **3-n-Propylpyridinium chloride silsesquioxane polymer film-coated aluminumphosphate and adsorption of cobalt(II)tetrakisulphophthalocyanine: an electrocatalytic oxidation study of oxalic acid.** *J. of Electroana. Chem.* v. 573, p. 55-60, 2004.
- ⁷ Gushikem, Y.; Alfaya, R. V. S.; Alfaya, A. A. S. **Preparation process of 3-n-propylpyridiniumsilsesquioxane bonded to a silsesquioxane structure.** Patent INPI No. PI9803053-1, 1998.
- ⁸ Fujiwara, S.T.; Gushikem, Y.; Alfaya, R. V. S. **Adsorption of FeCl₃, CuCl₂ and ZnCl₂ on silsesquioxane 3-n-propylpyridiniumchloride polymer film adsorbed on Al₂O₃ coated silica gel.** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* v. 178, p. 135-141, 2001.
- ⁹ Jesus, C. G.; dos Santos, V.; Canestraro, C. D.; Zucolotto, V.; Fujiwara, S. T.; Gushikem, Y.; Wohnrath, K.; Pessoa, C. A. **Silsesquioxane as a new building block material for modified electrodes fabrication and application as neurotransmitters sensors.** *J Nanosci Nanotechnol .* v. 11, p. 3499-3508, 2011.
- ¹⁰ Alfaya, R. V. S.; Gushikem, Y. **Aluminum Oxide Coated Cellulose Fibers Modified withn-Propylpyridinium Chloride Silsesquioxane Polymer: Preparation, Characterization, and Adsorption of Some Metal Halides from Ethanol Solution.** *J. Colloid Interface Sci.*v. 213, p. 438-444, 1999.

-
- ¹¹ Lucho, A. M. S.; Pissetti, F. L.; Gushikem, Y. **Al₂O₃-coated 3-N-propylpyridinium chloride silsesquioxane polymer film: preparation and electrochemical property study of adsorbed cobalt tetrasulfophthalocyanine.** *J. of Colloid and Interf. Sci.* v. 275, p. 251-256, 2004.
- ¹² Santos, V.; Jesus, C. G.; Santos, M.; Canestraro, C. D.; Zucolotto, V.; Fujiwara, S. T.; Garcia, J. R.; Pessoa, C. A.; Wohnrath, K. **Platinum nanoparticles incorporated in silsesquioxane for use in LbL films for the simultaneous detection of dopamine and ascorbic acid,** *J. of Nanoparticles Research.* v. 14, p. 1081-1091, 2012.
- ¹³ Santos, V.; Santos, M.; Sandrino, B.; Jesus, C. G.; Garcia, J. R.; Fujiwara, S. T.; Pessôa, C. A.; Wohnrath, K. **LbL Film with PtNPs as a Sensor of the Dopamine Encapsulated in Liposomes.** *ECS Trans.*, v. 50 (48), p. 37-43, 2013.
- ¹⁴ Jesus, C. G.; Forte, C. M. S.; Wohnrath, K.; Pessoa, C. A.; Soares, J. E. S.; Fujiwara, S. T.; Neto, P. L.; Correia, A. N. **Electroanalytical performance of (SiPy⁺Cl/CuTsPc)₅ LbL film for detecting promethazine hydrochloride.** *Electroanalysis.* v. 23, p. 1814-1820, 2011.
- ¹⁵ De Menezes, E. W.; Nunes, M. R.; Arenas, L. T.; Dias, S. L. P.; Garcia, I. T. S.; Gushikem, Y.; Costa, T. M. H.; Benvenutti, E. V. **Gold nanoparticle/charged silsesquioxane films immobilized onto Al/SiO₂ surface applied on the electrooxidation of nitrite.** *J Solid State Electrochem.* v.16, p. 3703-3713, 2012.
- ¹⁶ Crespilho, F. N.; Zucolotto, V.; Oliveira, O. N. Jr.; Nart, C. F. **Electrochemistry of Layer-by-Layer Films: a review.** *Int. J. Electrochem. Sci.*, v. 1, p. 194-214, 2006.
- ¹⁷ Crespilho, F. N.; Huguenin, F.; Zucolotto, V.; Olivi, P.; Nart, C. F. C.; Oliveira, O. N. Jr. **Dendrimers as nanoreactors to produce platinum nanoparticles embedded in layer-by-layer films for methanol-tolerant cathodes.** *Electrochem Commun.* v. 8, p. 348-352, 2006.
- ¹⁸ Scognamiglio, V. **Nanotechnology in glucose monitoring: Advances and challenges in the last 10 years.** *Biosen. and Bioelec.* v. 47, p. 12-25, 2013.
- ¹⁹ Lent, R. **Cem bilhões de neurônios: Conceitos fundamentais de neurociência.** Ed. Atheneu, São Paulo, 2001.
- ²⁰ Iranzo, A.; Lomeña, F.; Stockner, H.; Valdeoriola, F.; Vilaseca, I.; Salamero, M.; Molinuevo, J. L.; Serradell, M.; Duch, J.; Pavía, J.; Gallego, J.; Seppi, K.; Högl, B.; Tolosa, E.; Poewe, W.; Santamaria, J. **Decreased striatal dopamine transporter uptake and substantia nigra hyperechogenicity as risk markers of synucleinopathy in patients with idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: a prospective study.** *Lancet Neurol.* v. 9 (11), p. 1070-7, 2010.
- ²¹ Somasundrum, M.; Kirtikara, K.; Tanticharoen, M. **Amperometric determination of hydrogen peroxide by catalytic reduction at a copper electrode.** *Anal. Chim. Acta.* v. 319, p. 59-70, 1996.

-
- ²² Mattos, I. L.; Shiraishi, K. A.; Braz, A. D.; Fernandes, J. R. **Peróxido de hidrogênio: importância e determinação.** *Quim. Nova.* v. 26, p. 373-380, 2003.
- ²³ Chang, L. C.; Wu, H. N.; Lin, C. Y.; Lai, Y. H.; Hu, C. W.; Ho, K. C.; **One-pot synthesis of poly (3,4-ethylenedioxythiophene)-Pt nanoparticle composite and its application to electrochemical H₂O₂ sensor.** *Nanoscale Research Letters.* v. 7, p. 319, 2012.
- ²⁴ Melo Jr, M. A.; Santos, L. S. S.; Gonçalves, M. C.; Nogueira, A. F. **Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino.** *Quim. Nova,* v. 35, p. 1872-1878, 2012.
- ²⁵ Mohanraj, V. J.; Chen, J. **Nanoparticles – A Review.** *Tropical J. of Pharmaceutical Research,* v, 5 (1), p. 561-573, 2006.
- ²⁶ Vishwakarma, V.; Samal, S. S.; Manoharan, N. **Safety and Risk Associated with Nanoparticles - A Review.** *J.of Minerals & Materials Characterization & Engineering.* v. 9, p. 455-459, 2010.
- ²⁷ Duran, N.; Capparelli, M.; L.H.; Morais, P.C. **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação.** 1^a ed. São Paulo: Artliber, p.131, 2006.
- ²⁸ Lavik, E.; Recum, H. V.; **The Role of Nanomaterials in Translational Medicine.** *ACS Nano.*v. 5. P. 3419–3424, 2011.
- ²⁹ Solanki, A .; Kim, J. D.; Lee, K. B. **Nanotechnology for regenerative medicine: nanomaterials for stem cell imaging.** *Nanomedicine (Lond).* v. 3(4), p. 567-78, 2008.
- ³⁰ Yu, X. ; Rotello, V. M. **Nanoparticle devices: Going with the electron flow.** *Nature Nanotechnology.*v. 6, p. 693–694, 2011.
- ³¹ Seo, Y. K.; Kumar, S.; Kim, G. H. **Analysis of assembling ZnO nanoparticles into nanogap electrodes for nanoscale electronic device applications.** *J. Nanosci. Nanotechnol.* v. 6, p. 4852-62, 2011.
- ³² Andreiadis, E. S.; Jacques, P. A.; Tran, P. D.; Leyris, A.; Chavarot-Kerlidou, M.; Jousselme, B.; Matheron, M.; Pécaut, J.; Palacin, S.; Fontecave, M.; Artero, V. **Molecular engineering of a cobalt-based electrocatalytic nanomaterial for H₂ evolution under fully aqueous conditions.** *Nature Chemistry,* v. 5, p. 48–53, 2013.
- ³³ Hussain, S. T.; Rahman, M. H. U. **Nano Catalyst for CO₂ Conversion to Hydrocarbons.** *J.of Nano Systems & Technology.* v.1, p. 01-09, 2009.
- ³⁴ King, N. P.; Sheffler, W.; Sawaya, M. R.; Vollmar, B. S.; Sumida, J. P.; André, I.; Gonen, T.; Yeates, T. O.; Baker, D. **Computational design of self-assembling protein nanomaterials with atomic level accuracy.** *Science.* v. 336(6085), p. 1171-4, 2012.

-
- ³⁵ Huang, H.; Shen, L.; Ford, J.; Wang, Y.; Xu, Y. **Computational Issues in Biomedical Nanometrics and Nano-materials.** *J.of Nano Research.* v. 1, p. 50-58, 2008.
- ³⁶ Zhao, X.; Sánchez, B. M.; Dobson, P. J.; Grant, P. S. **The role of nanomaterials in redox-based supercapacitors for next generation energy storage devices.** *Nanoscale*, v. 3, p. 839-855, 2011.
- ³⁷ Suni, I. I. **Impedance methods for electrochemical sensors using Nanomaterials.***Trends in Analytical Chemistry*, v. 27, p. 604-611, 2008.
- ³⁸ Su, S.; Wu, W.; Gao, J.; Lu, J.; Fan, C. **Nanomaterials-based sensors for applications in environmental monitoring.** *J. Mater. Chem.*, v. 22, p. 18101-18110, 2012.
- ³⁹ Siqueira Jr.; Gabriel, R. C.; Zucolotto, V.; Silva, A. C.; Dantas, N. O.; Gasparotto, L. H. **Electrodeposition of catalytic and magnetic gold nanoparticles on dendrimer-carbon nanotube layer-by-layer films.** *Phys Chem Chem Phys.*v. 14(41), p. 14340-3, 2012.
- ⁴⁰ Zwijnenburg, M. A. **Photoluminescence in semiconductor nanoparticles: an atomistic view of excited state relaxation in nanosized ZnS.** *Nanoscale.* v. 4(12), p. 3711-7, 2012.
- ⁴¹ Wang, H.; Wu, Z.; Plaseied, A.; Jenkins, P.; Simpson, L.; Engtrakul, C.; Ren, Z.; **Carbon nanotube modified air-cathodes for electricity production in microbial fuel cells.** *J. of Power Sources.* v. 196, p. 7465–7469, 2011.
- ⁴² Takahashi, S.; Sato, T.; Haraguchi, N.; Wang, B.; Anzai, J. I.; **Voltammetric Behavior of Ferricyanide Ion-confined LbL Filmcoated Electrodes: Use of Heparin and k-Carrageenan as Film Component.** *Int. J. Electrochem. Sci.*, v. 7, p. 6762 – 6770, 2012.
- ⁴³ Samuel, S.T.J.; indrajit, D.; Anastasios P.A.P. **Enhanced Electrocatalytic Oxygen Reduction through Electrostatic Assembly of Pt Nanoparticles onto Porous Carbon Supports from SnCl₂-Stabilized Suspensions.** *Langmuir*, v. 27, p. 5781–5791, 2011.
- ⁴⁴ Lee, Y. E.; Kopelman, R. **Optical nanoparticle sensors for quantitative intracellular imaging.** *Nanomed Nanobiotechnol.* v. 1, p. 98-110, 2009.
- ⁴⁵ Campbell, F.W.; Compton, R. G.**The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review.** *Anal. and Bioanalytical Chem.*.v. 396(1), p. 241-259, 2010.
- ⁴⁶ Ticianelli, E. A.; Gonzalez, E. R. **Eletroquímica.** Edusp, São Paulo, 1998.
- ⁴⁷ Luo, X.L.; Morrin, A.; Killard, A. J.; Smyth, M. R. **Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors.** *Electroanalysis.* v. 18(4), p. 319-326, 2006.
- ⁴⁸ Welch, C.; Compton, R. **The use of nanoparticles in electroanalysis: a review.** *Anal. and Bioanal. Chem.*.v. 384(3) p. 601-619, 2006.

-
- ⁴⁹ Masa, J.; Bordoloi, A.; Muhler, M.; Schuhmann, W.; Xia, W. **An N-doped composite of carbon nanotubes (CNTs) and mesoporous TiO₂ is used as support for Pt nanoparticles applied in the oxygen reduction reaction.** *Chem Sus Chem*. v. 5, p. 523–525, 2012.
- ⁵⁰ Zhou, Z. Y.; Kang, X.; Song, Y.; Chen, S. **Enhancement of the electrocatalytic activity of Pt nanoparticles in oxygen reduction by chlorophenyl functionalization.** *Chem. Commun.* v. 48, p. 3314-3316, 2012.
- ⁵¹ Alivisatos, A.P., **Nanocrystals: building blocks for modern materials design,** *Endeavour*. v. 21, p. 56-60, 1997.
- ⁵² Alivisatos, A. P. **Perspectives on the physical chemistry of semiconductor Nanocrystals.** *J. of Phys. Chem.* v. 100, p. 13226-13239, 1996.
- ⁵³ He, Y. Q.; Liu, S. P.; Kong, L.; Liu, Z. F. **A study on the sizes and concentrations of gold nanoparticles by spectra of absorption, resonance Rayleigh scattering and resonance non-linear scattering.** *Spectrochim. Acta Part A*. v. 6, p. 2861–2866, 2005.
- ⁵⁴ Melo Jr., M. A.; Santos, L. S. S.; Gonçalves, M. C.; Nogueira, A. F. **Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino.** *Quim. Nova*, v. 35, n.º. 9, p. 1872-1878, 2012.
- ⁵⁵ Alivisatos, A. P. **Perspectives on the physical chemistry of semiconductor Nanocrystals.** *J. of Phys. Chem.* v. 100, p. 13226-13239, 1996.
- ⁵⁶ Roduner, E. **Size matters: why nanomaterials are different.** *Chem. Society Reviews*. v. 35, p. 583-592, 2006.
- ⁵⁷ Link, S., El-Sayed, M.A., **Size and Temperature Dependent of Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles.** *J. Phys.*, v. 103, p. 4212-4217, 1999.
- ⁵⁸ Oliveira, M. M.; Ugarte, D.; Zanchet, D.; Zarbin, A. J. G. **Influence of synthetic parameters on the size, structure, and stability of dodecanethiol-stabilized silver nanoparticles.** *J. of Coll. and Interf. Sci.* v. 292(2), p. 429-435, 2005.
- ⁵⁹ OZIN, G. A. **Nanochemistry-Synthesis in Diminishing Dimensions.** *Adv. Mater*, v. 4, n.10, p.612-649, 1992.
- ⁶⁰ Murray, C.B., C.R. Kagan, and M.G. Bawendi. **Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies.** *Annual Review of Mater. Sci.* v. 30, p. 545-610, 2000.
- ⁶¹ Couto, G.G.; Klein, J. J.; Schreiner, W. H.; Mosca, D. H.; Oliveira, A. J. A.; Zarbin, A. J. G. **Nickel nanoparticles obtained by a modified polyol process: Synthesis, characterization, and magnetic properties.** *J. of Colloid and Interf. Sc.* v. 311(2), p. 461-468, 2007.

-
- ⁶² Reddy, A.S., C.-Y. Chen, S.C. Baker, C.-C. Chen, J.-S. Jean, C.-W. Fan, H.-R. Chen, and J.-C. Wang, **Synthesis of silver nanoparticles using surfactin: A biosurfactant as stabilizing agent.** *Materials Letters*. v. 63(15), p. 1227-1230, 2009.
- ⁶³ Adhikari, R.; Brostow, W.; Datashvili, T.; Henning, S.; Menard, B.; Menard, K. P.; Michler, G. H. **Effect of surfactant treated boehmite nanoparticles on properties of block copolymers.** *Materials Research Innovations*. v. 16, p. 19-24, 2012.
- ⁶⁴ Kim, B. J.; Bang, J.; Hawker, C. J.; Chiu, J. J.; Pine, D. J.; Jang, S. G.; Yang, S.; Kramer, E. J. **Creating Surfactant Nanoparticles for Block Copolymer Composites through Surface Chemistry.** *Langmuir*. v. 23, p. 12693-12703, 2007.
- ⁶⁵ Rabkin, A.; Belman, N.; Israelachvili, J.; Golan, Y. **Directed coassembly of oriented PbS nanoparticles and monocrystalline sheets of alkylamine surfactant.** *Langmuir*. v. 28(43), p. 15119-23, 2012.
- ⁶⁶ Henglein, A., **Small particle research: physicochemical properties of extremely small colloidal metal and semiconductor particles.** *Chem.reviews*. v. 89: p. 1861, 1989.
- ⁶⁷ Zapp, E.; Souza, F. D.; Souza, B. S.; Nome, F.; Neves, A.; Vieira, I. C. A bio-inspired sensor based on surfactant film and Pd nanoparticles. *Analyst*. v. 138 (2), p. 509-17, 2012.
- ⁶⁸ Boisselier, E. Astruc, D. **Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity.** *Chem. Soc. Reviews*.v. 38(6), p. 1759-1782, 2009.
- ⁶⁹ Zanchet, D.; Tolentino, H.; Martins, A. M. C.; Alves, O. L.; Ugarte, D. **Inter-atomic distance contraction in thiol-passivated gold nanoparticles.** *Chem. Phys.Letter*.v. 323, n. 1-2, 167-172, 2000.
- ⁷⁰ Brust, M. M. W.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. **Synthesis ofThiol-derivatised Gold Nanoparticles in a Two-phase Liquid-Liquid System.** *The J. Chem. Soc.* v. 147, p. 801-802, 1994.
- ⁷¹ Oliveira, M. M.; Ugarte, D.; Zanchet, D.; Zarbin, A. J. G. **Influence of synthetic parameters on the size, structure and stability of dodecanethiol-stabilized silver nanoparticles.** *J.of Col. and Interf. Sci.*. v. 292, p. 429-435. 2005.
- ⁷² Castro, E. G.; Salvatierra, R. V.; Schreiner, W. H.; Oliveira, M. M.; Zarbin, A. J. G. **Dodecanethiol-stabilized platinum nanoparticles obtained by a two- phase method: synthesis, characterization, mechanism of formation, and electrocatalytic properties.** *Chem. of Mater.*. v. 22, p. 360-370, 2010.
- ⁷³ Yang, J.; Lee, J. Y.; Too, H. P. **Size effect in thiol amine binding to small nanoparticles.** *Anal. Chim. Acta*. v. 571, p. 206-210, 2006.
- ⁷⁴ Hou, Y.; Kondoh, H.; Ohta, T.; Gao, S. **Size-controlled synthesis of nickel Nanoparticles.** *App. Surf. Sci.*.v. 241, p. 218-222, 2005.

-
- ⁷⁵ Tartaj, P.; Morales, M. P.; Verdaguer, S. V.; Carreño, T. G.; Serna, C. J.; **The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine.** *J. of Phys. D: App. Phys.* v.36, p. 182–197, 2003.
- ⁷⁶ Chen, D. H.; Wu, S. H. **Synthesis of nickel nanoparticles in water-in-oil microemulsions.** *Chem. of Mater.* v. 12, p. 1354-1360, 2000.
- ⁷⁷ Fievet, F.; Lagier, J. P.; Figlarz, M. **Preparing monodisperse metal powders in micrometer and submicrometer sizes by the polyol process.** *Mater. Research Bulletin.* v. 32-33, p. 29-34, 1989.
- ⁷⁸ Viau, G., Fievet-Vincent, F., Fievet, F., **Nucleation and growth of bimetallic CoNi and FeNi monodisperse particles in polyols.** *Solid State Ionics.* v. 84, p. 259-270, 1996.
- ⁷⁹ Feldman, C. **Polyol-mediated synthesis of nanoscale functional materials.** *Solid State Sci.* v. 7, p. 868-873, 2005.
- ⁸⁰ Silvert, P. V.; Elhsissen, K. T. **Synthesis of monodisperse submicronic gold particles by the polyol process.** *Solid State Ionics.* v. 82, n. 2-3, p. 53-60, 1995.
- ⁸¹ Wu, S.H.; Chen, D.H. **Synthesis and characterization of nickel nanoparticles by hydrazine reduction in ethylene glycol.** *J. of Coll. and Interf. Sci.* v. 259, p. 282-286, 2003.
- ⁸² Silvert, P. V.; Elhsissen, K. T. **Synthesis of monodisperse submicronic gold particles by the polyol process.** *Solid State Ionics.* v. 82, n. 2-3, p. 53-60, 1995.
- ⁸³ Jungk H.; Feldmann, C. **Polyol mediated synthesis of sub-micrometer Bi₂O₃ particles.** *J. of Mater. Sci.*, v. 36, p. 297, 2001.
- ⁸⁴ Herricks, T.; Chen, J.; Xia, Y. **Polyol Synthesis of Platinum Nanoparticles: Control of Morphology with Sodium Nitrate.** *Nano Lett.*, v. 4 (12) p. 2367–2371, 2004.
- ⁸⁵ Froehling, P. E. **Dendrimers and dyes – a review.** *Dyes and Pigments.* v. 48, p. 187-195, 2001.
- ⁸⁶ Tomalia, D. A.; Naylor, A. M.; Goddard, W. A. **Starburst dendrimers: molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter.** *Angewandte Chemie.* v. 29, p. 138-175, 1990.
- ⁸⁷ 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.** *J. Phys. Chem. B.* v. 110, p. 17478-17483, 2006.

-
- ⁸⁸ Knecht, M. R.; Martinez, J. C. G.; Crooks, R. M. **Synthesis, characterization, and magnetic properties of dendrimer-encapsulated nickel nanoparticles containing 150 atoms.** *Chem. Mater.* v. 18, n. 21, p. 5039-5044, 2006.
- ⁸⁹ Oh, S. K.; Niu, Y.; Crooks, R. M. **Size-selective catalytic activity of Pd nanoparticles encapsulated within end-group functionalized dendrimers.** *Langmuir.* v. 21, p. 10209-10213, 2005.
- ⁹⁰ Knecht, M. R.; Crooks, R. M. **Magnetic properties of dendrimer-encapsulated iron nanoparticles containing an average of 55 and 147 atoms.** *New J. Chem.* v. 31, p. 1349-1353, 2007.
- ⁹¹ Liu, Z.; Wang, X.; Wu, H.; Li, C. **Silver nanocomposite layer-by-layer films based on assembled polyelectrolyte/dendrimer.** *J Colloid Interface Sci.* v. 287(2), p.604-11, 2005.
- ⁹² 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.
- ⁹³ Tsai, M. C and Tsai, Y. C. **Adsorption of glucose oxidase at platinum-multiwalled carbon nanotube-alumina-coated silica nanocomposite for amperometric glucose biosensor.** *Sensors and Actuators B*, v. 141, p. 592–598, 2009.
- ⁹⁴ Jiang, X.; Wu, Y.; Mao, X.; Cui, X.; Zhu, L. **Amperometric glucose biosensor based on integration of glucose oxidase with platinum nanoparticles/ordered mesoporous carbon nanocomposite.** *Sensors and Actuators B*, v. 153, 158–163, 2011.
- ⁹⁵ Wang, H. J.; Yu, H.; Peng, F, Lv, P. **Methanol electrocatalytic oxidation on highly dispersed Pt/sulfonated-carbon nanotubes catalysts.** *Electrochem. Commun.* v. 8, p. 499–504, 2006.
- ⁹⁶ Tsuji, X.; M.; Jiang, P.; Hikino, S.; Lim, S.; Yano, R.; Jang, S. M.; Yoon, S. H.; Ishigami, N.; Tang, X.; Sozana, K.; Kamarudin, N. **Toward to branched platinum nanoparticles by polyol reduction: A role of poly(vinylpyrrolidone) molecules.** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* v. 317, p. 23-31, 2008.
- ⁹⁷ Isaifana, R.; Dolea, H.; Obeidb, E.; Lizarragab, L.; Baranovac, E. A.; Vernoux, P. **Catalytic CO Oxidation over Pt Nanoparticles Prepared from the Polyol Reduction Method Supported on Yttria-Stabilized Zirconia.** *ECS Transactions.* v. 35, p. 43-57, 2011.
- ⁹⁸ Ramalingam, B.; Mukherjee, S.; Mathai, C. J.; Gangopadhyay, K.; Gangopadhyay, S. **Sub-2 nm size and density tunable platinum nanoparticles using room temperature tilted-target sputtering.** *Nanotechnology*, v. 24, p. 205602, 2013.
- ⁹⁹ M. Ferreira, P. A. Fiorito, O. N. Oliveira, Jr, S. I. C. De Torresi. **Enzyme-mediated amperometric biosensors prepared with the Layer-by-Layer (LbL) adsorption technique.** *Biosen. and Bioelectron*, v. 19. p. 1611-1615, 2004.

-
- ¹⁰⁰ AùTILEAN, S. **Fabrication of periodic metallic nanostructures by using nanosphere lithography.** *Romanian Reports in Physics*, v. 56, n. 3, p. 340-345, 2004.
- ¹⁰¹ Hong, Y. K.; Kim, H.; Lee, G.; Kim, W. **Controlled two-dimensional distribution of nanoparticles by spin-coating method.** *Applied Physics Letters*, v. 80, p. 844-846, 2002.
- ¹⁰² Yogeswaran, U.; Thiagarajan, S.; Chen, S. M. **Nanocomposite of functionalized multiwall carbon nanotubes with nafion, nano platinum, and nano gold biosensing film for simultaneous determination of ascorbic acid, epinephrine, and uric acid.** *Analytical Biochemistry*, v. 365, p. 122–131, 2007.
- ¹⁰³ An, M.; Hong, J. D.; K. S. Cho, Yoon, S. M.; Lee, E. S.; Kim, B. K.; Choi, J. Y. **Spin-Coating Electrostatic Self-Assembly: Fabrication Method for CdSe Nanoparticle Monolayer.** *Bull. Korean Chem. Soc.* v. 27, n. 8, p. 1119, 2006.
- ¹⁰⁴ Jayaraman, S.; Yu, L. T.; M. P. Srinivasan. **Polythiophene–gold nanoparticle hybrid systems: Langmuir–Blodgett assembly of nanostructured films.** *Nanoscale*, v. 5, p. 2974-2982, 2013.
- ¹⁰⁵ Lee, C.; Kim, Y.; Shin, H.; Kim' S.; Cho, J. **Nonvolatile memory properties of Pt nanoparticle-embedded TiO₂ nanocomposite multilayers via electrostatic layer-by-layer assembly.** *Nanotechnology* v. 21, p. 185704, 2010.
- ¹⁰⁶ Senthilkumar, K.; Okamoto, H.; Tokunaga, M.; Senthilkumar, O.; Fujita, Y. **Deposition of Nanoparticle-Aggregated ZnO Thin Films by Drop Coating Method.** *Jpn. J. Appl. Phys.* v. 48, 06FF05, 2009.
- ¹⁰⁷ Zhang, B.; Li, J. F.; Zhong, Q. L.; Ren, B.; Tian, Z. Q.; Zou, S. Z. **Electrochemical and surfaced-enhanced Raman spectroscopic investigation of CO and SCN- adsorbed on Au-core-Pt-shell nanoparticles supported on GC electrodes.** *Langmuir*, v. 21 (16), p. 7449–7455, 2005.
- ¹⁰⁸ Nassar, E. J.; Ciuffi, K. J.; Gonçalves, R. R.; Messaddeq, Y.; Ribeiro, S. J. L. **Filmes de titânio-silício preparados por “spin” e “dip-coating”.** *Quim. Nova*, v. 26, N^o. 5, p. 674-677, 2003.
- ¹⁰⁹ Betsarkis, K.; Trouillet, V.; Goschnick. **Platinum-doped nanogranular-tin dioxide layers prepared by spin-coating from colloidal dispersions as basis for gradient gas sensor micro arrays.** v. 1, p. 196-197, 2004.
- ¹¹⁰ Cho, J.; Char, K.; Hong, J. D.; Lee, K. B. **Fabrication of Highly Ordered Multilayer Films Using a Spin Self-Assembly Method.** *Advanced Materials*, v. 13, p. 1076-1078, 2001.
- ¹¹¹ Petty, M. C. **Langmuir-Blodgett Films: An Introduction.** Cambridge University Press, England, 1996

-
- ¹¹² Cavaliere-Jaricot, S.; Haccoun, J.; Etcheberry, A.; Herlem, M.; Perez, H. **Oxygen reduction of pre-synthesized organically capped platinum nanoparticles assembled in mixed Langmuir–Blodgett films: Evolutions with the platinum amount and leveling after fatty acid removal.** *Electrochim. Acta.* v. 20, p. 5992-5999, 2008.
- ¹¹³ Decher, G.; Hong, J.D.; Schimtt, J. **Build-up of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces.** *Thin Solid Films*, v. 20, n. 1-2, p. 831-835, 1992.
- ¹¹⁴ Crespilho, F. N.; Zucolotto, V.; Oliveira Jr, O. N; Nart, F. C. **Electrochemistry of Layer-by-Layer Films: a review.** *Int. J. Electrochem. Sci.*, v. 1, p. 194-214, 2006.
- ¹¹⁵ Silva, W. C.; Alencar, W. S.; Crespilho, F. N.; Martins, M. V. A.; Zucolotto, V.; Oliveira Jr, O. N. **Synergistic interaction between gold nanoparticles and nickel phthalocyanine in layer-by-layer (LbL) films: evidence of constitutional dynamic chemistry (CDC).** *Phys. Chem. Chem. Phys.* v. 11, p. 5086-5091, 2009.
- ¹¹⁶ Horvath, A. E.; Horvath, A. T.; Lindstrom, T.; Wagberg, L.; **Adsorption of Highly Charged Polyelectrolytes onto an Oppositely Charged Porous Substrate,** *Langmuir*, v. 24, p. 7857-7866, 2008.
- ¹¹⁷ Zucolotto, V.; Strack, P. J.; Santos, F. R.; Balogh, D. T.; Constantino C.J.L.; Mendonça, C. R.; Oliveira Jr., O. N.; **Molecular engineering strategies to control photo-induced birefringence and surface-relief gratings on layer-by-layer films from an azopolymer,** *Thin Solid Films*, v. 453-454 p. 110-113, 2004.
- ¹¹⁸ Alia, S. W.; Rajendranb, S.; Joshi, M. **Effect of Process Parameters on Layer-by-layer Self-assembly of Polyelectrolytes on Cotton Substrate.** *Polymers & Polymer Composites*, v. 18, n. 5, p. 237-250, 2010.
- ¹¹⁹ Iost, R. M; Crespilho, F. N. **Layer-by-layer self-assembly and electrochemistry: Applications in biosensing and bioelectronics.** *Biosen. & Bioelectron.* v. 31, p.1-10, 2012.
- ¹²⁰ M. Ferreira, P. A. Fiorito, O. N. Oliveira, Jr, S. I. C. De Torresi. **Enzyme-mediated amperometric biosensors prepared with the Layer-by-Layer (LbL) adsorption technique.** *Biosen. and Bioelectron.*, v. 19. p. 1611-1615, 2004.
- ¹²¹ Yang, J.; Lee, H.; Cho, M.; Nam, J.; Lee, Y. **Nonenzymatic cholesterol sensor based on spontaneous deposition of platinum nanoparticles on layer-by-layer assembled CNT thin film.** *Sensors and Actuators B: Chemical* v. 171–172, p. 374–379, 2012.
- ¹²² Teepoo, S.; Chumsaeng, P.; Nethan, P.; Prueprang, W.; Tumsae, P. **Highly Sensitive Pencil-Based Renewable Biosensor for Hydrogen Peroxide Detection With a Novel Bionanomultilayer.** *Int. J. Electrochem. Sci.*, v. 7, p. 4645 – 4656, 2012.

-
- ¹²³ Wang, L.; Xu, L.; Mu, Z.; Wang, C.; Sun, Z. **Synergistic enhancement of photovoltaic performance of TiO₂ photoanodes by incorporation of Dawson-type polyoxometalate and gold nanoparticles.** *J. Mater. Chem.*, v. 22, p. 23627–23632, 2012.
- ¹²⁴ Liu, S.; Yan, J.; He, G.; Zhong, D.; Chen, J.; Shi, L.; Zhou, X.; Jiang, H. **Layer-by-layer assembled multilayer films of reduced graphene oxide/gold nanoparticles for the electrochemical detection of dopamine.** *J. of Electroanal. Chem.* v. 672, p. 40–44, 2012.
- ¹²⁵ Li, W.; Yuan, R.; Chai, Y.; Zhong, H.; Wang, Y. **Study of the biosensor based on platinum nanoparticles supported on carbon nanotubes and sugar–lectin biospecific interactions for the determination of glucose.** *Electrochim. Acta.* v. 56, p. 4203–4208, 2011.
- ¹²⁶ Zhang, J. ; Zhu, Y.; Chen, C.; Yang, X.; Li, C. **Carbon nanotubes coated with platinum nanoparticles as anode of biofuel cell.** *Particuology* . v. 10, Pages 450–455, 2012.
- ¹²⁷ Benvenutti, E. V.; Moro, C. C.; Costa, T. M. H.; Gallas, M. R. **Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel.** *Quim. Nova.* v. 32, p. 1926-1933, 2009.
- ¹²⁸ Yasakau, K. A.; Zheludkevich, M. L.; Karavai, O. V.; Ferreira, M. G. S. **Influence of inhibitor addition on the corrosion protection performance of sol–gel coatings on AA2024.** *Prog. Org. Coatings.*v. 63, p. 352-361, 2008.
- ¹²⁹ Alfaya, R. V. S.; Gushikem, Y.; Alfaya, A. A. S. **N-propylpyridinium Chloride Silsesquioxane Polymer Film on Graphite: Electrochemical Study of a Hexacyanoferrate (II) Ion Immobilized Electrode for Oxidation of Ascorbic Acid.** *J. Braz. Chem. Soc.*,v. 11, p. 281-285, 2000.
- ¹³⁰ Arguello, J.; Magosso, H. A.; Ramos, R. R.; Canevari, T. C.; Landers, R.; Pimentel, V. L.; Gushikem, Y. **Structural and electrochemical characterization of a cobalt phthalocyanine bulk-modified SiO₂/SnO₂ carbon ceramic electrode.** *Electrochimica Acta.* v. 54, p. 1948-1953, 2009.
- ¹³¹ Muxel, A. A.; Jesús, D. A.; Alfaya, R. V. S.; Alfaya, A. A. S. **Silsesquioxane 3-*n*-Propylpyridinium Chloride: a New Polymer for the Potentiometric Analysis of Cr(VI) in Electroplating and Leather Industry Wastes.** *J. Braz. Chem. Soc.*v. 18, p. 572-576, 2007.
- ¹³² Ribeiro, E. S.; Gushikem, Y. **Cobalt (II) Tetrasulfophthalocyanine Complex Adsorbed on a Silica Gel Surface Chemically Modified with 3-N-Propylpyridinium Chloride: Oxalic Acid Oxidation Study.** *Electroanalysis.* v. 11, p. 1280-1284, 1999.
- ¹³³ Riemenschneider, W.; Tanifuji, M. **Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry.** VCH, Weinheim. A18, p. 247, 1998.
- ¹³⁴ Fujiwara, S. T.; Pessoa, C. A.; Gushikem, Y.; **Copper (II) Tetrasulphophthalocyanine Entrapped in a Propylpyridiniumsilsesquioxane Polymer Immobilized on a SiO₂/Al₂O₃**

Surface: Use for Electrochemical Oxidation of Ascorbic Acid. *Anal. Lett.* v. 35, p. 1117-1134, 2002.

¹³⁵ Karayannis, M. I. **Kinetic determination of ascorbic acid by the 2,6-dichlorophenolindophenol reaction with a stopped-flow technique.** *Anal. Chim. Acta* v. 76, p.121-130, 1975.

¹³⁶ Lindquist, J. **Voltametric determination ascorbic acid by use of a carbon paste electrode.** *Analyst.London.* v.100, p. 339-348, 1975.

¹³⁷ Alfaya, R. V. S.; Alfaya, A. A. S.; Gushikem, Y.; Rath, S.; Reyes, F. G. R. **Ion selective electrode for potentiometric determination of saccharin using a thin film of silsesquioxane3-n-propylpyridinium chloride polymer coated-graphite.** *Anal. Lett.* v.33, p. 2859-2871, 2000.

¹³⁸ Lawrence, J. F.; Charbonneau, C. F. **Determination of seven artificial sweeteners in diet food preparations by reverse-phase liquid chromatography with absorbance detection.** *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* v. 71, p. 934, 1988.

¹³⁹ Liu, A.; Honma, I.; Zhou, H. **Electrochemical biosensor based on protein-polysaccharide hybrid for selective detection of nanomolar dopamine metabolite of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC).** *Electrochem. Commun.* v. 7, p. 233–236, 2005.

¹⁴⁰ Mathias, R. **Methamphetamine Brain Damage in Mice More Extensive Than Previously Thought.** *The science of drug abuse e addiction/NIDA.* v. 15, p. 1-3, 2000.

¹⁴¹ Johnson, P. M.; Kenny, P. J. **Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats.** *Nature Neuroscience.* v. 13, p. 635–641, 2010.

¹⁴²Arguello, J.; Magosso, H.A.; Canevari, T.C.; et al. **Activity of SiDbCl in the Electrooxidation of Ascorbic Acid, Dopamine, and Uric Acid.** *Electroanalysis.*v. 23, p. 334 – 338, 2011.

¹⁴³ Da Cunha, C.; Wietzikoski, E.C.; Ferro, M. M.; Martinez, G. R.; Vital. M. A. B. F.; Hipólido, D.; Tufik, S.; Canteras, N. S. **Hemiparkinsonian rats rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission.***Behavioural Brain Research.* v. 189, p. 364-372, 2008.

¹⁴⁴Ferro, M. M.; Bellissimo, M. I.; Anselmo-Franci, J. A.; Angellucci, M. E. M.; Canteras, N. S.; Da Cunha, C. **Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations.** *Journal of Neuroscience Methods.* v. 148, p. 78-87, 2005.

¹⁴⁵ Santos, W. T. Pio.; Gimenes, D. T.; RICHTER, E. M.; ANGNES, L. **Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: potencialidades e aplicações.** *Quim. Nova,* v. 34, n 10, p. 1753-1761, 2011.

-
- ¹⁴⁶ Manjunathaa, R.; Suresha, G.S.; Melo, J.S.; et al. **Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using polystyrene sulfonate wrapped multiwalled carbon nanotubes bound to graphite electrode through layer-by-layer technique.** *Sens. and Actuators.* v. 145, p. 643-650, 2010.
- ¹⁴⁷ Moccelini, S.K.; Fernandes, S.C.; Vieira, I.C. **Bean Sprout Peroxidase Biosensor Based on L-Cysteine Self-Assembled Monolayer for the Determination of Dopamine.** *Sens. and Actuators.* v. 133, p. 364–369, 2008.
- ¹⁴⁸ Wang, P.; Li, Y.; Huang, X.; et al. **Fabrication of layer-by-layer modified multilayer films containing choline and gold nanoparticles and its sensing application for electrochemical determination of dopamine and uric acid.** *Talanta.* v. 73, p. 431–437, 2007.
- ¹⁴⁹ Sun, D.; Zhao, Q.; Tan, F.; Wang, X.; Gao, J. **Simultaneous detection of dopamine, uric acid, and ascorbic acid using SnO₂ nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes/carbon paste electrode.** *Anal. Methods,* v. 4, p. 3283-3289, 2012.
- ¹⁵⁰ Brezesinski, G.; Möhwald, H. **Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces.** *Adv. Colloid Interface Sci.* v. 100-102, p. 563-584, 2003.
- ¹⁵¹ Hulbert, A.J.; Else, P.L. **Membranes as possible pacemakers of metabolism.** *J. theor. Biol.,* v. 199, p. 257-274, 1999.
- ¹⁵² Nelson, D. L.; Cox, M. M. **Lehinger principles of biochemistry.** 2. Ed. New York: Worth Publishers, p. 280, 2000..
- ¹⁵³ Chan, Y. H.; Boxer, S. G. **Model membrane systems and their applications.** *Curr. Opin. Chem. Biol.* v. 11, n. 6, p. 581-587, 2007.
- ¹⁵⁴ Berg, J. M.; Stryer, L.; Tymoczko, J. L. **Bioquímica.** 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- ¹⁵⁵ Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. **Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids.** *J. Mol. Biol.* v. 13, n. 1, p. 238-52, 1965.
- ¹⁵⁶ Santos, N. C.; Castanho, M. A. R. B. **Lipossomas: A Bala Mágica acertou?** *Química. Nova,* v. 25, p. 1181-1185, 2002.
- ¹⁵⁷ Orwar, O.; Jesorka, A. **Liposomes: Technologies and Analytical Applications.** *Rev. Anal. Chem.* v. 1, p. 801-832, 2008.
- ¹⁵⁸ Moraes, M. L.; Gomes, P. J.; Ribeiro, P. A.; Vieira, P.; Freitas, A. A.; Kohler, R.; Oliveira Jr. O. N.; Raposo, M. **Polymeric scaffolds for enhanced stability of melanin incorporated in liposomes.** *Journal of Colloid and Interface Science,* v. 350, p. 268-274, 2010.

-
- ¹⁵⁹ Matthew, J. D.; Freese, A.; Deutch, A. I.; Kibat, P. G.; Sabel, B. A.; Langer, R.; Robert, H.R. **Biochemical and Behavioral Recovery in a Rodent Model of Parkinson's Disease following Stereotactic Implantation of Dopamine-Containing Liposomes.** *Experimental Neurology*. v. 115, p. 193-199, 1992.
- ¹⁶⁰ Zhigaltsev, V.; Kaplun, A. P.; Kucheryanu, V. G.; Kryzhanovsky, G. N.; Kolomeichuk, S. N.; Shvets, V. I.; Yurasov, V. V. **Liposomes containing dopamine entrapped in response to transmembrane ammonium sulfate gradient as carrier system for dopamine delivery into the brain of Parkinsonian mice.** *Journal of Liposome Research*. v. 11(1), p. 55–71, 2001.
- ¹⁶¹ Khare, P.; Jain, A.; Jain, N. K.; Soni, V.; Jain, S. K. **Glutamate-Conjugated Liposomes of Dopamine Hydrochloride for Effective Management of Parkinsonism's. PDA.** *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. v. 63, p. 372-379, 2009.
- ¹⁶² Jiang, J.; Qu, F.; Luo, A.; Geng, L.; Li, H.; Li, H.; Deng, Y. **Immobilization of dopamine transporter onto liposomes for capillary electrophoresis analysis.** *School of life science and technology. Institute of Technology, Beijing*. p.1668-1675, 2007.
- ¹⁶³ Carafa, M.; Marianecci, C.; Marzio, L. D.; Caro, D. V.; Giandalia, G.; Giannola, L. I.; Santucci, E. **Potential dopamine prodrug-loaded liposomes: preparation, characterization, and in vitro stability studies.** *Journal of Liposome Research*. v. 20 (3), p. 250-257, 2010.
- ¹⁶⁴ Moraes, M. L.; Oliveira, Jr.; O. N.; Rodrigues Filho, U. P.; Ferreira, M. **Phytase immobilization on modified electrodes for amperometric biosensing.** *Sens. Actuators*. v.1, p. 210-215, 2008.
- ¹⁶⁵ Michel, M.; Vautier, D.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Ball, V. **Layer by layer self-assembled polyelectrolyte multilayers with embedded phospholipid vesicles.** *Langmuir the ACS Journal of surfaces and colloids*. v. 20, p. 4835-4839, 2004.
- ¹⁶⁶ Moraes, M. L.; Baptista, M. S.; Itrid, R.; Zucolotto, V.; Oliveira Jr. O. N. **Immobilization of liposomes in nanostructured layer-by-layer films containing dendrimers.** *Materials Science and Engineering: C*. v. 28, p. 467–471, 2008.
- ¹⁶⁷ Wang, L.; Schönhoff, M.; Möhwald, H. **Lipids coupled to polyelectrolyte multilayers: ultraslow diffusion and dynamics of electrostatic interactions.** *J. Phys. Chem. B*, v. 106 (35), p. 9135-9142, 2002.
- ¹⁶⁸ Silva, V. P. A.; Alves, C. R.; Dutra, R. F.; Oliveira, J. E.; Rondina, D.; Furtado, R. F. **Biossensor amperométrico para determinação de peróxido de hidrogênio em leite.** *Ecl. Quím.* v. 36, P. 143-157, 2011.
- ¹⁶⁹ Lin, C. Y.; Lai, Y. H.; Balamurugan, A.; Vittal, R.; Lin, C. W.; Ho, K. C. **Electrode modified with a composite film of ZnO nanorods and Ag nanoparticles as a sensor for hydrogen peroxide.** *Talanta*. v. 82, p. 340–347, 2010.

-
- ¹⁷⁰ Farah, A. M.; Thema, F. T.; Dikio, E. D. **Electrochemical Detection of Hydrogen Peroxide Based on Graphene Oxide/Prussian Blue Modified Glassy Carbon Electrode.** *Int. J. Electrochem. Sci.* v. 7, p. 5069 – 5083, 2012.
- ¹⁷¹ Farah, A. M.; Thema, F. T.; Dikio, E. D. **Electrochemical Detection of Hydrogen Peroxide Based on Graphene Oxide/Prussian Blue Modified Glassy Carbon Electrode.** *Int. J. Electrochem. Sci.* v. 7, p. 5069 – 5083, 2012.
- ¹⁷² Clark, L. C.; Jr.; Lyons, C. **Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.* v. 102, p. 29-45, 1962.
- ¹⁷³ Liu, D.; Liu, H.; Hu, N. **pH-controllable bioelectrocatalysis of glucose by glucose oxidase loaded in weak polyelectrolyte layer-by-layer films with ferrocene derivative as mediator.** *Electrochimica Acta.* v. 55, 6426–6432, 2010.
- ¹⁷⁴ Pastorino, L.; Soumetz, F. C.; Ruggiero, C. **Nanostructured thin films for the development of piezoelectric immunosensors.** *Eng Med Biol Soc.* p. 2257-60, 2007.
- ¹⁷⁵ Rusling, J. F.; Hvastkovs, E. G.; Hulla, D. O.; Schenkman, J. B. **Biochemical applications of ultrathin films of enzymes, polyions and DNA.** *Chem. Commun.* v. 141, p. 141-154, 2008.
- ¹⁷⁶ Li, W.; Yuan, R.; Chai, Y.; Zhong, H.; Wang, Y. **Study of the biosensor based on platinum nanoparticles supported on carbon nanotubes and sugar–lectin biospecific interactions for the determination of glucose.** *Electrochimica Acta.* v. 56, p. 4203-4208, 2011.
- ¹⁷⁷ Davis, J.; Vaughan, D. H.; Cardosi, M. F. **Elements of biosensor construction.** *Enzyme and Microbial Technology.* v. 17, p. 1030-1035, 1995.
- ¹⁷⁸ Wang, H.; Zhou, C.; Liang, J.; Yu, H.; Peng, F. **An enhanced Glucose Biosensor Modified by Pt/sulfonated-MWCNTs with Layer by Layer Technique.** *Int. J. Electrochem. Sci.*, v. 3, p. 1180 – 1185, 2008.
- ¹⁷⁹ Yin, B.; Yuan, R.; Chai, Y.; Chen, S.; Cao, S.; Xu, Y.; Fu, P. **Amperometric glucose biosensors based on layer-by-layer assembly of chitosan and glucose oxidase on the Prussian blue-modified gold electrode.** *Biotechnol Lett.* v. 30, p. 317-322, 2008.
- ¹⁸⁰ Gao, Q.; Guo, Y.; Liu, J.; Yuan, X.; Qi, H.; Zhang, C.; **A biosensor prepared by co-entrapment of a glucose oxidase and a carbon nanotube within an electrochemically deposited redox polymer multilayer.** *Bioelectrochemistry.* v. 81, p. 109–113, 2011.
- ¹⁸¹ Tsai, T. W.; Heckert, G.; Neves, L. F.; Tan, Y.; Kao, D. Y.; Harrison, R. G.; Resasco, D. E.; Schmidtke, D. W. **Adsorption of Glucose Oxidase onto Single-Walled Carbon Nanotubes and Its Application in Layer-By-Layer Biosensors.** *Anal. Chem.* v. 81, p. 7917-7925, 2009.

-
- ¹⁸² Denga, C.; Chenb, J.; Nieb, Z.; Si, S. **A sensitive and stable biosensor based on the direct electrochemistry of glucose oxidase assembled layer-by-layer at the multiwall carbon nanotube-modified electrode.** *Biosensors and Bioelectronics*. v. 26, p. 213-219, 2010.
- ¹⁸³ Sarma, A. K.; Vatsyayan, P.; Goswami, P.; Minteer, S. D. **Recent advances in material science for developing enzyme electrodes.** *Biosensors and Bioelectronics*. v. 24, p. 2313–2322, 2009.
- ¹⁸⁴ Lu, B. W.; Chen, W. C. **A disposable glucose biosensor based on drop-coating of screen-printed carbon electrodes with magnetic nanoparticles.** *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. v. 304 p.400-402, 2006.
- ¹⁸⁵ Jiang, X.; Wu, Y.; Mao, X.; Cui, X.; Zhu, L. **Amperometric glucose biosensor based on integration of glucose oxidase with platinum nanoparticles/ordered mesoporous carbon nanocomposite.** *Sensors and Actuators B*. v. 153, p. 158–163, 2011.
- ¹⁸⁶ Wen, D.; Zou, X.; Liu, Y.; Shang, L.; Dong, S. **Nanocomposite based on depositing platinum nanostructure onto carbon nanotubes through a one-pot, facile synthesis method for amperometric sensing.** *Talanta*. v. 79, p. 1233-1237, 2009.
- ¹⁸⁷ Tang, Z.; Wang, Y.; Podsiadlo, P.; Kotov, N. Â. A. **Biomedical applications of layer-by-layer assembly: from biomimetics to tissue engineering.** *Advanced Materials*, v. 18, p. 3203-3224, 2006.
- ¹⁸⁸ Cosnier, S. **Biosensors based on immobilization of biomolecules by electrogenerated polymer films.** *App. Biochem. and biotech.* v. 89, p. 127-138, 2000.
- ¹⁸⁹ B. Y. Wu, S. H. Hou, F. Yin, J. Li, Z. X. Zhao, J. D. Huang, Q. Chen. **Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer assembly of multilayer films composed of chitosan, gold nanoparticles and glucose oxidase modified Pt electrode.** *Biosen and Bioelectron.* v. 22, p. 838, 844, 2007.
- ¹⁹⁰ Yoo, E. H.; Lee, S. Y. **Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice.** *Sensors*. v. 10, p. 4558-4576, 2012.
- ¹⁹¹ Komathi, S.U.; GopalaN, A. I.; Lee, K.P. **Fabrication of a novel layer-by-layer film based glucose biosensor with compact arrangement of multi-components and glucose oxidase.** *Biosens. and Bioelectron.* v. 24, p. 3131-3134, 2009.
- ¹⁹² Guiseppi-Eliea, A.; Choia, S. H.; Geckeler, K. E. **Ultrasonic processing of enzymes: Effect on enzymatic activity of glucose oxidase.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v. 58, p. 118-123, 2009.
- ¹⁹³ Chaubey, A.; Malhotra, B. D. **Mediated biosensors.** *Biosensors & Bioelectronics*. v. 17(6-7), p. 441-456, 2002.

-
- ¹⁹⁴ Bayramoglu, G.; Akgol, S.; Bulut, A.; Denizli, A.; Arica, M. Y. **Covalent immobilisation of invertase onto a reactive film composed of 2-hydroxyethyl methacrylate and glycidyl methacrylate: properties and application in a continuous flow system.** *Biochemical Engineering Journal*. v. 14 (2), p. 117-126, 2003.
- ¹⁹⁵ Zou, Y. J.; Xian, C. L.; Sun, L. X.; Xu, F. **Amperometric glucose biosensor prepared with biocompatible material and carbon nanotube by layer-by-layer self-assembly technique.** *Electrochimica Acta*. v. 53 (12), p. 4089-4095, 2008.
- ¹⁹⁶ Kim, J. S.; Gränstrom, M.; Friend, R. H.; Daik, R.; Feast, W. J.; Johansson, N.; Salaneck, W. J.; Cacialli, F. **Indium-Tin Oxide Treatments for Single and Double-Layer Polymeric Light-Emitting Diodes: The relation between the anode physical, chemical and morphological properties and the device performance** *J. Applied Physics*, v. 84, p. 6859-6870, 1998.
- ¹⁹⁷ Dua1, J. S.; Rana, A. C. Bhandari, A. K. **Liposome: methods of preparation and applications.** *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, v. 3, p. 14-20, 2012.
- ¹⁹⁸ Spiro, T. G.; Czernuszewicz, R. S.; **Physical Methods in Bioinorganic Chemistry: Spectroscopy and Magnetism.** Lawrence Que, Jr.; Ed.; University Science Books, CA, 2000.
- ¹⁹⁹ R. Pecora, ed. **Dynamic Light Scattering – Applications of Photon Correlation Spectroscopy.**chapter 8, p. 305, Plenum Press, New York, 1985.
- ²⁰⁰ Gomes, I. I. F.; **Interação de proteínas com superfícies nanoestruturadas e nanopartículas de metais nobres.** Tese de Doutorado. Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2009.
- ²⁰¹ Kelly, S. M.; Price, N. C. **The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function.** *Current Protein and Peptide Science*. v. 1, p. 349-386, 2000.
- ²⁰² Drake, A. F.; Harding, S. E.; Chowdhry, B. Z.; **Protein-Ligand Interactions: structure and spectroscopy; Eds.; Oxford University.** New York, 2001.
- ²⁰³ Galhardo, K. S.; Torresi, R. M.; Susana, I.; Torresi, C. **Improving the performance of a glucose biosensor using an ionic liquid for enzyme immobilization. On the chemical interaction between the biomolecule, the ionic liquid and the cross-linking agente.** *Electrochimica Acta*. v. 73, p.123-128, 2012.
- ²⁰⁴ Whitmore, L.; Wallace, B. A. **Dichroweb, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data.** *Nucleic Acids Research*. v. 32, p. 668-673, 2004.

-
- ²⁰⁵ Dafinone, M. I.; Feng, G.; Brugarolas, T.; Tettey, K. E.; Lee, D. **Mechanical reinforcement of nanoparticle thin films using atomic layer deposition.** *ACS Nano*. v. 5, p.5078-5087, 2011.
- ²⁰⁶ Komathi, S.; Gopalan, A. I.; Lee, K. P. **Fabrication of a novel layer-by-layer film based glucose biosensor with compact arrangement of multi-components and glucose oxidase.***Biosens Bioelectron*. v. 24, p.3131-3134, 2009.
- ²⁰⁷ Nguyen, T.A.; Maññle, F.; Gregersen, Ø.W. **Polyethylene/octa-(ethyloctadeca-10,13 dienoamide)silsesquioxaneblends and theadhesionstrenghtopaperboard.** *Int J Adhes*. v. 38, p.117-124, 2012.
- ²⁰⁸ Lin, Y. H.; Jiang, C.; Xu, J.; Lin, Z.; Tsukruk, V. V. **Robust, fluorescent, and nanoscale freestanding conjugated films.** *Soft Matter*, v. 3, p. 432-436, 2007.
- ²⁰⁹ Liu, W. C, Yang, C. C,Chen, W. C,Dai, B. T, Tsai, M. S.**The structural transformation and properties of spin-on poly(silsesquioxane) films by thermal curing.** *J Non-Cryst Solids*. v. 311, p. 233-240, 2002.
- ²¹⁰ Handke, M.; Kowalewska, A. **Siloxane and silsesquioxane molecules-precursors for silicate materials.** *Spectrochimica Acta Part A*. v. 79, p. 749-757, 2011.
- ²¹¹ Kowalewska, A.; Fortuniak, W.; Handke, B.**New hybrid silsesquioxane materials with sterically hindered carbosilane side groups.** *J Organomet Chem*.v. 694, p. 1345-1353, 2009.
- ²¹² Ye, H.; Crooks, R. M. **Electrocatalytic O₂ reduction at glassy carbon electrodes modified with dendrimer-encapsulated Pt nanoparticles.** *J Am Chem Soc*. v. 127, p. 4930-4934, 2005.
- ²¹³ Fujiwara, S. T.; Pessoa, C. A.; Gushikem, Y. **Hexacyanoferrate ion adsorbed on propylpyridiniumsilsesquioxane polymer film-coated SiO₂/Al₂O₃: use in an electrochemical oxidation study of cysteine.** *Electrochim Acta*.v. 48, p. 3625–3631, 2003.
- ²¹⁴ Huguenin, F.; Zucolotto, V.; Carvalho, A. J. F.; Gonzalez, E. R.; Oliveira Jr, O. N.**Layer-by-Layer Hybrid Films Incorporating WO₃, TiO₂, and Chitosan.***Chem. Mater*. v. 17, (26), p. 6739-6745, 2005.
- ²¹⁵ Dollish, F. R.; Fateley, W.G.; Bentley, F. F. **Characteristic Raman frequencies of organic compounds.**Wiley-Interscience, New York, 1974.
- ²¹⁶ Eiras, C.; Passos, I. N. G.; Brito, A. C. F.; Santos, J. R.; Zucolotto, V.; Oliveira Jr, O. N.; Kitagawa, I. L.; Constantino, C. J. L.; Cunha,H. N. **Nanocompósitos Eletroativos de Poli-o-metoxianilina e Polissacarídeos Naturais.** *Quim Nova*. v. 30, p. 1158-1162, 2007.
- ²¹⁷ Zhang, H. M.; Li, N.Q.; Zhu, Z.W. **Electrocatalytic response of dopamine at a DLhomocysteine self-assembled gold electrode.** *Microchemical Journal*. v. 64, n.3, p. 277-282, 2000.

-
- ²¹⁸ Zhang, M.; Gong, K.; Zhang, H.; Mao, L. **Layer-by-layer assembled carbon nanotubes for selective determination of dopamine in the presence of ascorbic acid Biosensors and Bioelectronics.** v. 20, p. 1270–1276, 2005.
- ²¹⁹ Li, T. A. et al. **Electrochemical determination of ascorbic acid in fruits on a vanadium oxide polypropylene carbonate modified electrode.** *Sensors and Actuators B-Chemical.* v.113, n.1, p.150-155, 2006.
- ²²⁰ Wang, C.; Yuan, R.; Chai, Y.; Chen, S.; Hu, F.; Zhang, M. **Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and tryptophan on gold nanoparticles/overoxidized-polyimidazole composite modified glassy carbon electrode.** *Analytica Chimica Acta.* v. 741, p. 15-20, 2012.
- ²²¹ Atta, N.F.; Ekram, A. G.; El-Ads, H. **Gold nanoparticles-coated poly(3,4-ethylene-dioxythiophene) for the selective determination of sub-nano concentrations of dopamine in presence of sodium dodecyl sulfate.** *Electrochimica Acta.* v. 69, p. 102–111, 2012.
- ²²² Liu, S.; Yan, J.; He, G.; Zhong, D.; Chen, J.; Shi, L.; Zhou, X.; Jiang, H. **Layer-by-layer assembled multilayer films of reduced graphene oxide/gold nanoparticles for the electrochemical detection of dopamine.** *Journal of Electroanalytical Chemistry.* v. 672, p. 40–44, 2012.
- ²²³ Zorn, M.; Gibbons, R.; Sonzogni, W. C. **Evaluation of Approximate Methods for Calculating the Limit of Detection and Limit of Quantification.** *Environ. Sci.Technol.* v. 33, p. 2291-2295, 1999.
- ²²⁴ Laurent, D.; Schlenoff, J. B. **Multilayer assemblies of redox polyelectrolytes.** *Langmuir*, v. 13, p. 1552-1557, 1997.
- ²²⁵ Souza, D.; Machado, S.A.S.; Avaca, L.A. **Voltametria de onda quadrada. primeira parte: aspectos teóricos.** *Quim. Nova.* v. 26, p. 81-89, 2003.
- ²²⁶ Arguello, J.; Magosso, H.A.; Canevari, T.C.; et al. **Activity of SiDbCl in the Electrooxidation of Ascorbic Acid, Dopamine, and Uric Acid.** *Electroanalysis.* v. 23, p. 334 – 338, 2011.
- ²²⁷ Kubota, L. T.; Duarte, J. C.; Silva, R. C. L.; et al. **Tetracyanoquino dimethanide adsorbed on a silica gel modified with titanium oxide for electrocatalytic oxidation of hydrazine.** *J. of Solid State Electrochem.* v. 11, p. 631-638, 2007.
- ²²⁸ Nicholson, R. S.; Shain, I. **Theory of Stationary Electrode Polarography.** *Anal.Chem.* v. 36(4), p.706 -723, 1964.
- ²²⁹ Lucotti, A.; Casella, M.; Tommasini, M.; Gramatica, F.; Fabrizio, E. D.; Zerbi, G. **Experimental and theoretical investigation of the apomorphine Raman spectrum.** *Journal of Raman Spectroscopy.* v. 40, p. 2074–2079, 2009.

-
- ²³⁰ Vyas, R. N.; Wang, B. **Electrochemical Analysis of Conducting Polymer Thin Films.** *Int J Mol Sci.* v. 11 (4), p.1956-1972, 2010.
- ²³¹ Vyas, R. N.; Wang, B. **Electrochemical Analysis of Conducting Polymer Thin Films.** *Int. J. Mol. Sci.* v. 11, p. 1956-1972, 2010.
- ²³² Barsoukov, E.; Macdonald, J. R. **Impedance Spectroscopy Theory, Experiment, and Applications.** Second Edition, John Wiley& Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2005.
- ²³³ Vollhardt, D.; Nandian, N.; Banik, S. D. **Nanoaggregate shapes at the air/water interface.** *Phys. Chem. Chem. Phys.*, v. 13, 4812-4829, 2011.
- ²³⁴ Zhang, Y.; Thingholm, B.; Goldie, K. N.; Ogaki, R.; Stadler, B. **Assembly of Poly(dopamine) Films Mixed with a Nonionic Polymer.** v. 28(51), p. 17585-92, 2012.
- ²³⁵ Barnes, E. O.; O'Mahony, A. M.; Aldous, L.; Hardacre, C.; Compton, R. G. **The electrochemical oxidation of catechol and dopamine on platinum in 1-Ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([C₂mim][NTf₂]) and 1-Butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([C₄mim][BF₄]): Adsorption effects in ionic liquid voltammetry.** *J of Electroanal. Chem.* v. 646, p. 11-17, 2010.
- ²³⁶ Rao, C. R. K. **Polyelectrolyte-Aided Synthesis of Gold and Platinum Nanoparticles: Implications in Electrocatalysis and Sensing.** *J of App Polym Sci.* v. 124, p. 4765-4771, 2012.
- ²³⁷ Tsai, M. C.; Tsai, Y. C. **Adsorption of glucose oxidase at platinum-multiwalled carbon nanotube-alumina-coated silica nanocomposite for amperometric glucose biosensor.** *Sensors and Actuators B.* v. 141, 592-598, 2009
- ²³⁸ Wu, B. Y.; Hou, S. H.; Yin, F.; Li, J.; Zhao, Z. X.; Huang, J. D.; Chen, Q. **Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer assembly of multilayer films composed of chitosan, gold nanoparticles and glucose oxidase modified Pt electrode.** *Biosen and Bioelectron.* v. 22, p. 838-844, 2007.
- ²³⁹ Ren, X.; Chen, D.; Meng, X.; Tang, F.; Hou, X.; Han, D.; Zhang, L. **Zinc oxide nanoparticles/glucose oxidase photoelectrochemical system for the fabrication of biosensor.** *J. of Coll. and Interf. Sci.* v. 334, p. 183, 2009.
- ²⁴⁰ Liang, W.; Zhuobin, Y. **Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase at a Gold Electrode Modified with Single-Wall Carbon Nanotubes.** *Sensors.* v. 3, p. 544-554, 2003.
- ²⁴¹ Villalba, P.; Ram, M. K.; Gomez, H.; Kumar, A.; Bhethanabotla, V.; Kumar, A. **GOX functionalized nanodiamond films for electrochemical biosensor.** *Materials Science and Engineering C.* v. 31, p. 1115-1120, 2011.

-
- ²⁴² Lee, D.; Cui, T. **Layer-by-Layer Self-Assembled Single-Walled Carbon Nanotubes Based Ion-Sensitive Conductometric Glucose Biosensors.** *IEEE Sensors Journal*. v. 9, p. 449-456, 2009.
- ²⁴³ Zuo, S.; Teng, Y.; Yuan, H.; Lan, M. **Direct electrochemistry of glucose oxidase on screen-printed electrodes through one-step enzyme immobilization process with silica sol-gel/polyvinyl alcohol hybrid film.** *Sensors and Actuators B*. v. 133, p. 555-560, 2008.
- ²⁴⁴ Jesus, C. G.; Lima, D.; Santos, V.; Wohnrath, K.; Pessôa, C. A. **Glucose biosensor based on the highly efficient immobilization of glucose oxidase on Layer-by-Layer films of silsesquioxane polyelectrolyte.** *Sensors and Actuators B: Chemical*. In Press, Accepted Manuscript.
- ²⁴⁵ Portaccio, M.; Ventura, B. D.; Mita, D. G.; Manolova, N.; Stoilova, O.; Rashkov, I.; Lepore, M. **FT-IR microscopy characterization of sol-gel layers prior and after glucose oxidase immobilization for biosensing applications.** *J Sol-Gel Sci Technol*. v. 57, p. 204-211, 2011.
- ²⁴⁶ Lee, D.; Cui, T. **Low-cost, transparent, and flexible single-walled carbon nanotube nanocomposite based ion-sensitive field-effect transistors for pH/glucose sensing.** *Biosen. and Bioelec.* v. 25, 2259-2264, 2010.
- ²⁴⁷ Salimia, A.; Noorbakhsh, A. **Layer by layer assembly of glucose oxidase and thiourea onto glassy carbon electrode: Fabrication of glucose biosensor.** *Electrochimica Acta*.v. 56, 6097- 6105, 2011.