

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CURSO DE DOUTORADO EM QUÍMICA – ASSOCIAÇÃO AMPLA
UEL/UEPG/UNICENTRO

CLICIANE GUADALUPE DE JESUS

**SENSORES ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM FILMES LBL DE
FTALOCIANINA METALADA E POLÍMERO SILSESQUIOXANO.**

PONTA GROSSA
2013

CLICIANE GUADALUPE DE JESUS

**SENSORES ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM FILMES LBL DE
FTALOCIANINA METALADA E POLÍMERO SILSESQUIOXANO.**

Tese apresentada à Universidade Estadual Ponta Grossa, como requisito do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: *Profa. Dra. Christiana Andrade Pessoa*

Co-orientadora: *Profa. Dra. Karen Wohnrath*

PONTA GROSSA
2013

- J58 Jesus, Cliciane Guadalupe de
Sensores eletroquímicos baseados em filmes LbL de ftalocianina
metalada e polímero silsesquioxano / Cliciane Guadalupe de Jesus.
Ponta Grossa, 2013.
104 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. Christiana Andrade Pessoa
Coorientadora: Prof. Dra. Karen Wohnrath
1. Filmes LbL. 2. Polieletrólito Silsesquioxano. 3. Biossensor
Amperométrico. 4. Glicose Oxidase. I. Pessoa, Christiana Andrade.
II. Wohnrath, Karen. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa,
Universidade Estadual de Londrina. Universidade Estadual do Centro-
Oeste. Doutorado em Química. IV. T.

CDD : 660

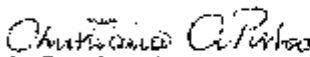
TERMO DE APROVAÇÃO

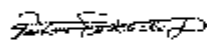
CLÍCIANE GUADALUPE DE JESUS

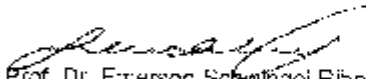
**"SENSORES ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM FILMES LbL
DE FTALOCIANINA METÁLICA E POLÍMERO
SILSESQUIOXANO."**

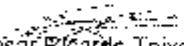
Fosse aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

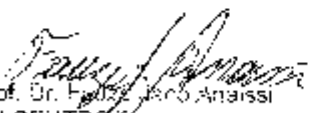
Orientador:


Prof.ª. Dra. Cláudia Andréa D'Assis
UEPG/PR


Prof.ª. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor
IQ/UNESP - Araraquara


Prof. Dr. Emerson Schwingel Ribeiro
IQ/UFRJ


Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley
UEL/PR


Prof. Dr. Fábio Jacó Antassi
UNICENTRO/PR

Ponta Grossa, 21 de junho de 2013.

*Aos meus amados pais, Clice e Silvério, por estarem
ao meu lado em todos os momentos...*

*Aos meus irmãos, Carla, Amazonas e Junior,
pelo apoio e compreensão...*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela sua presença constante na minha vida, sem que eu precise pedir, pelo auxílio nas minhas escolhas, me confortar nas horas difíceis e abrir os meus caminhos.

À minha família, pais e irmãos, pelo apoio incondicional, força, incentivo e amizade sem igual. Sem eles nada disto seria possível.

Aos meus sobrinhos Willian, Michael, Wellington, Thalles e Ícaro, pelos sorrisos, brincadeiras e momentos de diversão.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Chris, por todos os conhecimentos transmitidos, com um papel fundamental para a minha formação profissional. Agradeço também pela amizade, incentivo e sábias sugestões, todos sempre presentes ao longo desses anos.

À Profa. Dra. Karen Wohnrath, pela co-orientação, amizade e pela contribuição com seus conhecimentos e sugestões.

Ao Prof. Sérgio Toshio Fujiwara, pelo fornecimento do polieletrólito.

Ao querido amigo Zé, pela sua contribuição na realização das medidas de fluorescência e dicróismo circular (CD).

Aos professores e amigos da Universidade Federal do Ceará, pela colaboração, conhecimentos e sugestões durante a etapa de determinação de cloridrato de prometazina.

A professora Lucimara Stolz Roman da UFPR, pela disponibilidade pelas medidas de perfilometria.

À sempre amiga Cris Forte, da Universidade Federal do Ceará, pela enorme colaboração prestada, não apenas referente ao trabalho, mas também pelos momentos de amizade e diversão e pela ajuda prestada ao acolher-me em sua casa durante os meses em que fiquei em Fortaleza.

Aos professores e colegas do Doutorado em Química.

Ao pessoal do GDEM: Fabinho, Vagner, Bianca, Rosana, Giselle, Cleverson, João, Douglas, Monalisa, Ellen por estarem sempre me ajudando e tirando minhas dúvidas no laboratório. Agradeço também pelos momentos de amizade e descontração ao longo desses anos.

Ao meu amigo Lhésminho (Dhésmon) pela amizade sincera, pelo carinho, presteza e disponibilidade em sempre me ajudar e por tornar mais leve a árdua tarefa de crescer filmes.

À todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,
Mas não esqueço de que minha vida
É a maior empresa do mundo...
E que posso evitar que ela vá à falência.
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver
Apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e
Se tornar um autor da própria história...
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar
Um oásis no recôndito da sua alma...
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.
É saber falar de si mesmo.
É ter coragem para ouvir um “Não”!!!
É ter segurança para receber uma crítica,
Mesmo que injusta...

Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou construir um castelo...

(Fernando Pessoa)

RESUMO

Esta tese descreve a preparação, a caracterização e a aplicação de filmes automontados entre o polímero cloreto de 3-*n*-propilpiridínio silsesquioxano (SiPy^+Cl^-) e a ftalocianina tetrassulfonada de cobre (II) (CuTsPc), designados como $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_n$, para a construção de sensores e biossensores. Tais filmes, $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_n$, se mostraram promissores como sensor para detecção de cloridrato de prometazina (PMZ) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Adicionalmente, tirando-se proveito da propriedade do filme em eletrocatalisar a redução do H_2O_2 , construiu-se um biossensor enzimático amperométrico, a partir da imobilização da enzima glicose oxidase (GOx) sobre o filme, para a detecção de glicose, baseado na detecção do H_2O_2 produzido na reação enzimática. A técnica de espectroscopia de UV-Vis revelou que a adsorção de ftalocianina ocorre de maneira linear indicando que a cada bicamada depositada aproximadamente a mesma quantidade de material é imobilizado. A interação entre os grupos sulfônicos e o anel piridínio é a responsável pela sustentação dos filmes, devido ao deslocamento da banda associada à vibração dos grupos sulfônicos. O filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_5$ mostrou propriedades eletrocatalíticas na determinação de PMZ. Este apresentou dois processos de oxidação em 0,48 e 0,79 V. Após a otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada ($f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$), o pico a 0,79 V foi utilizado para sua quantificação. Nestas condições, o eletrodo modificado obteve uma resposta linear de $3,98 \times 10^{-7}$ a $3,85 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) iguais a $8,71 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ($2,79 \mu\text{g L}^{-1}$) e $9,31 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ($9,31 \mu\text{g L}^{-1}$), respectivamente. A recuperação em amostras farmacêuticas revelou alta estabilidade, especificidade e precisão do método, sem qualquer pré-tratamento. O filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2$ demonstrou excelente atividade eletrocatalítica para redução de H_2O_2 com uma ampla resposta linear ($4,97 \times 10^{-6}$ a $4,76 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e baixo limite de detecção ($0,33 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). Este eletrodo foi modificado com a enzima glicose oxidase (GOx) e recoberto com filme de Nafion[®] (Nf), que foi usado para prevenir o lixiviamento da GOx. As técnicas espectroscópicas de infravermelho, fluorescência e dicroísmo circular mostraram que a enzima GOx mantém a sua estrutura nativa secundária quando imobilizado sobre o filme LbL. O biossensor resultante $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx}/\text{Nf})$ exibiu uma resposta de corrente que variou linearmente com a concentração de glicose na faixa de 1 a 10 mmol L⁻¹, com LD = 0,17 mmol L⁻¹, sensibilidade de $1,397 \times 10^{-7} \mu\text{A}/\text{mmol L}^{-1}$ e um rápido tempo de resposta, inferior a 5 s. A constante de Michaelis-Menten aparente (K_m^{app}) foi de 10 mmol L⁻¹. Além disso, o biossensor também apresentou boa reprodutibilidade, excelente estabilidade e longo tempo de vida, sem diminuição da atividade enzimática por um período de uma semana e permaneceu ativo por mais de três semanas. A utilização do polímero Nf possibilitou a diminuição do efeito de interferentes na resposta do biossensor.

Palavras chave: Filmes LbL, polieletrólito Silsesquioxano, Biossensor Amperométrico, Glicose Oxidase.

ABSTRACT

In this thesis, it is described the preparation, characterization and application of LbL films based on the 3- *n* - propylpyridinium silsesquioxane polymer (SiPy^+Cl^-) and copper (II) tetrasulfophthalocyanine (CuTsPc), denoted as $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_n$, for construction of sensors and biosensors. These films $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_n$, were applied as a sensor for promethazine hydrochloride (PMZ) and hydrogen peroxide (H_2O_2). In addition, taking advantage of the property to the film in electrocatalyzing the reduction of H_2O_2 , an enzymatic amperometric biosensor was constructed by the immobilization of the glucose oxidase enzyme (GOx) on the film for detection of glucose, based on the detection of H_2O_2 produced in the enzymatic reaction. The UV-Vis spectroscopic technique showed that the adsorption of phthalocyanine occurred linearly indicating that the approximately the same amount of the species is immobilized at each bilayer. The interaction between the sulfonic group and the pyridinium ring is responsible for the support of the films due to the shift of the vibration associated with sulfonic groups. The film $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_5$ was highly electrocatalytic and sensitive determination of PMZ. The oxidation process of PMZ molecule presented two peaks at 0.48 and 0.79 V. After optimization of the square wave voltammetry parameters ($f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$ and $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$), the peak at 0.79 V was used for quantification. Accordingly, the modified electrode obtained a linear response of 3.98×10^{-7} to $3.85 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ with limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) equal to $8.71 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ (2.79 g L^{-1}) and $9.31 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ (9.31 g L^{-1}), respectively. The recovery in pharmaceutical samples showed high stability, specificity and accuracy of the method in complex samples without any pre-treatment. The film $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2$ showed excellent electrocatalytic activity for the reduction of H_2O_2 with a wide linear range (4.97×10^{-6} a $4.76 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) and low detection limit ($0.33 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). This electrode was modified with the glucose oxidase enzyme (GOx) and coated with Nafion[®] (Nf) film, which was used to prevent leaching of GOx. The Fourier transform infrared, fluorescence and circular dichroism spectroscopies, showed that the GOx enzyme retains its native secondary structure when immobilized on the LbL film. The resulting biosensor $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx}/\text{Nf})$ exhibited a current response which varied linearly with the concentration of glucose in the range of $1\text{-}10 \text{ mmol L}^{-1}$, with $\text{LOD} = 0.17 \text{ mmol L}^{-1}$, sensitivity of $1.397 \mu\text{A} \times 10^{-7}/\text{mmol L}^{-1}$ and a rapid response time, less than 5 seconds. The Michaelis-Menten constant apparent (K_m^{app}) was 10 mmol L^{-1} . Furthermore, the biosensor also showed good reproducibility, excellent stability and a long life, without loss of enzymatic activity by a one-week period and remained active for more than three weeks. The use of the polymer Nf decreased the effect of interferents on the response of the biosensor.

Keywords: LbL films, Silsesquioxane polyelectrolyte, Amperometric Biosensor, Glucose Oxidase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura idealizada do polímero cloreto de 3 - <i>n</i> - propilpirídínio-silsesquioxano. Para simplificar a molécula foram omitidos os átomos de H dos átomos de carbono.....	17
Figura 2.1: Estruturas dos silsesquioxanos.....	21
Figura 2.2: Espectros de UV-Vis da CuTsPc e do SiPy ⁺ Cl ⁻ em solução aquosa (0,01 mg mL ⁻¹) e na forma de filme LbL (SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc) ₁₀	27
Figura 2.3: Espectros de UV-Vis para o filme LbL (SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc) _n sobre quartzo, com n variando de 1 a 10.....	28
Figura 2.4: Deconcolução dos espectros de UV-Vis para as bandas Q do filme LbL (SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc), contendo diferentes bicamadas.....	29
Figura 2.5: Relação entre o valor da absorbância do filme em 620 e 694 nm para os diferentes números de bicamadas.....	30
Figura 2.6: Picos da energia de ligação de XPS: (A) N1s: N1, N2 e N3 da CuTsPc ⁴⁻ e dos íons piridínios no filme e (B) Cu2p _{3/2}	31
Figura 2.7: Representação da interação do filme LbL SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc.....	32
Figura 2.8: Espectros em modo transmissão para os polieletrólitos CuTsPc, SiPy ⁺ Cl ⁻ e para o filme (SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc) ₃₀	34
Figura 2.9: Espectros Raman para os polieletrólitos CuTsPc, SiPy ⁺ Cl ⁻ e para o filme (SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc) ₂₀ , em substratos de Au.....	35
Figura 2.10: Imagens de microscopia de força atômica para o substrato (a) FTO e para o filme SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc com (b) 2 bicamadas, (c) 6 bicamadas, (d) 10 bicamadas.....	36
Figura 2.11: Rugosidade média e espessura dos filmes automontados de (SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc) _n	37
Figura 3.1: Evolução dos compostos anti-histamínicos.....	41
Figura 3.2: Mecanismo de oxidação do cloridrato de prometazina.....	45
Figura 3.3: Voltamogramas cíclicos de 2,91 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de PMZ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ , pH = 5,0 sobre o filme LbL (SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc) ₅ , filmes <i>cast</i> de (SiPy ⁺ Cl) ₅ e (CuTsPc) ₅ e o substrato FTO.....	46
Figura 3.4: Voltamogramas cíclicos de PMZ 2,91 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ , pH = 5,0 sobre filme LbL de (SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc) ₅ a 50 mV s ⁻¹	47

Figura 3.5: Voltamogramas cíclicos de PMZ $2,91 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR, pH 5,0 sobre o filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_5$ com velocidades de varredura entre 10 e 100 mV s^{-1}	48
Figura 3.6: A: Dependência linear da velocidade de varredura com a I_{pa} e B: Dependência linear da raiz quadrada da velocidade de varredura com a I_{pa}	48
Figura 3.7: Dependência linear entre $\log I_{pa}$ com $\log v$	49
Figura 3.8: Influência do pH para PMZ $2,91 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ sobre filme LbL de $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_5$	51
Figura 3.9: (A) Voltamogramas de onda quadrada para $[\text{PMZ}] = 2,91 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, sobre o $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_5$ em diferentes frequências de aplicação de pulsos (10 a 300 s^{-1}). (B) Relação entre correntes de pico e frequência de dos pulsos de potencial, em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$	52
Figura 3.10: (A) Voltamogramas de onda quadrada para $[\text{PMZ}] = 2,91 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, sobre $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_5$ em diferentes amplitudes de aplicação de pulsos (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 mV) (B) Relação entre as correntes de pico e a amplitude de pulsos de potencial para PMZ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$	53
Figura 3.11: (A) Voltamogramas de onda quadrada para $[\text{PMZ}] 2,91 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, sobre $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_5$ em diferentes incrementos de potencial. (B): Relação entre as correntes de pico e o incremento de potencial para PMZ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$	54
Figura 3.12: Voltamogramas de onda quadrada para PMZ em pH 5,0 sobre filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_5$, com $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. As concentrações de PMZ variaram entre $3,98 \times 10^{-7}$ e $3,85 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Inserido: Dependência da corrente de pico em função da concentração de PMZ.....	55
Figura 3.13: Relação entre I_{pico} vs concentração de PMZ para curva de recuperação em amostra do medicamento Lisador [®] obtida a partir dos valores médios de corrente de pico ($n = 3$), com suas respectivas barras de desvio padrão. Na inserção, voltamogramas da PMZ na faixa de concentração de $7,94 \times 10^{-7}$ a $2,34 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	58
Figura 4.1: Elementos e componentes de um biossensor.....	63
Figura 4.2: Biossensor amperométrico: (A) primeira geração, (B) segunda geração, (C) terceira geração.....	64
Figura 4.3: Processo de imobilização da enzima GOx sobre o eletrodo $(\text{PEI/PAA-grafeno})_n$	67
Figura 4.4: Ligação cruzada entre PAMAM e o sistema BSA/GOX usando o glutaraldeído.....	67

Figura 4.5: Fórmula estrutural do Nafion.....	68
Figura 4.6: Ilustração do processo de preparação do biossensor de glicose.....	69
Figura 4.7: Ilustração do processo de preparação do biossensor de glicose (SiPy ⁺ Cl ⁻ /PSS) ₂ (SiPy ⁺ Cl ⁻ /GOx/Nf).....	72
Figura 4.8: Espectros de CD característicos de diferentes conformações das enzimas: (a) α -hélice; (b) folha- β ; (c) volta β e (d) irregular.....	74
Figura 4.9: Voltamogramas cíclicos para o substrato FTO, filmes <i>cast</i> de CuTsPc e SiPy ⁺ Cl ⁻ e filme LbL (SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc) ₂ na presença de [H ₂ O ₂] = 4,76 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ , ν = 50 mV s ⁻¹ , em tampão PBS, pH = 6,5.....	77
Figura 4.10: Voltamogramas cíclicos para o filme (SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc) _n onde n = 2, 4, 6, 8, 10, na presença de [H ₂ O ₂] = 4,76 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ , ν = 50 mV s ⁻¹ , em tampão PBS, pH = 6,5.....	78
Figura 4.11: Voltamogramas cíclicos para o filme (SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc) ₂ , em diferentes valores de pH, na presença de [H ₂ O ₂] = 4,76 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ , ν = 50 mV s ⁻¹ , em tampão PBS, pH = 6,5.....	79
Figura 4.12: Voltamogramas cíclicos para o filme (SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc) ₂ , em diferentes em diferentes velocidades de varredura (10 a 100 mV s ⁻¹), na presença de [H ₂ O ₂] = 4,76 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ , ν = 50 mV s ⁻¹ , em tampão PBS, pH = 6,5.....	80
Figura 4.13: Variação da intensidade de corrente de pico: (A) com a velocidade de varredura, (B) com a raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de [H ₂ O ₂] = 4,76 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ em meio de tampão PBS pH = 6,5.....	80
Figura 4.14: Curvas de corrente vs. [H ₂ O ₂] para o eletrodo (SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc) ₂ com adições sucessivas de 100 μ L de H ₂ O ₂ , em tampão PBS pH = 6,5.....	81
Figura 4.15: Resposta amperométrica para H ₂ O ₂ em um eletrodo de (SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc) ₂ em tampão PBS pH = 6,5, em potencial fixo de -0,10 V. Figura inserida: dependência entre a corrente e a concentração de H ₂ O ₂	82
Figura 4.16: Diagramas de Nyquist dos diferentes eletrodos (A) FTO, (B) filme (SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc) ₂ e (C) biossensor (SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc) ₂ (SiPy ⁺ Cl ⁻ /GOx/Nf) em meio de 8 mmol L ⁻¹ [Fe(CN) ₆] ^{4-/3-}	83
Figura 4.17: Espectros de fluorescência para (A) solução de GOx (0,015 mg/mL) em tampão PBS 0,1 mol L ⁻¹ , pH = 6,5 e para o filme (SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc) ₂ (SiPy ⁺ Cl ⁻ /GOx/Nf).....	85
Figura 4.18: (A) Espectro de FTIR para o filme (SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc) ₂ , (B) Filme cast GOx e (C) (SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc) ₂ (SiPy ⁺ Cl ⁻ /GOx/Nf) sobre silício.....	86

Figura 4.19: Espectro de CD para (A) solução de GOx em tampão PBS 0,1 M, pH = 6,5, (B) filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2$ e (C) filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx}/\text{Nf})$88

Figura 4.20: Curva de calibração para (●) $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx}/\text{Nf})$, (●) $(\text{CuTsPc}/\text{GOx}/\text{Nf})$, (●) $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PSS})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx}/\text{Nf})$ e (●) $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx}/\text{Nf})$, com sucessivas adições de 1 mmol L^{-1} de glicose.....90

Figura 4.21: (A) Cronoamperograma obtido para a adição de padrão usada na determinação de glicose em meio de solução tampão PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 6,5, na faixa de 1 a 10 mmol L^{-1} . E aplicado: $-0,10 \text{ V}$ vs Ag/AgCl. (B): Curva de calibração para o biossensor $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx}/\text{Nf})$90

Figura 4.22: Curva de calibração para o biossensor $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx}/\text{Nf})$91

Figura 4.23: Gráfico de Duplo recíproco ou Lineweaver and Burk, obtido para o filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx}/\text{Nf})$ (E = $-0,10 \text{ V}$).....92

Figura 4.24: Efeito do tempo de estocagem do biossensor $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx}/\text{Nf})$ para análise diária em solução de tampão PBS pH = 6,5, contendo 1 mmol L^{-1} de glicose.....93

Figura 4.25: Dependência da corrente em função do biossensor.....94

Figura 4.26: Cronoamperograma obtido do biossensor $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx}/\text{Nf})$ para adições da de glicose com concentração de 1 mmol L^{-1} e de possíveis interferentes na concentração de $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de solução tampão PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 6,5. E aplicado: $-0,1 \text{ V}$ vs Ag/AgCl.95

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Valores de energia de ligação (BE) de FTO/5 bicamadas.....	32
Tabela 3.1: Parâmetros obtidos a partir da regressão linear das curvas analíticas para oxidação de PMZ sobre filme (SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc) ₅ em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ por VOQ, empregando $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$	56
Tabela 3.2: LD e LQ obtidos na determinação de PMZ em eletrólito puro utilizando diferentes eletrodos de trabalho.....	57
Tabela 3.3: Resultados obtidos para curvas de recuperação de PMZ em eletrólito puro e em formulações comerciais por VOQ sobre filme LbL (SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc) ₅ com $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. [PMZ] _{adicionada} = $7,94 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$	58
Tabela 4.1: Atribuição das principais bandas (cm ⁻¹) para os espectros de FTIR da GOx livre e imobilizada no filme LbL.....	87
Tabela 4.2: Construção e performance de diferentes eletrodos modificados com filmes LbL.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM (Atomic Force Microscopy) - microscopia de força atômica

BSA (Bovine Serum Albumin) - albumina de soro bovino

CNT - Nanotubos de carbono

CuTsPc - Ftalocianina tetrassulfonada de cobre

CV (Cyclic Voltammetry) - voltametria cíclica

EIS (Electrochemical Impedance Spectroscopy) - espectroscopia de impedância eletroquímica

E_{pa} - potencial de pico anódico

E_{pc} - potencial de pico catódico

FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) - Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

FTO - óxido de estanho dopado com flúor

GOx - glicose oxidase

I_{pico} – corrente de pico

ITO - óxido de estanho dopado com índio

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

k_m^{app} - constante aparente de Michaelis-Menten

LbL - Layer-by-Layer

MWNT (Multi-Walled Carbon Nanotubes) – nanotubos de carbono de paredes múltiplas

PAMAM - poliamidoamina

PB (Prussian blue) - azul da Prússia

PSS - poliestireno sulfonado

PVS - poli(ácido vinilssulfônico)

SiPy⁺Cl⁻ - 3 - *n* - Propilpiridínio Silsesquioxano

SWNT (Single-walled carbon nanotubes) - nanotubos de carbono de paredes simples

UV-Vis - Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível

v - velocidade de varredura.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	16
REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO I: Objetivos	20
CAPÍTULO II: Caracterização dos filmes LbL	21
2.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.2. PARTE EXPERIMENTAL.....	23
2.2.1. Reagentes.....	23
2.2.2. Preparação dos filmes LbL	24
2.2.3. Técnicas de Caracterização	24
2.2.3.1. Espectroscopia na região do UV-Vis.....	24
2.2.3.2. Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios-X (XPS).....	25
2.2.3.3. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR) e Raman.....	26
2.2.3.4. Microscopia de Força Atômica (AFM) e Perfilometria.....	26
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	27
2.3.1. Espectroscopia de absorção na Região do UV-Vis	27
2.3.2. Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios-X	31
2.3.3. Espectroscopia de absorção no Infravermelho e Raman	33
2.3.4. Análise morfológica por microscopia de força atômica (AFM) e Perfilometria....	35
2.4. CONCLUSÕES PARCIAIS.....	37
2.5. REFERÊNCIAS	38
CAPÍTULO III: Sensor para Cloridrato de Prometazina	41
3.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	41
3.2. PARTE EXPERIMENTAL.....	42
3.2.1. Reagentes e Soluções.....	42
3.2.2. Amostras comerciais analisadas	43
3.2.3. Medidas eletroquímicas.....	43
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.3.1. Comportamento eletroquímico do cloridrato de prometazina	45
3.3.2. Influência da velocidade de varredura.....	47
3.3.3. Influência do pH	50
3.3.4. Estudos de voltametria de onda quadrada	51
3.3.4.1. Otimização dos parâmetros da VOQ.....	51
3.3.4.2. Curvas Analíticas.....	55
3.3.4.3. Aplicação do método.....	57
3.4. CONCLUSÕES PARCIAIS.....	59
3.5. REFERÊNCIAS	59
CAPÍTULO IV: Filmes LbL para aplicação em biossensor	63
4.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	63
4.1.1. Biossensores	63
4.1.2. Biossensores enzimáticos a base de filmes LbL.....	65
4.1.3. Utilização do nafion para a construção de biossensores enzimáticos	68
4.2. PARTE EXPERIMENTAL.....	70
4.2.1. Reagentes.....	70
4.2.2. Detecção do Peróxido de Hidrogênio	71

4.2.3. Preparação do biossensor de glicose	72
4.2.4. Caracterização do Biossensor	72
4.2.4.1 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).....	72
4.2.4.2 Espectroscopia de fluorescência.....	73
4.2.4.3 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).....	73
4.2.4.4 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD).....	73
4.2.5 Estudos amperométricos do biossensor.....	75
4.2.5.1 Estudo da estabilidade e reprodutibilidade do biossensor.....	75
4.2.5.2 Desenvolvimento da Metodologia Analítica para o Biossensor.....	75
4.2.5.3 Análise de interferentes.....	75
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.3.1. Detecção do Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂).....	76
4.3.2. Estudo da Repetibilidade e Reprodutibilidade de Medida do sensor	82
4.3.3. Caracterização do biossensor.....	83
4.3.3.1. Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).....	83
4.3.3.2 Espectroscopia de fluorescência.....	84
4.3.3.3 Espectroscopia de infravermelho (FTIR).....	85
4.3.3.4 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD).....	87
4.3.4. Biossensor para glicose	89
4.3.5. Estudo da Estabilidade e reprodutibilidade do Biossensor.....	93
4.3.6. Análise de interferentes	95
4.4. CONCLUSÕES PARCIAIS.....	96
4.5. REFERÊNCIAS	96
CAPÍTULO V: Conclusões Finais.....	101
CAPÍTULO VI: Perspectivas Futuras.....	103

Um importante aspecto da nanociência consiste na elaboração de sistemas controlados em escala nanométrica para melhor estudar mecanismos de funcionamento de biomoléculas em escala molecular ^[1]. Neste sentido, uma alternativa que tem sido muito usada nas últimas décadas envolve a formação de filmes finos nanoestruturados de diferentes materiais os quais permitem o controle de espessura e de propriedades em nível molecular. A utilização de eletrodos modificados com filmes finos pode oferecer vantagens substanciais para a eletroanalítica. Dentre elas, a habilidade para pré-projetar monocamadas ou bicamadas com estruturas moleculares ordenadas possibilita desenvolver superfícies com propriedades e funções específicas, viabilizando interações entre a superfície do eletrodo e os analitos alvos. Isto faz com que seja possível otimizar processos, por exemplo, de complexação e/ou de transferência de elétrons, que são fundamentais no desenvolvimento de sensores eletroquímicos ^[2].

Os sensores e biossensores têm adquirido importância devido à possibilidade de avaliação de processos sintéticos ou biológicos, além do entendimento destes processos ^[3]. Estes têm sido considerados uma ferramenta de fundamental importância na detecção de componentes químicos e biológicos para monitoramento químico, ambiental e alimentar. Isto devido a seu desempenho, que inclui alta especificidade e sensibilidade, tamanho compacto, fácil operação/manipulação, pequeno tempo de resposta, baixo custo, portabilidade, construção e obtenção de resposta em tempo real ^[4].

Neste contexto, as técnicas de fabricação de filmes finos vem sendo utilizadas para o desenvolvimento de sensores e biossensores, pois dispositivos a base destes filmes representam economia de material e baixo peso molecular ^[5]. Dentre estas, a técnica de automontagem (*Layer-by-Layer*, LbL) tem como vantagens a simplicidade experimental ^[6,7,8], adequação para diversos substratos, grande variedade de moléculas que podem ser imobilizadas, aplicação flexível em objetos com formas e tamanhos irregulares além do controle da espessura ^[9]. Esta foi desenvolvida, por Decher e colaboradores ^[6,8], e é baseada na atração eletrostática entre moléculas com cargas opostas sobre um substrato sólido.

Diversos materiais são empregados na fabricação de filmes LbL, os quais incluem polímeros sintéticos ^[10], nanopartículas ^[11], nanotubos ^[12], dendrímeros ^[11], polissacarídeos naturais ^[13], biomoléculas ^[14,15] e silsesquioxanos ^[16,17].

Neste sentido, o cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano (Figura 1), um polímero ânion-trocador, cuja síntese foi devidamente patenteada ^[18], recebe atenção especial

por apresentar como principais características, boa estabilidade química, alta solubilidade em água e a grande capacidade de formação de filmes finos sobre a superfície de substratos sólidos ^[19]. Este polímero apresenta em sua estrutura o cátion piridínio, devido a esta carga o mesmo tem sido amplamente utilizado na preparação de trocadores aniônicos ^[20] e na construção de sensores eletroquímicos pela imobilização de espécies aniônicas ^[21].

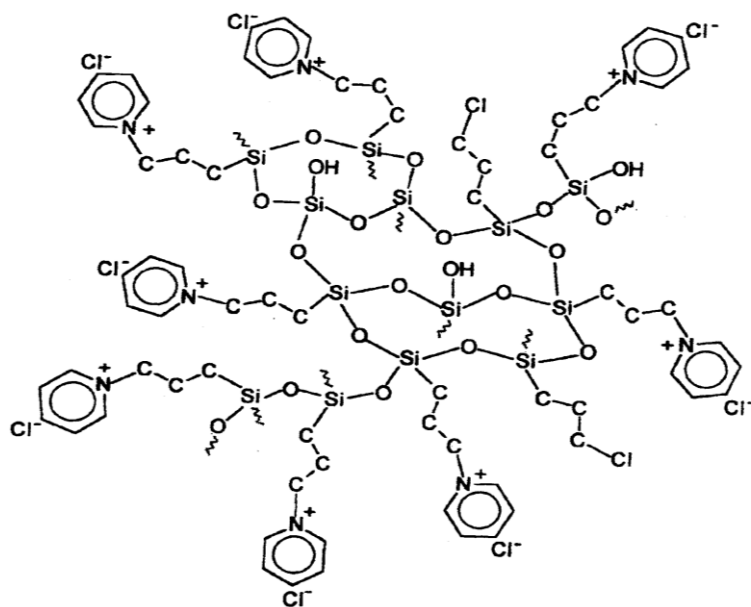


Figura 1: Estrutura idealizada do polímero cloreto de 3 - *n* - propilpirídínio-silsesquioxano. Para simplificar a molécula foram omitidos os átomos de H dos átomos de carbono.

Neste trabalho, a técnica de automontagem foi usada para fabricar filmes nanoestruturados entre o polímero 3 - *n* - propilpirídínio-silsesquioxano (SiPy^+Cl^-), utilizado como policação combinados com ftalocianina tetrassulfonada de cobre (CuTsPc). Inicialmente, verificou-se a formação dos filmes de ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$) através de interações específicas entre esses materiais. Este foi aplicado como eletrodo modificado na detecção de PMZ, verificando os efeitos de eletrocatalise, sensibilidade e da aplicabilidade em amostras farmacêuticas. Posteriormente um biossensor de glicose foi preparado sobre o filme ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$)₂, através da imobilização da enzima glicose oxidase (GOx) revestido por uma fina camada de Nafion[®]. Sendo o peróxido de hidrogênio um dos produtos gerados na oxidação desta enzima, um estudo prévio na presença deste foi realizado.

Esta tese baseou-se nos objetivos descritos no Capítulo 1. O Capítulo 2 abordará uma introdução sobre uso de silsesquioxanos no desenvolvimento de sensores, bem como a caracterização dos filmes. Em seguida, no Capítulo 3, serão discutidos a utilização do filme

como sensor de PMZ. O Capítulo 4 abordará a otimização das condições eletroquímicas com base na detecção de peróxido de hidrogênio, uma vez que este é produto da reação enzimática, bem como a caracterização e o desenvolvimento do biossensor de glicose. Por fim, as conclusões do trabalho e propostas para trabalhos futuros serão apresentadas, respectivamente, nos Capítulos 5 e 6.

REFERÊNCIAS

- [1] GIRARD-ESGROT, A.P.; GODOY, S.; BLUM, L.J. Enzyme association with lipidic Langmuir-Blodgett films: Interests and applications in nanobioscience. **Advances in Colloid and Interface Science**. v. 116, p. 205-225, 2005.
- [2] FREIRE, R.S.; PESSOA, C.A.; KUBOTA, L.T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**. v. 26, p. 381-389, 2003.
- [3] ZHANG, S.; WRIGHT, G.; YANG, Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 15, p. 273-282, 2000.
- [4] DENNISON, M.J.; TURNER, A.P.F. Biosensors for Environmental Monitoring. **Biotechnology Advances**. v. 13, p. 1-12, 1995.
- [5] ZUCOLOTTO, V.; FERREIRA, M.; CORDEIRO, M.R.; CONSTANTINO, C.J.L.; BALOGH, D.T.; ZANATTA, A.R.; MOREIRA, W.C.; OLIVEIRA Jr., O.N. Unusual Interactions Binding Iron Tetrasulfonated Phthalocyanine and Poly(allylamine hydrochloride) in Layer-by-Layer Films. **The Journal of Physical Chemistry B**. v. 107, p. 3733-3737, 2003.
- [6] DECHER, G. Multicomposites Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric. **Science**. v. 277, p. 1232-1237, 1997.
- [7] SIQUEIRA Jr, J.R. GASPAROTTO, L.H.S.; CRESPILO, F.N.; CARVALHO, A.J.F.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA Jr., O.N. Physicochemical Properties and Sensing Ability of Metallophthalocyanines/Chitosan Nanocomposites. **The Journal of Physical Chemistry B**. v. 110, p. 22690-22694, 2006.
- [8] PATERNO, L.G.; MATOSSO, L.H.C.; OLIVEIRA Jr, O.N. Filmes Poliméricos Ultrafinos Produzidos Pela Técnica de Automontagem: Preparação, Propriedades e Aplicações. **Química Nova**. v. 24, p. 228-235, 2001.
- [9] VILLIERS, M.M. de; OTTO, D.P.; STRYDOM, S.J.; LVOV, Y.M. Introduction to nanocoatings produced by layer-by-layer (LbL) self-assembly. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 63, p. 701-715, 2011.
- [10] LVOV, Y.; ESSLER, F.; DECHER, G. Combination of Polycation Polyanion Self-Assembly And Langmuir-Blodgett Transfer For The Construction Of Superlattice Films. **The Journal of Physical Chemistry**. v. 97, p. 13773-13777, 1993.

- [11] CRESPILO, F.N.; HUGUENIN, F.; ZUCOLOTTI, V.; OLIVI, P.; NART, F.C., OLIVEIRA Jr., O.N. Dendrimers as nanoreactors to produce platinum nanoparticles embedded in layer-by-layer films for methanol-tolerant cathodes. **Electrochemistry Communications**. v. 8, p. 348-352, 2006.
- [12] MAMEDOV, A.A.; KOTOV, N.A.; PRATO, M.; GULDI, D.M.; WICKSTED, J.P.; HIRSCH, A. Molecular design of strong single-wall carbon nanotube/polyelectrolyte multilayer composites. **Nature Materials**. v. 1, p. 190-194, 2002.
- [13] EIRAS, C.; PASSOS, I.N.G.; BRITO, A.C.F.; SANTOS JR., J.R.; ZUCOLOTTI, V.; OLIVEIRA JR., O.N.; KITAGAWA, I.L.; CONSTANTINO, C.J.L.; CUNHA, H.N. Nanocompósitos Eletroativos de Poli-O-Metoxianilina e Polissacarídeos Naturais. **Química Nova**. v. 30, p. 1158-1162, 2007.
- [14] HUSSAIN, S.A.; PAUL, P.K.; DEY, D.; BHATTACHARJEE, D.; SINHA, S. Immobilization of single strand DNA on solid substrate. **Chemical Physics Letters**. v. 450, p. 49-54, 2007.
- [15] FERREIRA, M.; FIORITO, P.A.; OLIVEIRA Jr, O.N.; TORRESI, S.I.C. de. Enzyme-mediated amperometric biosensors prepared with the layer-by-layer (LbL) adsorption technique. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 19, p. 1611-1615, 2004.
- [16] CASSAGNEAU, T.; CARUSO, F. Oligosilsesquioxanes as Versatile Building Blocks for the Preparation of Self-Assembled Thin Films. **Journal of the American Chemical Society**. v. 124, p. 8172-8180, 2002.
- [17] JIA, P.; ARGUN, A.A.; XU, J.; XIONG, S.; MA, J.; HAMMOND, P.T.; LU, X. High-Contrast Electrochromic Thin Films via Layer-by-Layer Assembly of Starlike and Sulfonated Polyaniline. **Chemistry of Materials**. v. 22, p. 6085-6091, 2010.
- [18] GUSHIKEM, Y.; ALFAYA, R.V.S.; ALFAYA, A.A. S. Braz. Pat., INPI 9803053-1, 1998.
- [19] ALFAYA, R.V.S.; GUSHIKEM, Y. Aluminum Oxide Coated Cellulose Fibers Modified with *n*-Propylpyridinium Chloride Silsesquioxane Polymer: Preparation, Characterization, and Adsorption of Some Metal Halides from Ethanol Solution. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 213, p. 438-444, 1999.
- [20] 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.
- [21] 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. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 11, p. 281-285, 2000.

Uma vez conhecida a potencialidade de filmes LbL entre o cloreto de 3 - n - propilpiridínio silsesquioxano (SiPy^+Cl^-) e a ftalocianina tetrassulfonada de cobre (CuTsPc) para a construção de sensores eletroquímicos, este trabalho de tese teve como principais objetivos:

- 1. Preparação e caracterização de filmes automontados entre o cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano (SiPy^+Cl^-) e a ftalocianina tetrassulfonada de cobre (CuTsPc):** preparar e caracterizar filmes nanoestruturados de CuTsPc juntamente com polieletrólito SiPy^+Cl^- , pelas técnicas espectroscópicas de UV-Vis, FTIR, Raman, XPS e morfológicas de AFM e perfilometria.
- 2. Desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para determinação do Cloridrato de Prometazina:** desenvolver e aplicar uma metodologia eletroanalítica para a determinação de PMZ utilizando o filme automontado pela técnica *Layer-by-Layer* ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$)₅ e a técnica de voltametria de onda quadrada.
- 3. Utilização do filme ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$)_n na detecção amperométrica de peróxido de hidrogênio:** estudar os parâmetros relevantes para detecção de H_2O_2 , tais como: número de bicamadas, pH do eletrólito suporte e potencial aplicado para posterior imobilização enzimática e obtenção do biossensor.
- 4. Estudo da Imobilização enzimática em filmes automontados de ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$)₂:** desenvolver, caracterizar pelas técnicas espectroscópicas de impedância eletroquímica, fluorescência, FTIR, dicroísmo circular; e aplicar um biossensor enzimático amperométrico, baseado na imobilização da enzima glicose oxidase sobre o filme, recobertos com membrana de Nafion[®] para a detecção de glicose.

2.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Silsesquioxanos são estruturas de silício-oxigênio. Os termos “sil”, “sesqui” e “oxano” indicam que cada átomo de silício está ligado a 1,5 átomos de oxigênio e o prefixo “oligo”, muitas vezes utilizado, indica que um pequeno número destes está agrupado. As moléculas dos silsesquioxanos possuem fórmula geral $(\text{XSiO}_{1,5})_n$, onde n ocasionalmente maior ou igual a quatro, por exemplo, $n = 4, 6, 8, 10, 12$, etc, e X são os substituintes nos átomos de silício, podendo ser $X = \text{hidrogênio, radical orgânico, halogênio, etc}$ ^[1]. Estes compostos são de grande interesse devido a sua arquitetura molecular incomum e da variedade estrutural. As estruturas dos silsesquioxanos podem ser encontradas como estrutura aleatória, escada, gaiola ou ainda gaiola parcial, como ilustrado na Figura 2.1.

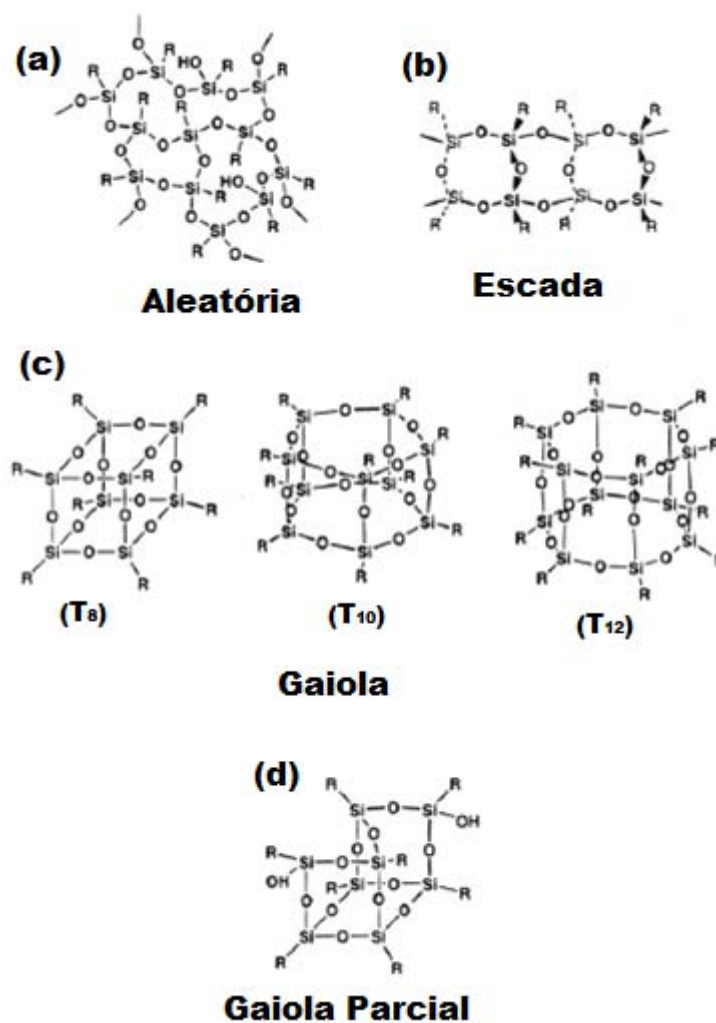


Figura 2.1: Estruturas dos silsesquioxanos ^[1].

A literatura reporta o uso de diferentes silsesquioxanos na adsorção de metais. Um exemplo da utilização destes na adsorção de metais é mostrado no trabalho de Arenas *et al* [2], neste, o cloreto de octano 3-n-propil-1-azonia-4-aza-biciclo [2.2.2] silsesquioxano (dabcosil silsesquioxano), foi imobilizado na superfície da sílica, previamente modificada com óxido de alumínio. O sólido resultante, dabcosil-Al/SiO₂, foi utilizado como material adsorvente para o cromo (VI) em solução aquosa. O máximo de cromo adsorvido foi de 0,144 mmol g⁻¹. Este valor foi obtido levando-se em conta a troca iônica entre os grupos dabcosil presentes no material e os íons cromo presentes na solução. Pode-se observar que o mecanismo de acumulação de Cr (VI) pelo adsorvente foi uma troca iônica de dois ânions Cl⁻ por um CrO₄⁻². Em outro trabalho o cloreto de 1,4-diazabiciclo [2.2.2] octano-n-propiltrimetoxissilano (SiDbCl₂), foi imobilizado em celulose (Cel) e acetato de celulose (Celac), previamente modificada com óxido de alumínio (Celal e CelacAl). Os materiais híbridos CelAl/SiDbCl₂ CelacAl/SiDbCl₂, foram utilizados na adsorção de Cu (II) a partir de etanol, apresentando alta eficácia de adsorção de 1,30 mmol g⁻¹ para CelAl/DbCl₂ e 2,10 mmol g⁻¹ para CelacAl/DbCl₂ [3].

Em contra partida, diversos são os trabalhos que utilizam os silsesquioxanos na obtenção de eletrodos modificados e sua utilização como sensores eletroquímicos. Neste sentido, o octa (3-aminopropil) octasilsesquioxano de cobre, modificado com azida (ASCA), foi utilizado em um eletrodo de pasta de carbono para determinação de nitrito [4] e ácido ascórbico (AA) [5]. Os eletrodos propostos mostraram sensíveis a determinação de nitrito e AA com um intervalo linear de $1,0 \times 10^{-4}$ a $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. No entanto apresentou maior sensibilidade ao AA, com LD de $6,9 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

O silsesquioxano utilizado neste trabalho tem sido amplamente utilizado na preparação de trocadores aniônicos e também na construção de sensores eletroquímicos pela imobilização de espécies aniônicas. Neste sentido, este foi imobilizado na superfície de sílica modificada com um filme de Al₂O₃, devido a sua capacidade de formar filmes finos e estáveis em diversos substratos e com o intuito de aumentar a resistência mecânica do polieletrólito [6]. O material resultante, Al₂O₃:SiPyCl, apresentou uma capacidade de troca iônica de 1,04 mmol g⁻¹. Os íons metálicos Fe³⁺, Cu²⁺ e Zn²⁺, foram adsorvidos pelo sólido modificado a partir de soluções de etanol. Os coeficientes de equilíbrio, k, determinados para cada espécie mostrou que SiO₂:Al₂O₃:SiPyCl tem uma elevada afinidade para os íons metálicos, apresentando os seguintes valores, expressos como log k Cu = 3,0, Zn = 3,5 e Fe = 3,0 [7]. Em

outro trabalho uma superfície de grafite foi recoberta com um filme fino do polímero. Sobre o filme do polímero, a espécie eletroativa $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ foi adsorvida por meio de uma reação de troca iônica. O eletrodo resultante, $(\text{graph}/\text{SiPy}^+)_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, foi utilizado para oxidar ácido ascórbico. Os resultados mostraram uma relação linear no intervalo de $0,25 \times 10^{-4}$ a $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, com $\text{LD} = 0,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ [8].

No entanto, a literatura reporta poucos trabalhos com a utilização de silsesquioxanos na forma de filmes LbL. Recentemente nosso grupo de pesquisa GDEM têm explorado as propriedades de filmogenia deste polieletrólito como sensor eletroquímico e também como nanoreator para imobilização de nanopartículas de platina em filmes LbL. Vagner *et al* [9], mostraram a eficiente imobilização de nanopartículas de platina na cavidades do SiPy^+Cl^- , onde imagens de TEM indicaram um tamanho médio de 3 - 40 nm para PtNPs. O híbrido formado $\text{Pt-SiPy}^+\text{Cl}^-$ alternado com o poliânion poli(vinil-sulfônico) (PVS) foi usado na preparação de filmes LBL. Estes exibiram alta estabilidade e reprodutibilidade na detecção de dopamina e ácido ascórbico. No trabalho de Jesus *et al* [10], os autores mostraram que a formação do filme LbL entre o polieletrólito alternado com ftalocianina tetrassulfonada de cobre (CuTsPc) ocorre devido a interações específicas dos grupos sulfônicos da CuTsPc com os grupos de piridínio do policátion. Os filmes apresentaram eletroatividade para DA e AA, sendo capaz de distinguir entre DA e AA, com uma diferença de potencial de cerca de 500 mV.

2.2. PARTE EXPERIMENTAL

2.2.1. Reagentes

Todas as soluções foram preparadas utilizando água destilada. A ftalocianina tetrassulfonada de cobre (CuTsPc) foi adquirida da Sigma-Aldrich. O policátion cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano (SiPy^+Cl^-) foi obtido a partir da síntese descrita na literatura [11]. O hidróxido de sódio e ácido clorídrico utilizados para o ajuste do pH das soluções de lavagem, bem como dos polieletrólitos, foram adquiridos da Vetec.

2.2.2. Preparação dos filmes LbL

Os filmes LbL foram depositados sobre diferentes substratos FTO (vidro recoberto com óxido de estanho dopado com flúor), com resistividade de 10-20 Ω , silício, quartzo, vidro recoberto com ouro, apropriados para cada tipo de medida de caracterização. Os substratos foram previamente limpos a partir da imersão em uma solução alcoólica contendo 10 % em água de NaOH por 15 min e lavados com água destilada. Em seguida, transferidos para uma solução oxidante básica ($5\text{H}_2\text{O}:1\text{NH}_4\text{OH}:1\text{H}_2\text{O}_2$) e aquecidos por 10 min ^[12]. Por fim, passaram por mais dois processos de limpeza, com álcool isopropílico e clorofórmio a quente. Para o substrato de ouro a etapa com solução oxidante básica não foi realizada, a fim de evitar a lixiviação do ouro da superfície do vidro.

Os filmes LbL foram automontados através da deposição manual alternada de soluções de SiPy^+Cl^- e CuTsPc (2 mg mL^{-1}). Inicialmente, os substratos foram imersos por 5 minutos em béqueres contendo a solução do polícatión SiPy^+Cl^- (pH 8,0), com posterior lavagem em água destilada (ajustada em pH 8,0) e secagem em fluxo de ar. Repetiu-se o processo para o poliânion CuTsPc (pH 8,0), obtendo-se a configuração $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_n$, com número de bicamadas variando de $n = 1$ a 10 bicamadas. O mesmo procedimento foi adotado para obtenção do filme na configuração $(\text{CuTsPc}/\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$ ^[10].

2.2.3. Técnicas de Caracterização

2.2.3.1. Espectroscopia na região do UV-Vis

Medidas de espectroscopia de absorção na região UV-Vis foram utilizadas para caracterizar as soluções empregadas e monitorar o crescimento dos filmes. Foram estudados filmes com até 10 bicamadas de $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})$, e as medidas foram realizadas a cada bicamada. No monitoramento do crescimento dos filmes LbL foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis da marca Varian modelo Cary 50. As medidas foram realizadas de 200 a 800 nm de comprimento de onda no modo absorbância. Os filmes foram depositados sobre substratos de quartzo.

2.2.3.2. Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X (XPS)

A espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) é uma técnica de caracterização de superfícies de materiais. Esta técnica permite uma análise quantitativa, qualitativa e fornece informações a respeito da composição química da superfície e da natureza de ligação química. Esta foi desenvolvida por Kai Siegbahn nos anos 50 e baseia-se na aplicação do efeito fotoelétrico. Quando um feixe de raios X atinge a amostra, a energia do fóton incidente é absorvida por um elétron de uma camada mais interna do átomo. Se a energia do fóton, $h\nu$, for suficientemente alta esse elétron escapará do átomo e sendo emitido da superfície do material. O elétron emitido com energia cinética E_k é chamado de fotoelétron. Os espectros de XPS são obtidos através da irradiação da amostra com raios X de preferência monoenergético e análise da emissão de elétrons pela energia irradiação do material. Os átomos superficiais das amostras são excitados com fontes de raios X, geralmente produzidos pelas linhas principais do Mg K α (1253,6 eV) ou Al K α (1486,6 eV). Essas linhas são as mais intensas e freqüentemente as mais utilizadas, porque com essa energia é suficiente para excitar pelo menos um fotoelétron ao nível de caroço de praticamente quase todos os elementos da tabela periódica. A identificação dos elementos presentes na superfície é feita diretamente pela determinação das energias de ligações dos picos dos fotoelétrons de caroço. A intensidade (área integrada da linha de emissão fotoelétrica) é proporcional ao número de átomos no volume detectado, permitindo, portanto, obter informação sobre a composição da superfície. A posição exata de uma linha de emissão fotoelétrica indica o estado químico do átomo emissor. As energias de ligação dos níveis de caroço dos átomos são suficientemente afetadas pelo seu ambiente químico (ou seja, estado de oxidação, sítios de rede estrutura molecular, etc.) que provocam um deslocamento de 0,1 a 10 eV nas energias dos fotoelétrons ^[13,14].

Os diferentes filmes (CuTsPc/SiPy⁺Cl⁻) e (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc) foram analisados num espectrômetro de fotoelétrons de Raios-X SPECS PHOIBOS150 HSA3500 pertencente ao Instituto de Química da Unicamp, em Campinas. A fonte de raios-X com um ânodo de alumínio (linha K α , energia $h\nu$ = 1486,6 eV) foi operado a 10 kV e 15 mA e a energia do analisador utilizada foi de 40 eV. As energias de ligação foram referenciadas para a linha de C1s 284,6 eV.

2.2.3.3. Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR) e Raman

A interação entre os polieletrólitos pôde ser estudada por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR) e espectroscopia Raman. As medidas de FTIR foram realizadas num espectrômetro Shimadzu (Prestige 21), no modo transmissão, com 150 *scans* e resolução espectral de 2 cm^{-1} , obtendo-se espectros de pastilhas de KBr dos polieletrólitos e do filme automontado $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_{30}$ sobre substrato de silício.

As análises de espectroscopia Raman foram feitas num espectrômetro Bruker Senterra, equipado com um microscópio Olympus (BX51M com stage automático e micromizado) e objetiva de 50 X, permitindo uma resolução espectral de $0,05\text{ cm}^{-1}$. O sistema possui um microscópio, cuja finalidade é determinar a região de incidência do feixe de laser, neste caso, foi utilizado um laser de 532 nm. Para estas análises foram produzidos filmes *cast* dos polieletrólitos e automontado $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_{20}$, formados sobre substratos de vidro recoberto por ouro.

2.2.3.4. Microscopia de Força Atômica (AFM) e Perfilometria

As imagens de AFM foram obtidas do filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})$ contendo diferentes bicamadas, depositados sobre substrato de vidro, pelo modo não contato, em um equipamento Shimadzu SPM-9600. A partir da morfologia dos filmes foi possível obter a rugosidade média das superfícies.

Medidas de espessura do filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_n$ foram realizadas com um perfilômetro Veeco Dektak 150, disponível no laboratório de Dispositivos Nanoestruturados da professora Lucimara Stolz Roman do departamento de Física da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Para tal, um risco aleatório foi realizado sobre a superfície dos filmes com uma ponta de aço. A espessura de cada filme corresponde a média de 3 medidas obtidas no risco. Este equipamento possui uma ponta de diamante que percorre parte do substrato e do filme registrando o perfil de um em relação ao outro. O “desnível” entre filme e substrato, fornece a espessura do filme.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.3.1. Espectroscopia de absorção na Região do UV-Vis

A Figura 2.2 apresenta os espectros de UV-Vis do SiPy^+Cl^- e da CuTsPc em solução aquosa e do filme LbL contendo 10 bicamadas de $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$. Em solução, a CuTsPc apresenta duas bandas de absorção na região entre 300 e 800 nm, as quais são atribuídas às transições de orbital π HOMO (orbital molecular de mais alta energia ocupado) para o orbital π^* LUMO (orbital molecular de mais baixa energia desocupado) do anel conjugado do macrociclo. A primeira destas bandas é encontrada em aproximadamente 350 nm e é chamada de banda B ou Soret. A segunda banda é encontrada na região de 670 nm e é conhecida como banda Q. Esta banda sofre desdobramento gerando duas bandas uma em 697 nm relacionada às espécies monoméricas e outra geralmente mais intensa com absorbância em 605 nm, característica de espécies diméricas ^[15].

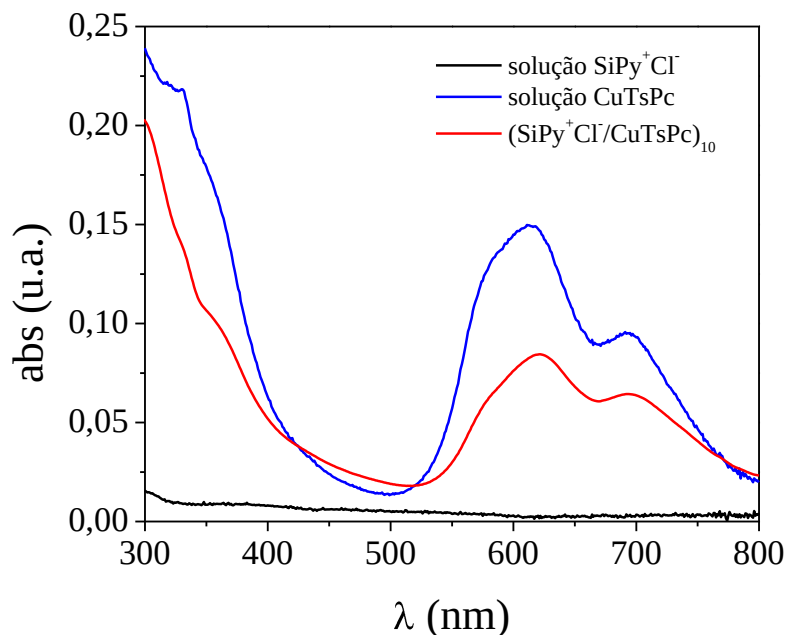


Figura 2.2: Espectros de UV-Vis da CuTsPc e do SiPy^+Cl^- em solução aquosa ($0,01 \text{ mg mL}^{-1}$) e na forma de filme LbL ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$)₁₀.

Os espectro do filme ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$)₁₀ possui características semelhantes ao da solução da CuTsPc com pico de absorção máximo localizado em 620 nm, que indica a predominância das espécies diméricas da ftalocianina e um ombro em 694 nm, que se

relaciona com as espécies monoméricas. Além disso, observou-se um deslocamento da banda relativa às espécies diméricas em comparação a mesma em solução, de aproximadamente 15 nm. Tais deslocamentos são provavelmente relacionados à interação da ftalocianina com o polícatión ^[10]. A intensa banda de absorção das espécies diméricas, tanto no filme quanto na solução, é uma evidência de que as moléculas de ftalocianina assumem preferencialmente esta forma ^[16,17].

O crescimento do filme LbL foi monitorado por espectroscopia de absorção no UV-Vis, cujos espectros são mostrados na Figura 2.3 para $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_n$.

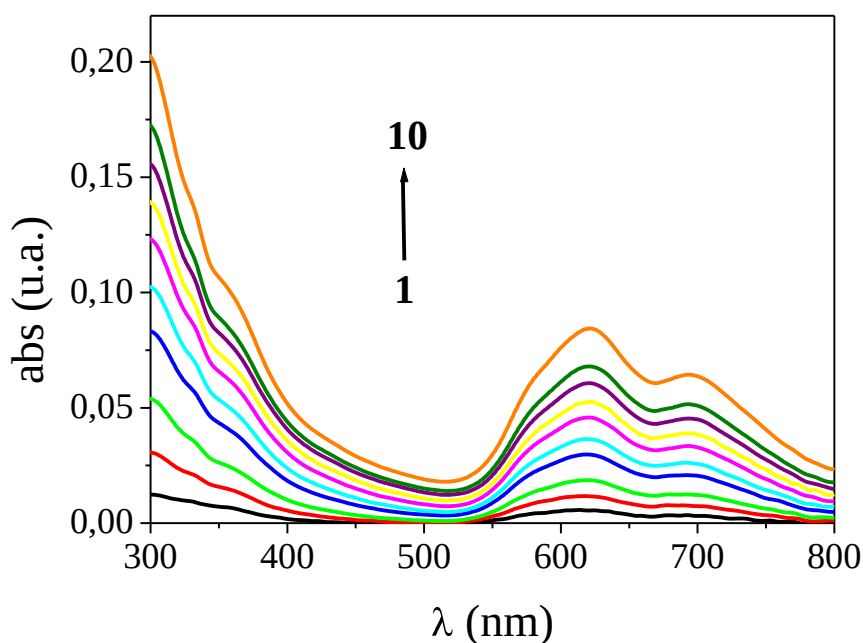


Figura 2.3: Espectros de UV-Vis para o filme LbL $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_n$ sobre quartzo, com n variando de 1 a 10.

A fim de verificar a relação entre a absorbância e o número de bicamadas e acompanhar o crescimento dos filmes, utilizou-se o método da deconvolução dos espectros. A Figura 2.4 mostra os espectros de UV-Vis a partir da deconvolução das Bandas Q.

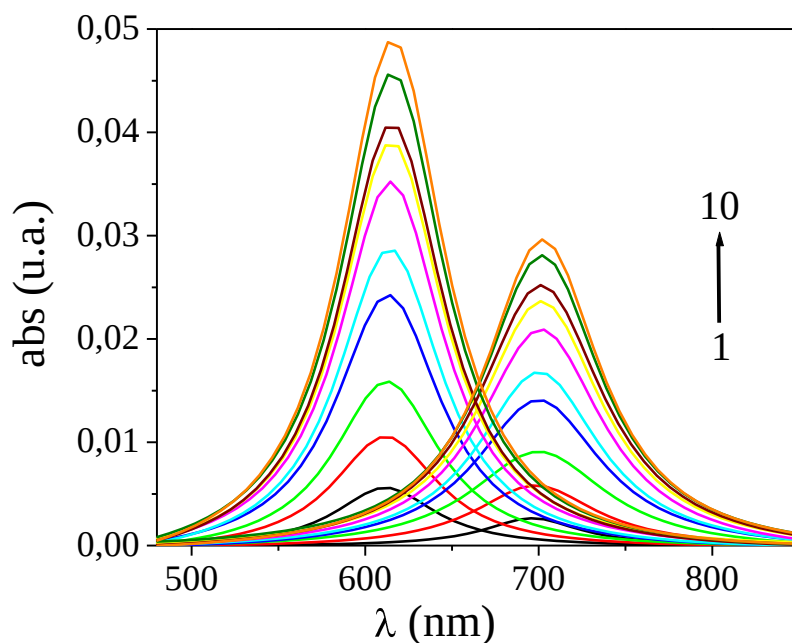


Figura 2.4: Deconcolução dos espectros de UV-Vis para as bandas Q do filme LbL ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$), contendo diferentes bicamadas.

Uma relação linear foi obtida da absorbância em 620 e 694 nm com as bicamadas depositadas com $R = 0,994$ e $0,993$, como indicado na Figura 2.5. Isto significa que uma quantidade semelhante de material é adsorvida para o substrato a cada bicamada depositada, assegurando esse crescimento uniforme dos filmes ^[16,17]. O mesmo perfil foi observado para a configuração inversa do filme $(\text{CuTsPc}/\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_n$, o qual também apresentou um crescimento linear com o número de bicamadas ($R = 0,991$).

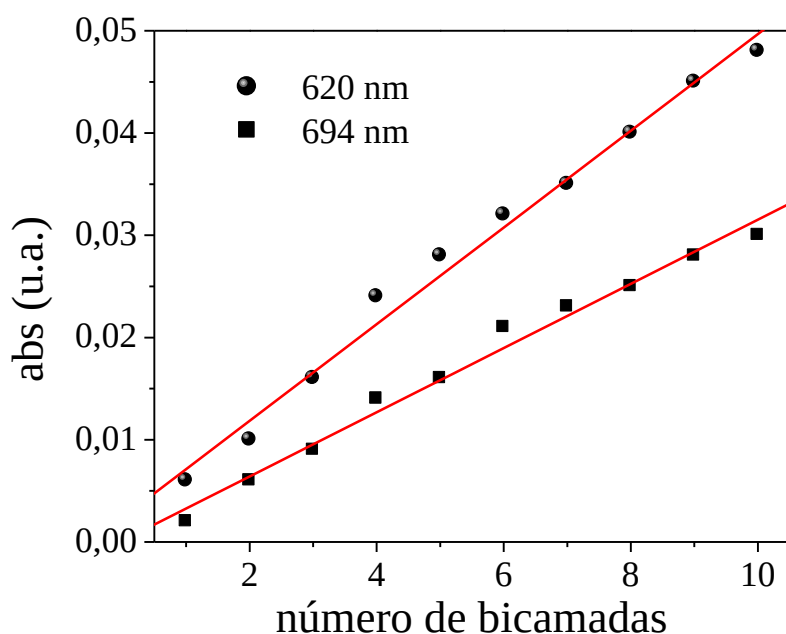


Figura 2.5: Relação entre o valor da absorvância do filme em 620 e 694 nm para os diferentes números de bicamadas.

Cabe ressaltar que as bandas do espectro eletrônico do dímero prevalecem sobre a do monômero (banda Q) no filme ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$). Segundo Lvov ^[18], transições eletrônicas na faixa de 610-630 nm podem estar reacionadas a formação de agregados, devido ao acoplamento extensivo do sistema de elétrons π dos anéis adjacentes. Outro fator pode estar relacionado às interações associativas hidrofóbicas entre os anéis, devido à planaridade das moléculas e do elevado grau de conjugação eletrônica ^[19]. Verifica-se que no filme ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$) que as espécies diméricas estão em maior concentração do que as espécies monoméricas. A fim de facilitar esta observação, fez-se o cálculo das intensidades de absorção relativa entre o dímero e monômero ($I_{\text{dim}}/I_{\text{mon}}$). Para o filme contendo uma bicamada, a relação I_{620}/I_{696} é igual a 3,0, enquanto que para os filmes contendo maiores número de bicamadas, a relação I_{620}/I_{696} inicia-se em 1,6 para a segunda bicamada e aumenta até 1,7, permanecendo constante até 10 bicamadas. Podemos observar que na primeira bicamada as espécies diméricas prevalem significativamente sobre as monoméricas. No entanto, a partir da segunda bicamada esta diferença diminui, permanecendo-se constante. Este fato sugere que as CuTsPc imobilizadas nos filmes LbL, encontram-se em um melhor estado organizacional, que pode ser atribuído provavelmente à estabilização entre os grupos SO_3^- (CuTsPc) e o anel pirídineo (SiPy^+Cl^-).

2.3.2. Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios-X

A espectroscopia de raios-X de fotoelétrons foi empregada para identificar a composição elementar dos diferentes filmes $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_5$ e $(\text{CuTsPc}/\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_5$. A Figura 2.6 mostra os espectros exploratórios de XPS para o filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_5$, sendo que a arquitetura teve início com SiPy^+Cl^- , produzido sobre FTO.

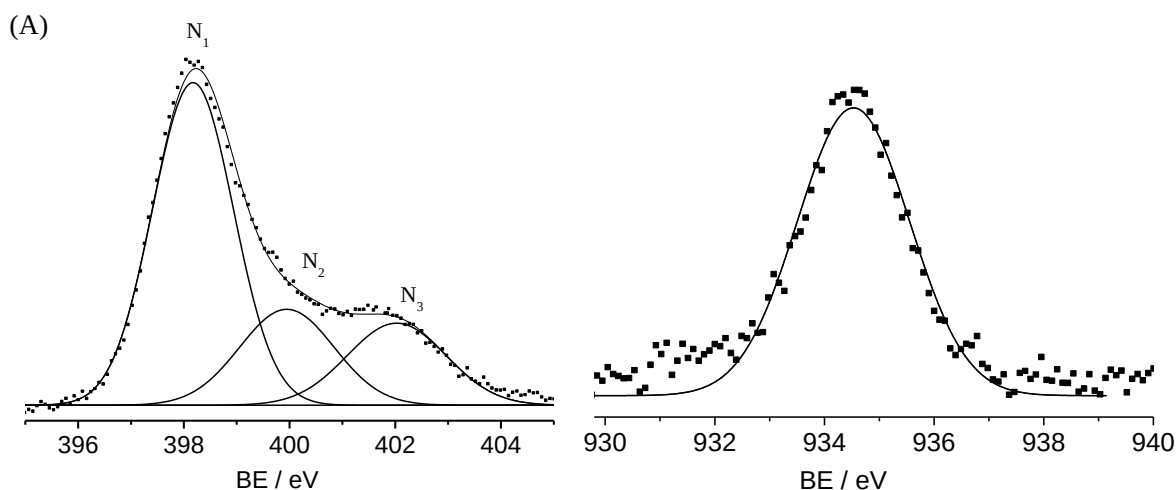


Figura 2.6: Picos da energia de ligação de XPS: (A) N1s: N1, N2 e N3 da CuTsPc^{4-} e dos íons piridínios no filme e (B) $\text{Cu}2p_{3/2}$.

No espectro de XPS, foram observados os três tipos de átomos de nitrogênio (N1 ligado diretamente ao átomo de Cu; N2 do anel pirrólico e o N3 do íon piridínio). Comprovou-se a imobilização da CuTsPc no filme, em virtude do pico associado ao N1s, após a deconvolução em 398,2 e 398,0 eV atribuídos ao átomo de nitrogênio N2 (C=N-C) e 399,8 e 399,9 eV atribuídos ao nitrogênio N1 (C-N-Cu) do macrociclo^[20,21]. O terceiro sinal referente ao N1s (N3) em 402,0 e 401,7 eV confirma a presença do SiPy^+Cl^- no filme, pois este sinal é atribuído ao íon piridínio ($-\text{N}^+\text{C}$)^[22]. A Figura 2.7 mostra os átomos de nitrogênio envolvidos.

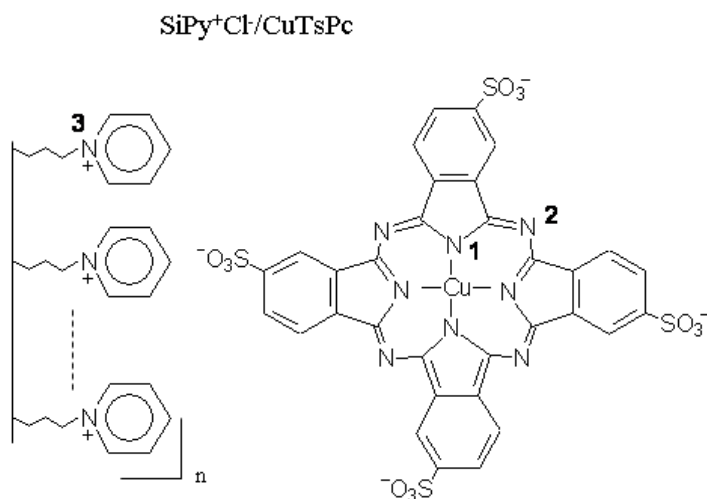


Figura 2.7: Representação da interação do filme LbL SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc.

O pico Cu2p_{3/2} referente ao Cu(II) é observado em 934,5 e 934,0 eV para os filmes (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₅ e (CuTsPc/SiPy⁺Cl⁻)₅, respectivamente (Figura 2.5 B). Outros dois picos de interesse são listados na Tabela 2.1, Si2p em 103,3 eV atribuídos ao átomo de Si ligado a cadeia de *n*-propil (O-Si(CH₂)₃Py⁺) e o de O1s atribuído ao átomo de O ligado ao S nos grupos sulfônicos da CuTsPC (-SO³⁻), e a um átomo de Si do *n*-propil. A Tabela 2.1 sintetiza os valores de energia de ligação dos átomos de interesse.

Tabela 2.1: Valores de energia de ligação (BE) de FTO/5 bicamadas

FTO/5 bicamadas	O1s		Si2p	C1s		N1s			Cu2p _{3/2}
						N1	N2	N3	
(SiPy ⁺) _m CuTsPc ⁴⁻ _n	530,4 (2,4) [4]	532,8 (2,5) [96]	103,3 (2,3)	284,6 (2,3) [84]	286,6 (2,3) [16]	398,2 (1,8) [60]	399,9 (2,1) [21]	402,0 (2,2) [19]	934,5 (2,4)
CuTsPc ⁴⁻ _n (SiPy ⁺) _m	530,2 (2,1) [4]	532,1 (2,3) [96]	102,8 (2,3)	284,6 (2,3) [90]	286,8 (2,3) [10]	398,0 (2,0) [54]	399,8 (2,2) [24]	401,7 (2,2) [22]	934,0 (2,4)

entre parênteses: largura total em meia-máxima (eV); entre colchetes: áreas relativas.

Comparando-se as porcentagens atômicas de Cu/N_{total} em cada tipo de filme (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₅ e (CuTsPc/SiPy⁺Cl⁻)₅, constata-se características importantes. No caso

do filme que teve sua arquitetura iniciada com SiPy^+Cl^- , nota-se uma queda brusca nestas porcentagens, passando de 0,14% no filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_5$ para 0,036% $(\text{CuTsPc}/\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_5$. Esta considerável diminuição observada para $\text{Cu}/\text{N}_{\text{total}}$, confirma que o polícatión SiPy^+Cl^- no filme $(\text{CuTsPc}/\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_5$ realmente encontra-se na última camada. Tal constatação pode ser explicada pela profundidade da sonda da técnica de XPS de 0,5 nm, a qual permite a análise das camadas superficiais do filme.

2.3.3. Espectroscopia de absorção no Infravermelho e Raman

As interações entre a CuTsPc e SiPy^+Cl^- nos filmes LbL foram investigadas a partir de medidas de FTIR, cujos espectros são mostrados na Figura 2.8. O SiPy^+Cl^- apresenta bandas em 1488 e 1634 cm^{-1} , referentes ao anel piridínio, em 1087 cm^{-1} ($\nu\text{ Si-O-Si}_{\text{ass}}$), 774 cm^{-1} ($\nu\text{ Si-O-Si}_{\text{sim}}$) e em 457 cm^{-1} ($\nu\text{ Si-O-Si}_{\text{sim}}$)^[23]. A CuTsPc exibe suas principais bandas em 772 cm^{-1} (respiração anel), 948 cm^{-1} (Cu-Pc), 1039 cm^{-1} ($\nu\text{ SO}_3$), 1333 cm^{-1} ($\nu\text{ C=N}$), 1421 e 1462 cm^{-1} ($\nu\text{ iso-indol}$) e em 1611 cm^{-1} ($\nu\text{ C=C}$ do anel benzeno)^[10Erro! Indicador não definido.,15]. Observa-se na Figura 2.8, que para o filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_{30}$ existe a predominância das bandas relativas a CuTsPc, fato observado em diversos trabalhos com metaloftalocianinas^[16,17]. Entretanto, uma nova banda em 460 cm^{-1} no do filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_{30}$ é observada. Esta pode estar relacionada ao $\nu\text{ Si-O-Si}_{\text{sim}}$, presente em 457 cm^{-1} no espectro do polícatión. Foi também observado que a banda referente ao estiramento SO_3^- localizada em 1039 cm^{-1} para CuTsPc sofreu um deslocamento no espectro do filme automontado para 1033 cm^{-1} . Tal deslocamento para comprimentos de onda menores evidencia a interação dos grupos sulfônicos SO_3^- da metaloftalocianina com grupos protonados do anel piridínio do SiPy^+Cl^- . Estas interações são resultantes da arquitetura do filme LbL, a qual promove um contato entre os polieletrólitos através da chamada interpenetração das camadas. Este resultado corrobora com que já havia sido observado na literatura para sistemas contendo ftalocianinas^[16,17]. Resultados semelhantes foram obtidos para o filme automontado entre quitosa e ftalocianina tetrassufonada de ferro (QFeTsPc), onde os espectros para os filmes automontados apresentaram deslocamento da banda em 1033 cm^{-1} (atribuída ao estiramento dos grupos sulfônicos (SO_3^-) das metaloftalocianinas tetrassulfonadas) do espectro da pastilha de KBr de FeTsPc para 1027 cm^{-1} no filme. Tal deslocamento se deve a interações iônicas entre os grupos sulfônicos (SO_3^-) da FeTsPc com grupos protonados amina da quitosana (NH_3^+)^[17].

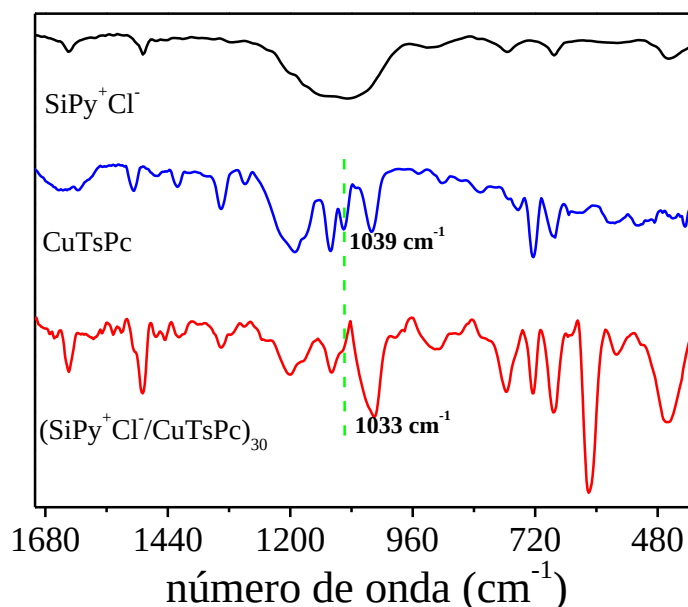


Figura 2.8: Espectros em modo transmissão para os polieletrólitos CuTsPc, SiPy⁺Cl⁻ e para o filme (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₃₀.

Complementarmente às análises por FTIR, investigou-se as interações moleculares entre o SiPy⁺Cl⁻ e a CuTsPc por Espectroscopia Raman. Os espectros Raman (Figura 2.9) para filme *cast* dos polieletrólitos e para o filme LbL (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂₀ diferem em termos de intensidade das bandas atribuídas a CuTsPc, já que as bandas relativas ao SiPy⁺Cl⁻ em 648 cm⁻¹ (deformação no plano do anel) e 1028 cm⁻¹ (respiração do anel piridínio) ^[23] não puderam ser facilmente visualizadas nos espectros dos filmes, uma vez que o sinal Raman da ftalocianinas é bem superior ao do polieletrólito. Comparando os espectros da CuTsPc e do filme (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂₀ na Figura 2.9, aparentemente não há nenhuma mudança nas posições das bandas, mas um exame mais cuidadoso revela pequenas alterações. Estas alterações podem ser observadas na região dos estiramentos *iso*-indol (953, 1342 e 1530 cm⁻¹) e dos grupos sulfônicos (1186 e 1142 cm⁻¹), os quais se deslocam para menores números de onda 950, 1340 e 1526 cm⁻¹ (ν *iso*indol) e 1183 e 1140 cm⁻¹ (ν SO₃) no espectro do filmes (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂₀ ^[16,24,25]. Tais mudanças, embora pequenas, podem estar relacionadas à interação entre a ftalocianina e o polication.

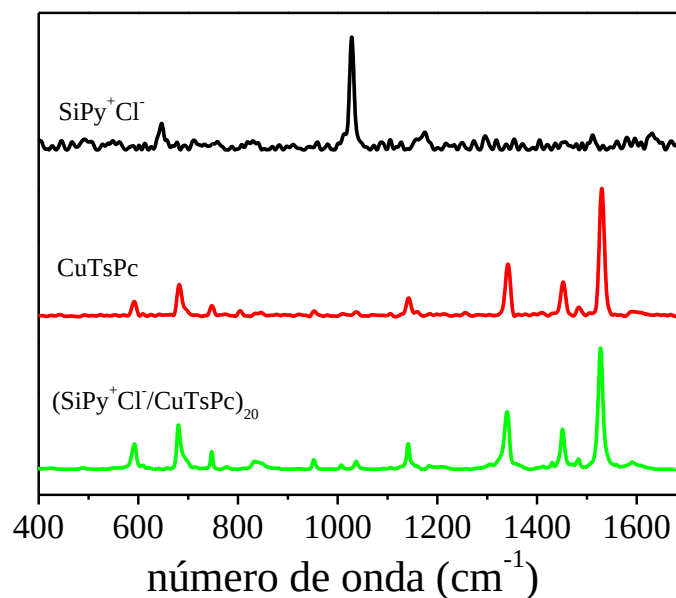


Figura 2.9: Espectros Raman para os polieletrólitos CuTsPc, SiPy⁺Cl⁻ e para o filme (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂₀, em substratos de Au.

2.3.4. Análise morfológica por microscopia de força atômica (AFM) e Perfilometria

A técnica de AFM pode fornecer informações detalhadas sobre a morfologia e a homogeneidade da superfície do filme depositado. A Figura 2.10 mostra as imagens obtidas para os filmes (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc) com diferentes números de bicamadas, sobre substrato de FTO e estes foram caracterizados através da rugosidade média quadrática (R_q).

Observa-se que em geral, a análise da topografia da superfície do filme em comparação ao substrato de FTO é uniforme, no entanto uma análise mais detalhada revela que com o aumento do número de bicamadas há o surgimento de novos aglomerados.

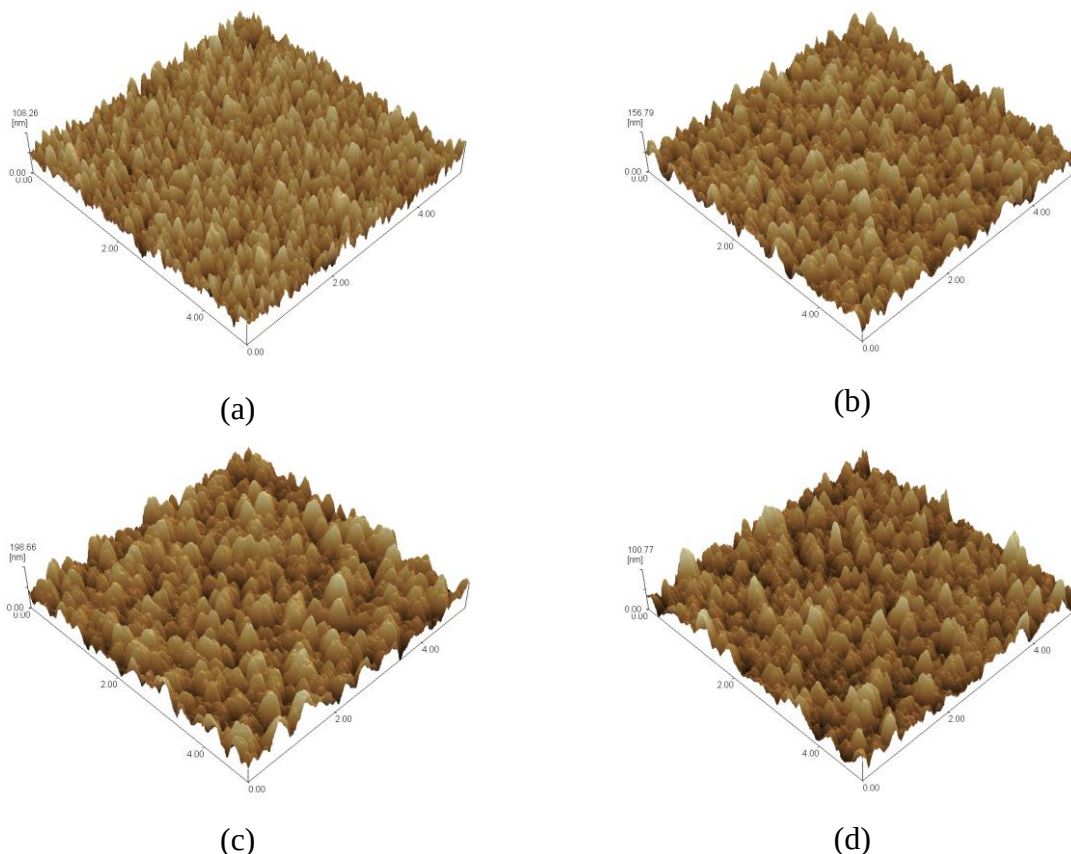


Figura 2.10: Imagens de microscopia de força atômica para o substrato (a) FTO e para o filme $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$ com (b) 2 bicamadas, (c) 6 bicamadas, (d) 10 bicamadas.

Os dados da Figura 2.11, indicam que há um aumento da R_q (não linear) até 6 bicamadas, a qual diminui significativamente para o filme de 8 bicamadas. Tal comportamento pode estar relacionado com a deposição das primeiras moléculas que se depositam sobre os grãos e os vales presentes na superfície do óxido, preenchendo inicialmente estes “buracos”. A medida que o número de bicamadas aumenta há o surgimento de aglomerados de diversos tamanhos os quais contribuem para o aumento da rugosidade dos filmes. A partir de 8 bicamadas a rugosidade diminui, pois com o aumento do número de bicamadas, todos os vales vão sendo preenchidos, contribuindo para que a rugosidade diminua. Estes resultados corroboram com a literatura para sistemas contendo ftalocianinas [26,27]. Medidas da espessura dos filmes utilizando-se a técnica de perfilometria revelaram um aumento proporcional da espessura com o número de bicamadas, corroborando com os dados de UV-Vis que mostram um aumento da absorbância em função das bicamadas, mostrando que a cada bicamada depositada há um acréscimo de material adsorvido no filme.

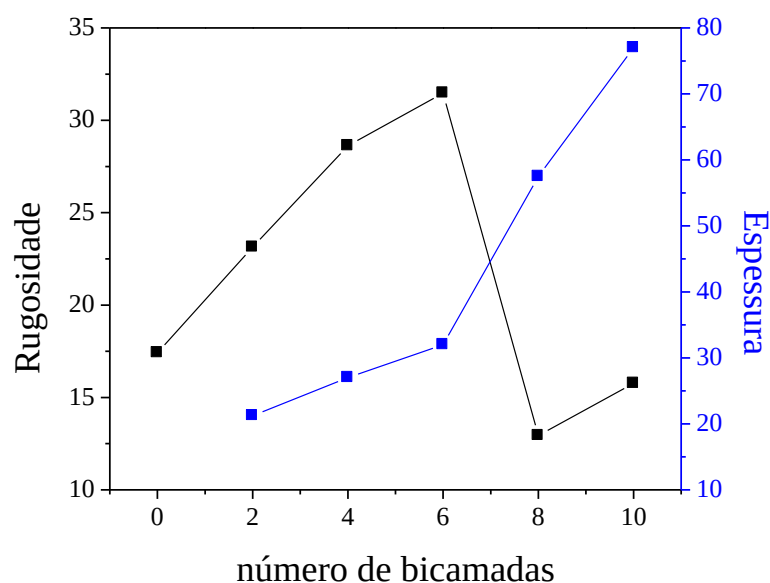


Figura 2.11: Rugosidade média e espessura dos filmes automontados de $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_n$.

2.4. CONCLUSÕES PARCIAIS

Resultados de UV-Vis mostraram que os filmes LbL de $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})$ são formados e que a adsorção de ftalocianina ocorre de maneira linear com o número de bicamadas. Verificou-se também a predominância da estruturação agregada para as moléculas de CuTsPc nos espectros dos filmes. Dados de XPS demonstraram que a interação responsável pela sustentação dos filmes entre o polieletrólito cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano juntamente a ftalocianina tetrassulfonada de cobre sob substrato sólido ocorre entre os grupos sulfônicos e o anel piridínico. Estes resultados são reafirmados com os espectros de FTIR e Raman, que evidenciam que a banda em 1039 cm^{-1} , associada à vibração dos grupos sulfônicos, exibiu um deslocamento para 1033 cm^{-1} , o que é uma evidência de que este grupamento químico interage com os polications através da atração eletrostática. A microscopia de força atômica mostrou diferentes regiões morfológicas na superfície dos filmes e a rugosidade das superfícies dos filmes tende a aumentar até um limite com o número de bicamadas depois diminui significativamente. Em contra partida, a espessura média dos filmes aumentou em função do aumento destas, mais uma vez corroborando com os dados obtidos pela técnica de UV-Vis, de que a cada nova deposição, uma nova quantidade de material é depositado. Devido a grande reprodutibilidade dos filmes e estabilidade das bicamadas atribuída às fortes interações entre os polieletrólitos, além das propriedades

eletrocatalíticas exibidas pelas ftalocianinas, tornam estes sistemas de filmes promissores para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos.

2.5. REFERÊNCIAS

- [1] BANEY, R.H.; ITOH, M.; SAKAKIBARA, A.; SUZUKIT, T. Silsesquioxanes. **Chemical Reviews**. v. 95, p. 1409-1430, 1995.
- [2] ARENAS, L.T.; SIMON, N.M.; GUSHIKEM, Y.; COSTA, T.M.H.; LIMA1, E.C.; BENVENUTTI, E.V. A water soluble 3-n-propyl-1-azonia-4-azabicyclo[2.2.2]octanechloride silsesquioxane grafted onto Al/SiO₂ surface. Chromium adsorption study. **Eclética Química**. v. 31, p. 53-58, 2006.
- [3] MAGOSSO, H.A.; FATTORI, N.; ARENAS, L.T.; GUSHIKEM, Y. New promising composite materials useful in the adsorption of Cu(II) in ethanol based on cellulose and cellulose acetate. **Cellulose**. v. 19, p. 913-923, 2012.
- [4] CARMO, D.R. do; PAIM, L.L.; METZKER, G.; DIAS FILHO, N.L.; STRADIOTTO, N.R. A novel nanostructured composite formed by interaction of copper octa(3-aminopropyl)octasilsesquioxane with azide ligands: Preparation, characterization and a voltammetric application. **Materials Research Bulletin**. v. 45, p. 1263-1270, 2010.
- [5] CARMO, D.R. do; PAIM, L.L.; SILVESTRINI, D.R.; DE SÁ, A.C.; BICALHO, U.O.; STRADIOTTO, N.R. Voltammetric Behavior of a Modified Electrode With Azide Copper Octa(3-Aminopropyl)Octasilsesquioxane Composite in the Oxidation of Ascorbic Acid. **International Journal of Electrochemical Science**. v. 6, p. 1175-1188, 2011.
- [6] FUJIWARA, T.S.; PESSOA, C.A.; GUSHIKEM, Y. Hexacyanoferrate ion adsorbed on propylpyridiniumsilsesquioxane polymer film-coated SiO₂/Al₂O₃: use in an electrochemical oxidation study of cysteine. **Electrochimica Acta**. v. 48, p. 3625-3631, 2003.
- [7] FUJIWARA, T.S.; 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.
- [8] 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. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 11, p. 281-285, 2000.
- [9] SANTOS, V. dos; JESUS, C.G.; SANTOS, M. dos; CANESTRARO, C.D.; ZUCOLOTO, V.; FUJIWARA, S.T.; GARCIA, J.R.; PESSOA, C.A.; WOHNATH, K. Platinum nanoparticles incorporated in silsesquioxane for use in LbL films for the simultaneous detection of dopamine and ascorbic acid. **Journal of Nanoparticle Research**. v. 14, p. 1081-1091, 2012.

- [10] JESUS, C.G.; SANTOS, V. dos; CANESTRARO, C.D.; ZUCOLOOTTO, V.; FUJIWARA, S.T.; GARCIA, GUSHIKEM, Y.; WOHNATH, K.; PESSOA, C.A. Silsesquioxane as a New Building Block Material for Modified Electrodes Fabrication and Application as Neurotransmitters Sensors. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v. 11, p. 3499-3508, 2011.
- [11] GUSHIKEM, Y.; ALFAYA, R.V.S.; ALFAYA, A.A.S. Braz. Pat., INPI 9803053-1, 1998.
- [12] KIM, J.S.; GRANSTRÖM, M.; FRIEND, R.H.; JOHANSSON, N.; SALANECK, W.R. Indium-tin oxide treatments for single- and double-layer polymeric lightemitting diodes: The relation between the anode physical, chemical, and morphological properties and the device performance. **Journal of Applied Physics**. v. 84, p. 6859-6870, 1998.
- [13] NASCENTE, P.A.P. Análise de Superfície por Espectroscopia de Elétrons. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**. v.17, p.17-22, 1998.
- [14] BRUNDLE, C.R.; EVANS JR, C.A.; WILSON, S. **Encyclopedia of Materials Characterization: Surfaces, Interfaces, Thin Films**. Butxetworch-Heinemann, 1992.
- [15] LEZNOFF, C.C.; LEVER, A.B.P. **Phthalocyanines-Properties and Applications**, v.1, John Wiley & Sons, Inc, 1989.
- [16] ZUCOLOOTTO, V.; FERREIRA, M.; CORDEIRO, M.R.; CONSTANTINO, C.J.L.; BALOGH, D.T.; ZANATTA, A.R.; MOREIRA, W.C.; OLIVEIRA Jr., O.N. Unusual Interactions Binding Iron Tetrasulfonated Phthalocyanine and Poly(allylamine hydrochloride) in Layer-by-Layer Films. **The Journal of Physical Chemistry B**. v. 107, p. 3733-3737, 2003.
- [17] SIQUEIRA Jr, J.R. GASPAROTTO, L.H.S.; CRESPILO, F.N.; CARVALHO, A.J.F.; ZUCOLOOTTO, V.; OLIVEIRA Jr., O.N. Physicochemical Properties and Sensing Ability of Metallophthalocyanines/Chitosan Nanocomposites. **The Journal of Physical Chemistry B**. v. 110, p. 22690-22694, 2006.
- [18] LVOV, Y.M.; KAMAU, G.N.; ZHOU, D.; RUSLING, J.F. Assembly of Electroactive Ordered Multilayer Films of Cobalt Phthalocyanine Tetrasulfonate and Polycations. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 212, p. 570-575, 1999.
- [19] TOMA, H.E.; BONIFÁCIO, L.S.; ANAISSI, F.J. Da cor à cor inexistente: uma reflexão sobre espectros eletrônicos e efeitos cromáticos. **Química Nova**. v. 28, p. 897-900, 2005.
- [20] OUEDRAOGO, G.V.; BENLIAN, D.; PORTE, L. X-ray photoelectron spectroscopy of phthalocyanine Compounds. **Journal of Chemical Physics**. v. 73, p. 642-647, 1980.
- [21] AHLUND, J.; NILSON, K.; SCHIESSLING, J.; KJELDGAARD, L.; BERNER, S.; MARTENSSON, N.; PUGLIAB, C. The electronic structure of iron phthalocyanine probed by photoelectron and x-ray absorption spectroscopies and density functional theory calculations. **Journal of Chemical Physics**. v. 125, p. 34709-34715, 2006.

- [22] WALKER, J.D.; TANNENBAUM, R. Characterization of the Sol-Gel Formation of Iron(III) Oxide/Hydroxide Nanonetworks from Weak Base Molecules. **Chemistry of Materials**. v. 18, p. 4793-4801, 2006.
- [23] ALFAYA, R.V.S. Filmes finos do cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano. **Preparação, caracterização e aplicações**. Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas-SP, 2000.
- [24] ALESSIO, P.; MENDEZ, M.L.R., SAEZ, J.A.S.; CONSTANTINO, C.J.L. Iron phthalocyanine in non-aqueous medium forming layer-by-layer films: growth mechanism, molecular architecture and applications. **Physical Chemistry Chemical Physics**. v. 12, p.3972-3983, 2010.
- [25] GAFFO, L; CONSTANTINO, C.J.L; MOREIRA, W.C; AROCA, R.F.; OLIVEIRA Jr, O.N. Vibrational spectra and surface-enhanced resonance Raman scattering of palladium phthalocyanine evaporated films. **Journal of Raman Spectroscopy**. v. 33, p. 833-837, 2002.
- [26] SHINBO, K.; ONISHI, K.; MIYABAYASHI, S.; TAKAHASHI, K.; KATAGIRI, S.; KATO, K.; KANEKO, F.; ADVINCULA, R.C. Fabrication and electrochemical properties of layer-by-layer deposited films containing phthalocyanine dyes. **Thin Solid Films**. v. 438-439, p. 177-181, 2003.
- [27] LI, D.; LUTT, M.; FITZSIMMONS, M.R.; SYNOWICKI, R.; HAWLEY, M.E.; BROWN, G.W. Preparation, Characterization, and Properties of Mixed Organic and Polymeric Self-Assembled Multilayers. **Journal of the American Chemical Society**. v. 120, p. 8797-8804, 1998.

3.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os anti-histamínicos são os medicamentos mais comumente utilizados no tratamento de alergias. Historicamente, os benzodioxanos (**A**), derivados éteres de etanolaminas, estão entre os primeiros fármacos a serem empregados como anti-histamínicos ^[1]. Sobre a estrutura química de (**A**) foram introduzidas várias modificações que conduziram a novos éteres de etanolaminas acíclicas. (**B**), os quais por sua vez deram origem aos derivados etilenodiaminas (**C**), através da substituição isostérica do átomo de oxigênio pelo de nitrogênio. Posteriormente, novas modificações moleculares incorporaram os derivados etilenodiaminas, entre eles (**C**), ao átomo de nitrogênio do núcleo fenotiazínico, dando origem à dietazina (**D**). Estes novos derivados, além de apresentarem atividade anti-histamínica, também demonstraram um forte efeito sedante, tornando seu uso mais adequado no tratamento da doença de Parkinson. O cloridrato de prometazina (cloridrato de N,N-dimetil-1-fenotiazina-10-il-propan-2-amina), pertence aos grupos dos fenotiazínicos, é um composto farmacêutico amplamente utilizado por apresentar atividade anti-histamínica, sedativa, antipsicótica e propriedades analgésicas ^[2,3,4,5]. A estrutura química do isômero de prometazina (**E**) é mostrado na Figura 3.1.

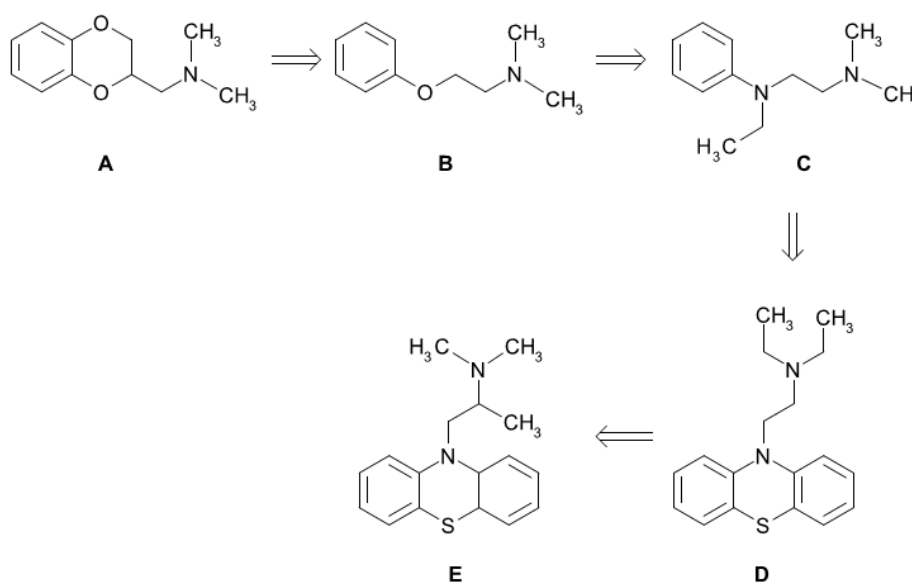


Figura 3.1: Evolução dos compostos anti-histamínicos.

Além de seu perfil anti-histamínico, a prometazina também possui habilidade de prolongar o sono induzido por barbitúricos, sendo seu emprego terapêuticamente útil na

anestesia clínica ^[1]. No entanto, o cloridrato de prometazina (PMZ) pode causar efeitos adversos no ser humano, tais como, alterações no sistema endócrino e alterações cardíacas. Fundamentado nisto, a sua determinação em formulações comerciais é de extrema importância.

Inúmeras técnicas foram empregadas para determinação deste composto em formulações farmacêuticas, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência ^[6,7], eletroforese capilar ^[4] e espectrofotometria aliada a injeção de fluxo ^[8,9,10]. A sensibilidade alcançada por todos estes procedimentos é muito satisfatória para a quantificação analítica de compostos farmacêuticos. Todavia, em alguns casos, é necessário um pré-tratamento da amostra antes da quantificação. Neste contexto, as técnicas eletroanalíticas têm-se revelado excelentes alternativas para a determinação deste e de outros compostos farmacêuticos, uma vez que são simples, apresentam baixo custo e tempo relativamente curto nas análises ^[11]. No que diz respeito à avaliação do comportamento eletroquímico e quantificação de cloridrato de prometazina por técnicas eletroquímicas, várias superfícies eletródicas como carbono vítreo ^[2,12,13], ouro revestido com grafite em pó ^[3], ouro ^[8] e eletrodo modificado com ácido desoxirribonucléico ^[14,15] já foram utilizados como eletrodos de trabalho. Porém, nenhum trabalho é reportado na literatura sobre a aplicação de filmes automontados pela técnica LbL para determinação deste anti-histamínico.

Este capítulo, versa sobre a utilização do filme nanoestruturado de (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₅, no desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para determinação de cloridrato de prometazina em formulações farmacêuticas aliada a técnica eletroquímica de voltametria de onda quadrada (VOQ).

3.2. PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1. Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica (PA) e as soluções foram preparadas utilizando água purificada em sistema Milli-Q da Millipore[®]. Para as medidas eletroquímicas, o eletrólito suporte utilizado foi o tampão Britton Robinson 0,04 mol L⁻¹ preparado a partir das misturas dos ácidos acético (0,04 mol L⁻¹), fosfórico (0,04 mol L⁻¹) e bórico (0,04 mol L⁻¹). Os valores de pH das soluções tampão para os experimentos foram

ajustados com uma solução de NaOH 0,2 mol L⁻¹. As soluções de PMZ 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ (grau USP - *United States Pharmacopoeia*) foram preparadas imediatamente antes do uso, pesando-se uma quantidade adequada do sal e solubilização em água ultra-pura. A solução foi mantida sob abrigo de luz e mantida sob refrigeração.

3.2.2. Amostras comerciais analisadas

As amostras comerciais do medicamento contendo cloridrato de prometazina, nas apresentações injetável, gotas e comprimido, foram obtidas em farmácias locais. Foram analisadas amostras de Fenegan[®] injetável e comprimidos, fabricados pela *Sanofi aventis*, com valor nominal de 50 mg de PMZ por ampola de 2 mL e 25 mg de PMZ por comprimido, respectivamente. As soluções das amostras na concentração de 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ foram preparadas pela dissolução do medicamento em água ultra-pura. Para a formulação Lisador[®] gotas e comprimidos, o mesmo procedimento foi adotado.

3.2.3. Medidas eletroquímicas

Os estudos eletroquímicos foram realizados utilizando-se potenciostato modelo PGSTAT30 (Autolab), e o software GPES-4 para aquisição e tratamento de dados. As medidas voltamétricas foram realizadas em uma célula eletroquímica convencional com três eletrodos: eletrodo de referência de Ag/AgCl, fio de Pt como eletrodo auxiliar e substrato contendo o filme LbL contendo cinco bicamadas (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₅ como eletrodo de trabalho (com 1 cm² de área). Para confirmar a eficiência do filme como sensor eletroquímico para PMZ foram realizados estudos voltamétricos com o substrato de FTO, filmes tipo *cast* de SiPy⁺Cl⁻ e CuTsPc e com filme automontado contendo cinco bicamadas (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₅. O comportamento eletroquímico da PMZ sobre o eletrodo de trabalho (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₅ foi investigado na faixa de pH entre 3,0 e 7,0 utilizando a técnica de Voltametria de Onda Quadrada (VOQ). Os parâmetros da VOQ, frequência de aplicação de pulso de potencial (*f*) (10 a 300 s⁻¹), amplitude do pulso de potencial (*a*) (5 a 80 mV) e incremento de potencial (ΔE_s) (1 a 7 mV), foram otimizados a fim de se obter maior sensibilidade. A otimização foi realizada avaliando-se a intensidade da corrente de pico e o perfil voltamétrico, obtidos em função da variação de cada parâmetro separadamente.

Após esta etapa, curvas analíticas foram obtidas pela adição de alíquotas de 40 µL de uma solução estoque de PMZ $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. O desvio padrão do intercepto das curvas analíticas (Sb) e a inclinação da reta da curva analítica estatística (s) foram empregados para calcular os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), usando as equações $LD=3 \text{ Sb/s}$ e $LQ=10 \text{ Sb/s}$ recomendadas pela ANVISA. A precisão e a exatidão da metodologia desenvolvida foram avaliadas por meio de experimentos de repetibilidade envolvendo dez medidas voltamétricas sucessivas de uma solução de PMZ $7,94 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ realizadas no mesmo dia e a reprodutibilidade obtendo-se cinco medidas em dias diferentes na mesma concentração de PMZ. A partir dos dados obtidos foi calculado o desvio padrão relativo (RSD %).

Para avaliar a eficiência da metodologia proposta, foram realizados testes de recuperação em eletrólito de suporte e em formulações comerciais (Fenergan® e Lisador®) nas apresentações comprimido, gotas e injetável. A recuperação é definida como a proporção da quantidade do analito de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraído e passível de ser quantificado [16]. O método de adição de padrão foi empregado, para isso, quantidades conhecidas do analito são adicionadas a uma amostra desconhecida e a partir do aumento do sinal analítico é deduzido quanto deste analito estava presente na amostra original. A taxa de recuperação foi avaliada utilizando-se o método gráfico, onde o eixo X forneceu a concentração de padrão adicionado ao eletrólito e a extrapolação neste eixo mostrou a concentração desconhecida. O valor da recuperação foi calculado de acordo com a seguinte equação 3.1:

$$\%R = \frac{[PMZ]_{recuperada}}{[PMZ]_{adicionada}} \times 100 \quad (3.1)$$

A formulação Lisador® gotas e comprimidos foi utilizada a fim de se avaliar a influência de interferentes da indústria farmacêutica sobre o procedimento proposto, já que esta além de PMZ possui dipirona, cloridrato de adifenina e uma concentração indeterminada de propilenoglicol.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Comportamento eletroquímico do cloridrato de prometazina

O comportamento eletroquímico do cloridrato de prometazina, bem como a quantificação desse fármaco tem sido avaliado em diversas superfícies eletródicas, como ouro [8], carbono vítreo [2,13], pó de grafite [17], diamante dopado com boro [18], incluindo eletrodos modificados [14,15]. A determinação de PMZ em sistemas eletroquímicos apresenta limitações em função dos processos de adsorção dos reagentes da solução ou dos produtos da reação eletroquímica na superfície do eletrodo, porém todos o trabalhos descritos na literatura [2,8,13,14,15,17] mostram que o processo de oxidação da PMZ ocorre de forma característica, sendo esta um bom doador de elétrons e que a corrente anódica apresenta crescimento proporcional à concentração analítica.

O mecanismo de oxidação da PMZ no eletrodo (SiPy⁺Cl/CuTsPc)₅ pode ser descrito como ilustrado na Figura 3.2, de acordo com a literatura [2]. O cloridrato de prometazina é oxidado em mais de uma etapa, envolvendo dois elétrons e dois prótons. Os dois elétrons são perdidos em duas etapas sequenciais e, portanto, observam-se dois picos principais na sua oxidação [2]. Na primeira etapa, o processo de oxidação na PMZ ocorre com a remoção de um elétron do átomo de nitrogênio, formando assim um cátion radicalar relativamente estável (Etapa II) que em seguida é oxidado a sulfóxido de prometazina (Etapa III) [2,8,18].

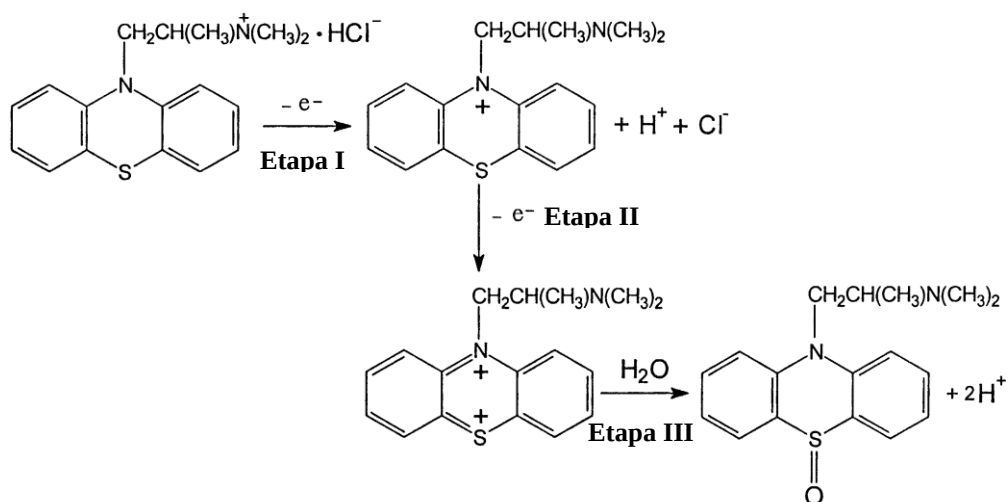


Figura 3.2: Mecanismo de oxidação do cloridrato de prometazina.

Assim, para confirmar a possibilidade de aplicação do eletrodo modificado pela técnica LbL como um sensor eletroquímico para PMZ, um estudo comparativo entre filmes *cast* dos polieletrólitos, filme LbL ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$)₅ e o substrato de FTO foi realizado (Figura 3.3).

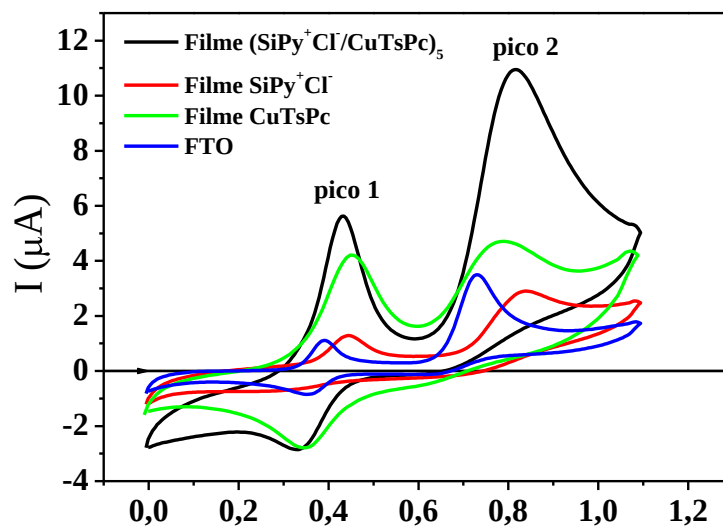


Figura 3.3: Voltamogramas cíclicos de $2,91 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de PMZ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 5,0 sobre o filme LbL ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$)₅, filmes *cast* de (SiPy^+Cl^-)₅ e (CuTsPc)₅ e o substrato FTO.

A Figura 3.3 mostra que a PMZ mostrou eletroatividade sobre a superfície de todos os filmes e para o substrato, com processos de redução e oxidação bem definidos. Esses resultados indicam que a PMZ é oxidada em duas etapas, de acordo com o descrito na literatura [2,8,18]. Para o FTO percebeu-se que os processos de oxidação ocorreram em potenciais mais negativos (0,38 e 0,73 V) quando comparado com o filme LbL ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$)₅. No entanto, o filme LbL apresentou maiores valores de corrente em comparação ao FTO e aos filmes contendo somente os polieletrólitos. Além disso, este também se apresentou altamente estável na superfície do eletrodo, ao contrário dos filmes formados apenas pelos polieletrólitos, os quais lixiviaram para a solução após 10 sucessivas varreduras voltamétricas. A estabilidade do filme ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$)₅ se deve à técnica de automontagem, que proporciona filmes finos com grande ordenamento molecular e estabilidade devido à interação eletrostática ocorrida entre os componentes do filme. Pode ser observado que a PMZ sobre o filme ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$)₅ apresentou dois processos anódicos em 0,48 V (pico 1) e em 0,79 V (pico 2) e um processo catódico em torno de 0,40 V (Figura 3.4). No entanto, com a realização de varreduras consecutivas, observou-se que a intensidade de corrente do pico 2 diminuía enquanto que o processo catódico do pico 1 sofria significativo

aumento de corrente, conforme relatado por Ribeiro *et al* ^[18]. A Figura 3.4 mostra os voltamogramas cíclicos para PMZ, com indicação do 1º e 10º ciclo.

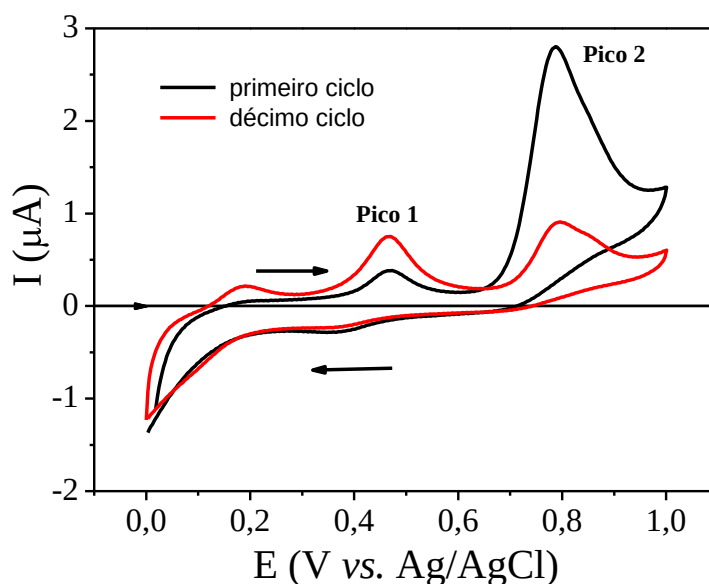


Figura 3.4: Voltamogramas cíclicos de PMZ $2,91 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 5,0 sobre filme LbL de $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_5$ a 50 mV s^{-1} .

Uma explicação para este comportamento é que inicialmente há a formação de um produto adsorvido (pico 2), referente à formação do cátion radicalar (conforme citado anteriormente), que por sua vez é oxidado com mais facilidade, devido ao menor valor de potencial, gerando um novo processo de oxidação (pico 1), relacionado com a formação do sulfóxido de prometazina. Por ter apresentado maior intensidade de corrente, o pico 2 foi escolhido para quantificação eletroanalítica.

3.3.2. Influência da velocidade de varredura

Com a finalidade de se evidenciar o tipo de transporte de massa envolvido no processo de oxidação da PMZ, foi realizado um estudo da variação da velocidade de varredura, utilizando a técnica de VC. As velocidades de varreduras foram variadas em um intervalo de 10 a 100 mV s^{-1} , em meio de tampão BR, pH 5,0, contendo $2,91 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de PMZ. Os voltamogramas obtidos em função da velocidade de varredura podem ser observados na Figura 3.5.

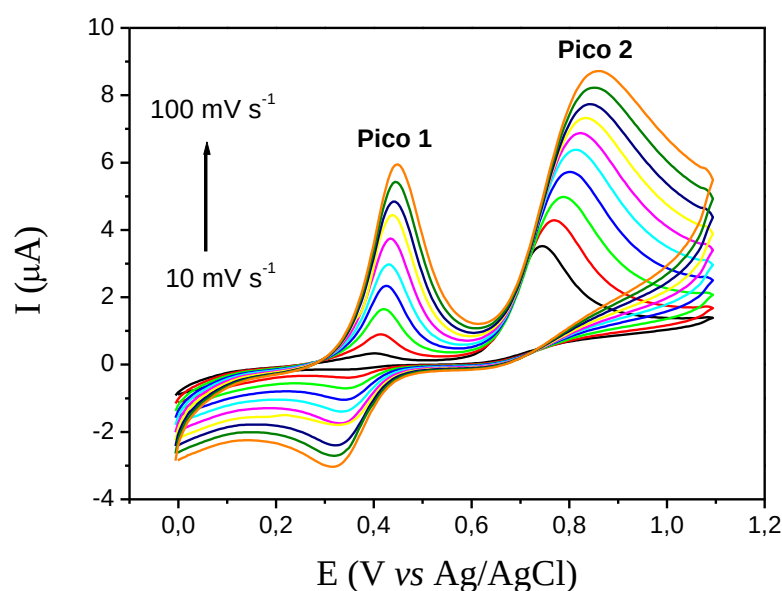


Figura 3.5: Voltamogramas cíclicos de PMZ $2,91 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR, pH 5,0 sobre o filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_5$ com velocidades de varredura entre 10 e 100 mV s^{-1} .

Verifica-se que há um aumento nas correntes de pico (picos 1 e 2), bem como os potenciais de picos deslocam-se para regiões mais positivas para o pico 2 à medida que se aumenta a velocidade de varredura. A Figura 3.6 A e B mostra a variação da corrente de pico anódica I_{pa} como função da velocidade de varredura e raiz quadrada da velocidade de varredura para os dois processos.

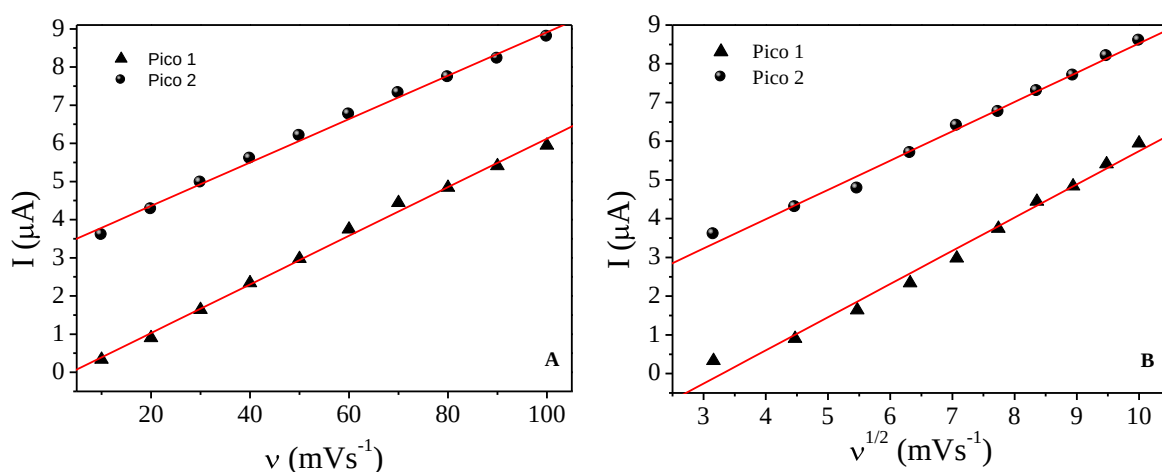


Figura 3.6: **A:** Dependência linear da velocidade de varredura com a I_{pa} e **B:** Dependência linear da raiz quadrada da velocidade de varredura com a I_{pa}

A relação linear, entre as I_{pa} e a velocidade de varredura, são descritas pelas equações: $I_{pa} (\mu\text{A}) = -0,247 + 0,063 v (\text{mV s}^{-1})$, com $R = 0,997$ e $I_{pa} (\mu\text{A}) = 3,218 + 0,056 v$

(mV s⁻¹), com R = 0,997, para o Pico 1 e 2, respectivamente. Já para a raiz quadrada da velocidade: $I_{pa} (\mu A) = -2,829 + 0,857 v^{1/2} (\text{mV s}^{-1})$, com R = 0,993 e $I_{pa} (\mu A) = 0,963 + 0,756 v^{1/2} (\text{mV s}^{-1})$, com r = 0,995. Devido a alta linearidade apresentada para os dois processos, tanto para a v como para $v^{1/2}$ não foi possível evidenciar o processo de transporte de massa. Neste sentido a relação do duplo logaritmo entre a I_{pa} e a v foi aplicado, como apresentado na Figura 3.7.

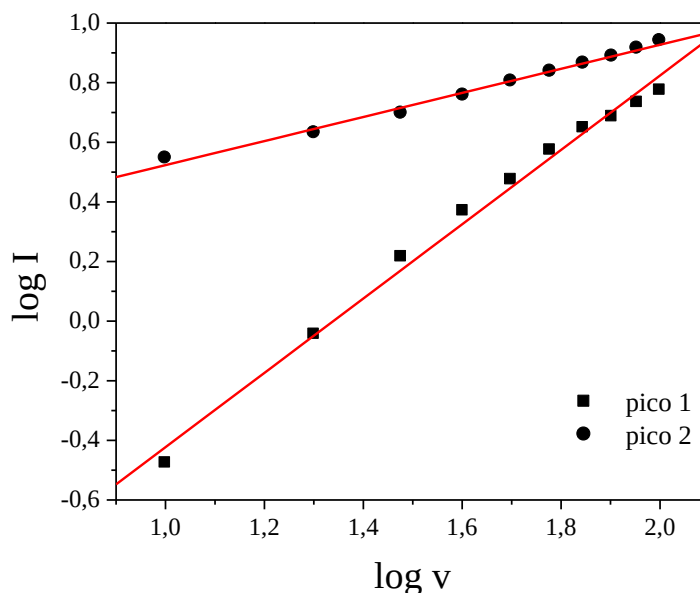


Figura 3.7: Dependência linear entre $\log I_{pa}$ com $\log v$.

A relação do duplo logaritmo entre corrente de pico anódica (I_{pa}) versus v foi adotada para compreender a natureza exata do mecanismo de oxidação da PMZ, com base nas seguintes equações simplificadas:

Para o processo controlado por difusão (I_{pa} vs $v^{1/2}$):

$$\log(I_{pa}) = \text{constante} + \frac{1}{2} \log(v) \quad [1]$$

$$\text{slope} = \frac{\partial \log(I_{pa})}{\partial \log(v)} = 0,5 \quad [2]$$

Para o processo controlado por adsorção (I_{pa} vs v):

$$\log(I_{pa}) = \text{constante} + \log(v) \quad [3]$$

$$\text{slope} = \frac{\partial \log(I_{pa})}{\partial \log(v)} = 1 \quad [4]$$

O mecanismo de transporte de massa da reação normalmente pode ser entendido a partir das relações de I_{pa} vs $v^{1/2}$ ou v , para processos controlados por difusão ou adsorção,

respectivamente ^[19]. No entanto, esta abordagem é muito difícil para o caso de processos mistos. Por outro lado, a relação do duplo logaritmo de I_{pa} vs v dá a informação exata sobre a natureza do processo. Caso o valor do *slope* encontre-se entre 0,5 e 1,0, a reação é controlada por um processo misto de adsorção e difusão ^[19].

Neste sentido, através da regressão linear, obteve-se para os picos 1 e 2, com coeficientes de correlação 0,995 para ambos os processos, as equações da reta $y = -1,66 + 1,246x$ e $y = 0,119 + 0,403x$, respectivamente. Este comportamento pode afirmar que o processo de transporte de massa para o pico 1 é controlado por adsorção (*slope* = 1,246) e o pico 2 por difusão (*slope* = 0,403) das espécies até a superfície do eletrodo. A literatura reporta que para um eletrodo de ouro modificado com nanotubos de carbono (MWNTs/Au) ^[20], onde a PMZ apresentou um processo redox, com um pico anódico em 0,66 V e um catódico em 0,40, o processo de transporte de massa é controlado por adsorção. Comportamento semelhante foi observado por Li e colaboradores^[3], onde o eletrodo de ouro foi revestido com líquido iônico. A diferença apresentada para o filme (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₅, pode estar relacionada as diferentes superfícies eletródicas.

3.3.3. Influência do pH

Como o processo eletroquímico da PMZ, envolve íons H⁺, o comportamento voltamétrico da PMZ sobre o filme automontado (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₅ foi investigado na faixa de pH de 3,0 a 7,0 utilizando a técnica de VOQ, a fim de verificar o valor de pH de maior sensibilidade da resposta (Figura 3.8). O tampão BR foi utilizado como eletrólito suporte por já ser utilizado na literatura em estudos eletroanalíticos de cloridrato de prometazina, uma vez que promove respostas de corrente e potencial bem definidos ^[2,18]. As respostas voltamétricas em diferentes valores de pH revelaram que o pico 2 deslocou-se para valores mais negativos de potencial e a intensidade de corrente aumentou com a elevação do pH de 3,0 até 5,0. Observou-se que em pHs mais básicos há adsorção da prometazina sobre a superfície do eletrodo, assim como em pH 7,0, onde ocorreu os maiores valores de corrente de pico. Desta maneira, o pH 5,0 foi escolhido como pH ótimo para continuar o estudo eletroanalítico por apresentar melhor resposta eletroquímica em termos de intensidade de corrente e sensibilidade.

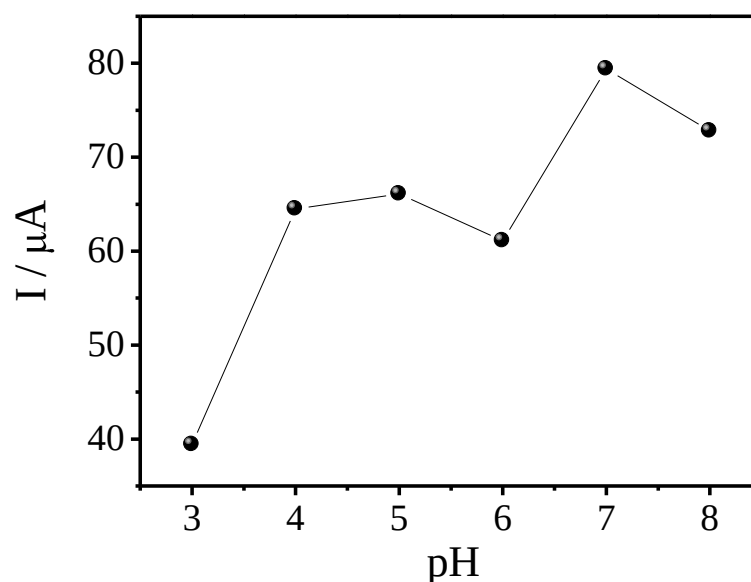


Figura 3.8: Influência do pH para PMZ $2,91 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ sobre filme LbL de $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_5$.

3.3.4. Estudos de voltametria de onda quadrada

A VOQ foi empregada por se tratar de uma das técnicas mais rápidas e sensíveis dentre as outras técnicas de pulso, tais como as voltametrias de pulso normal e pulso diferencial. Nesta técnica, a velocidade final do experimento é dada pelo produto entre a frequência de aplicação dos pulsos e o incremento de potencial, e os limites de detecção podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas. A sua grande aplicação se deve também ao fato de que a análise dos resultados e a aplicação dos critérios de diagnósticos possibilitam a avaliação da cinética e mecanismo do processo redox envolvido ^[21]. Inicialmente, os parâmetros voltamétricos da VOQ foram otimizados com o objetivo de se obter a melhor intensidade de corrente já que exercem forte influência nos processos redox.

3.3.4.1. Otimização dos parâmetros da VOQ

A frequência de aplicação dos pulsos de potenciais, f , é um dos parâmetros mais importantes da VOQ, pois o seu aumento melhora significativamente as respostas analíticas e, além disso, fornece importantes informações a cerca do comportamento redox da espécie de interesse ^[22]. A Figura 3.9 A apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para a

PMZ em função da variação dos pulsos de frequência, aplicando-se f de 10 s^{-1} a 300 s^{-1} e fixando-se os demais parâmetros ($a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).

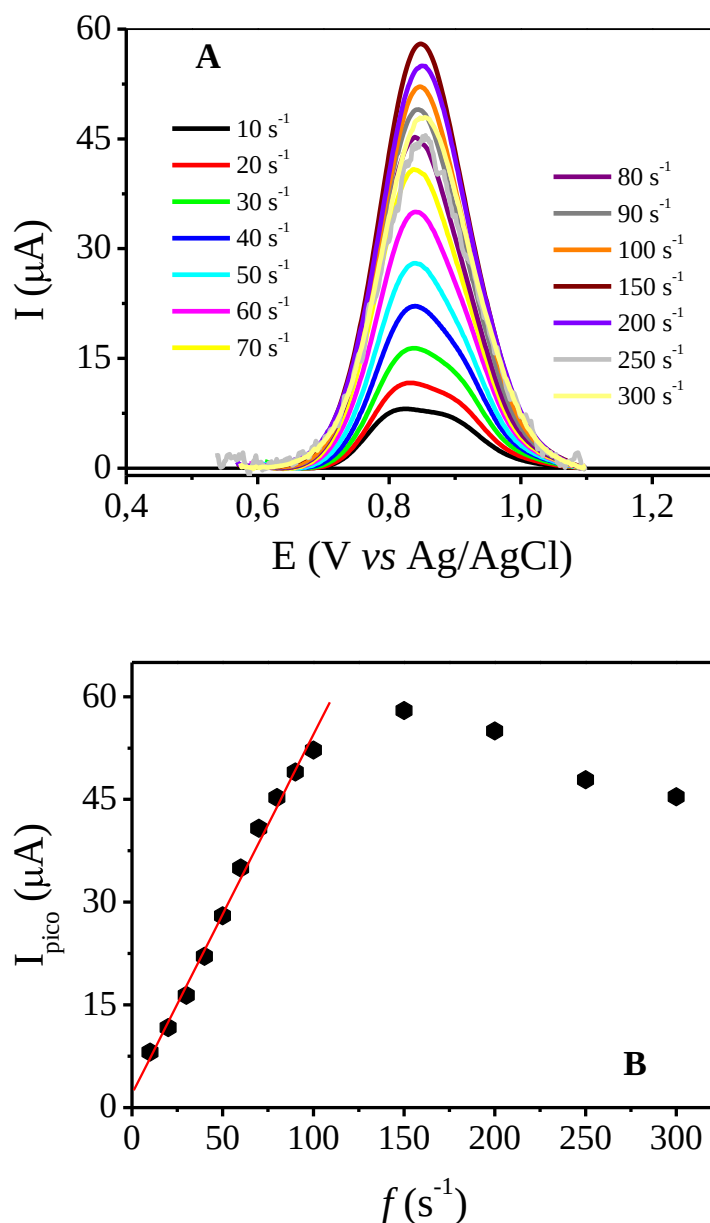


Figura 3.9: (A) Voltamogramas de onda quadrada para $[\text{PMZ}] = 2,91 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, sobre o $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_5$ em diferentes frequências de aplicação de pulsos (10 a 300 s^{-1}). (B) Relação entre correntes de pico e frequência de dos pulsos de potencial, em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

As correntes de pico apresentaram uma relação linear com a variação da frequência na faixa de 10 s^{-1} a 100 s^{-1} (Figura 3.9 B), ocorrendo um posterior decréscimo das mesmas com o aumento da frequência. A frequência selecionada constitui a máxima onde ainda há existência de linearidade e deste modo foi selecionado o valor de 100 s^{-1} .

A amplitude influencia diretamente na seletividade, uma vez que o pico de corrente tende a ficar mais largo para altos valores da mesma. Com a realização deste estudo pode-se observar que com o aumento da amplitude ocorreu um alargamento do pico de oxidação (Figura 3.10 A). Pode-se observar ainda que a variação da amplitude do pulso de potencial para o pico 2 proporcionou um aumento linear na corrente de pico, no intervalo de 5 a 80 mV (Figura 3.10 B). No entanto, escolheu-se a amplitude de 40 mV, a qual proporcionou um aumento considerável de corrente e pequeno alargamento do pico.

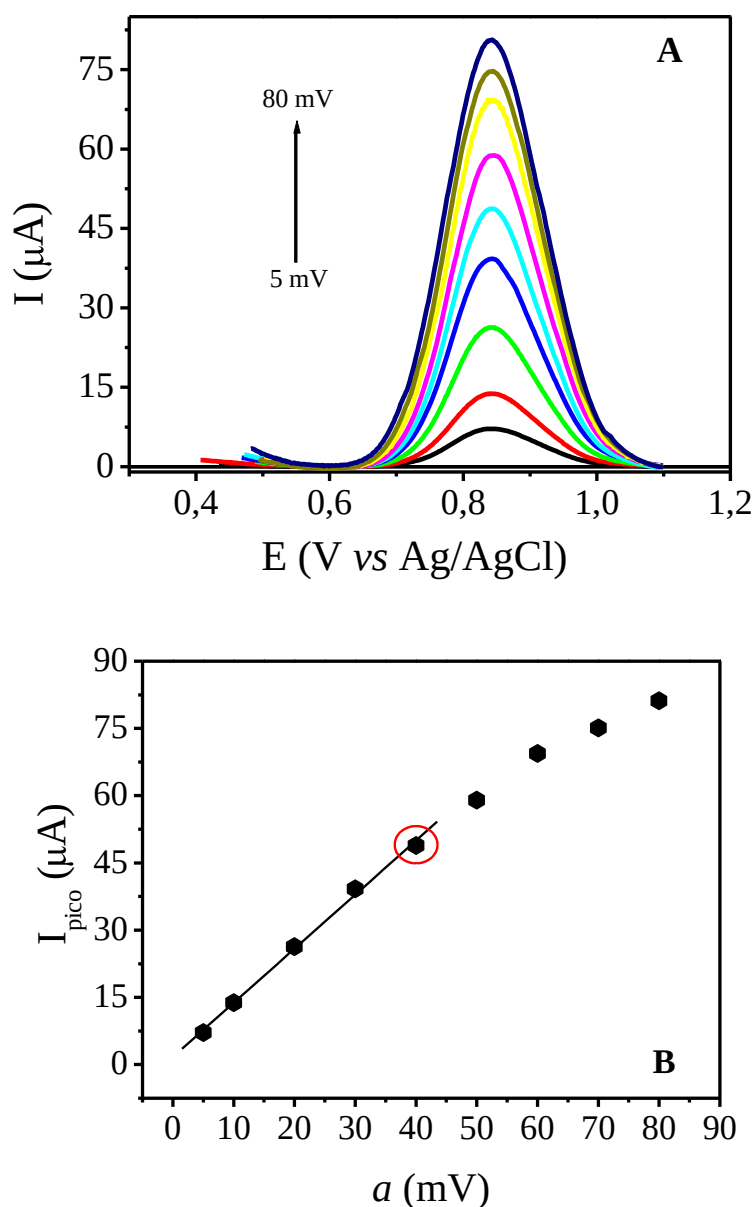


Figura 3.10: (A) Voltamogramas de onda quadrada para $[\text{PMZ}] = 2,91 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, sobre $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_5$ em diferentes amplitudes de aplicação de pulsos (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 mV) (B) Relação entre as correntes de pico e a amplitude de pulsos de potencial para PMZ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

A velocidade de varredura na VOQ é resultado do produto da frequência pelo incremento de potencial (ΔE_s). Deste modo, um incremento de varredura maior pode aumentar o sinal obtido, e assim, melhorar a sensibilidade do método. Os resultados obtidos mostraram que o aumento do ΔE_s resultou em um aumento da corrente de pico, entre 1 e 7 mV, além de proporcionar um pequeno deslocamento do potencial para valores mais positivos (Figura 3.11 A e B).

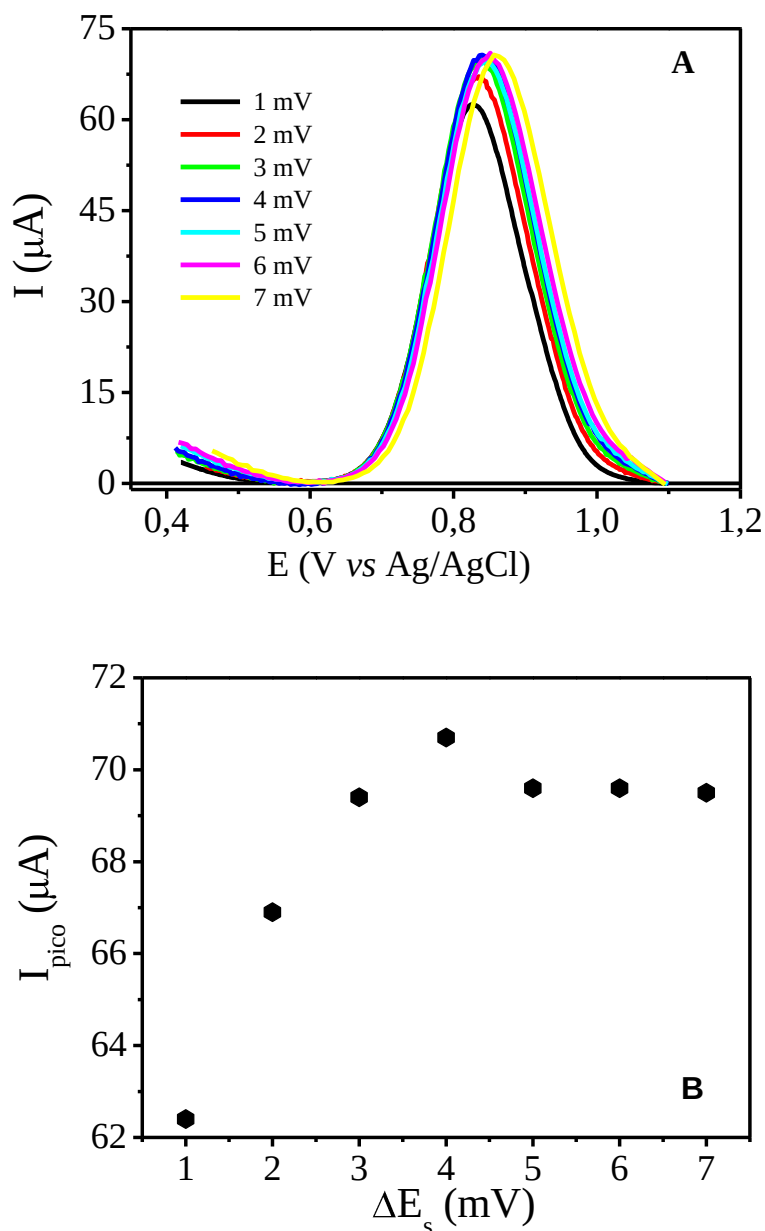


Figura 3.11: (A) Voltamogramas de onda quadrada para [PMZ] $2,91 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão BR 0,04 mol L^{-1} , sobre $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_5$ em diferentes incrementos de potencial. (B): Relação entre as correntes de pico e o incremento de potencial para PMZ em meio de tampão BR 0,04 mol L^{-1} . $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$.

Verificou-se ainda que quanto maior o incremento de potencial maior tende a ser a largura do pico voltamétrico, isto implica no decréscimo da seletividade do método. Como a corrente não foi significativamente maior para os demais incrementos de potencial, escolheu-se o ΔE_s de 2 mV.

3.3.4.2. Curvas Analíticas

Após a otimização dos parâmetros voltamétricos: $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, curvas analíticas foram obtidas, com a concentração variando de $3,98 \times 10^{-7}$ e $3,85 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ obtidas por adições consecutivas de alíquotas de solução estoque $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de PMZ na célula eletroquímica. As curvas analíticas indicaram um aumento linear da corrente de pico em função do aumento da concentração de prometazina (Figura 3.12).

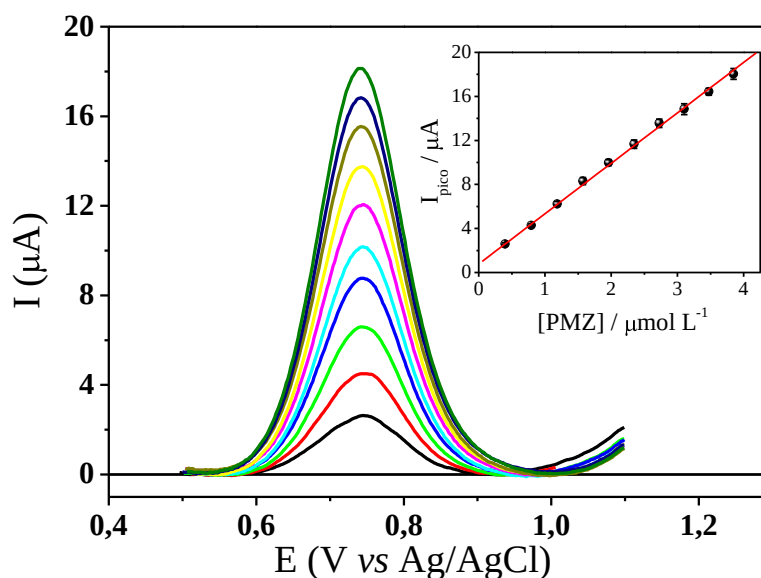


Figura 3.11: Voltamogramas de onda quadrada para PMZ em pH 5,0 sobre filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}/\text{CuTsPc})_5$, com $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. As concentrações de PMZ variaram entre $3,98 \times 10^{-7}$ e $3,85 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Inserido: Dependência da corrente de pico em função da concentração de PMZ.

Na Tabela 3.2 estão representados os parâmetros analíticos para a metodologia desenvolvida, tais como região linear, equação da curva analítica, coeficientes de correlação (R), que determina o grau de linearidade da correlação entre a concentração de PMZ e as correntes de pico, bem como o desvio-padrão do intercepto ($S_{x/y}$), o limite de detecção (LD), o limite de quantificação (LQ), a repetibilidade e reprodutibilidade. O limite de detecção é definido como sendo a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser

detectada e o limite de quantificação, definido como a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Logo os valores de limite de detecção e quantificação foram calculados para o procedimento proposto utilizando as equações 3.2 e 3.3 recomendadas pela ANVISA ^[23].

$$LD = \frac{3S_{x/y}}{b} \quad (3.2)$$

$$LQ = \frac{10S_{x/y}}{b} \quad (3.3)$$

onde, LD é o limite de detecção, LQ o limite de quantificação, $S_{x/y}$ é o desvio padrão do intercepto com o eixo y (coeficiente linear) das curvas analíticas ($n = 5$) e b é a inclinação média da curva de calibração. A repetibilidade da metodologia foi avaliada por meio da realização de dez medidas sucessivas de uma solução de PMZ $7,94 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, correspondente ao segundo ponto da curva analítica, sob as condições experimentais otimizadas e realizadas no mesmo dia. Por outro lado, a reprodutibilidade foi realizada tomando cinco medidas em dias diferentes.

Tabela 3.1: Parâmetros obtidos a partir da regressão linear das curvas analíticas para oxidação de PMZ sobre filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_5$ em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ por VOQ, empregando $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

Parâmetros	VOQ
Região Linear	$3,98 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $3,85 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
Equação da curva	$I_{\text{pico}} = (9,33 \pm 0,294) \times 10^{-7} + (4,52 \pm 0,065) [\text{PMZ}]$
R	0,999
S_b	$4,5 \times 10^{-9} (\text{A/mol L}^{-1})$
LD (mol L^{-1})	$8,71 \times 10^{-9} (2,79 \mu\text{g L}^{-1})$
LQ (mol L^{-1})	$9,31 \times 10^{-8} (9,31 \mu\text{g L}^{-1})$
RSD (repetibilidade)	2,12% ($n = 12$)
RSD (reprodutibilidade)	2,90% ($n = 5$)

Os valores de LD e LQ calculados pelo método proposto foram menores dos que os observados para quantificação de cloridrato de prometazina para diferentes eletrodos, tais

como de carbono vítreo ^[2], grafite em pó modificado por líquido iônico ^[15] e diamante dopado com boro de diamante ^[18], e próximos dos valores encontrados para eletrodo de carbono vítreo modificado com DNA ^[24] e pasta de carbono modificado com DNA ^[25], tal como pode ser visto na Tabela 3.3. Todavia, os valores obtidos utilizando-se esse eletrodo são bastante inferiores em relação aos obtidos para determinação de outros fármacos quando são utilizados filmes contendo ftalocianinas ^[26,27].

Tabela 3.2: LD e LQ obtidos na determinação de PMZ em eletrólito puro utilizando diferentes eletrodos de trabalho.

Eletrodo	Método	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Ref.
GCE	DPSV	34,00	-	[2]
Grafite-BIMPF ₆	Voltamétrico	1604,40	-	[5]
Au-CDtrodos	Espectroeletroanálise	9626,40	35296,80	[8]
HDDB	SW-AdSV	14,77	49,19	[18]
DNA/GCE(ox)	DPV	0,096	-	[15]
Pasta de carbono modificado com DNA	PSA	1,60	-	[24]

3.3.4.3. Aplicação do método

Para avaliação da eficiência da metodologia proposta foram realizados testes de recuperação. O teste de recuperação é realizado com intuito de se observar quanto da amostra adicionada pode ser realmente detectada. Para isso, uma quantidade conhecida do padrão e/ou das formulações farmacêuticas foi acrescentada ao eletrólito suporte, seguida por adições do padrão da solução de PMZ, obtendo-se as curvas analíticas. A eficiência de recuperação foi calculada de acordo com equação 3.1.

O método da adição de padrão foi usado, primeiramente no teste de recuperação em eletrólito puro (tampão BR 0,04 mol L⁻¹ e pH 5,0), em seguida realizado nas formulações farmacêuticas comerciais. A Figura 3.13 corresponde à curva analítica obtida e na inserção estão os voltamogramas correspondentes a diferentes adições do medicamento.

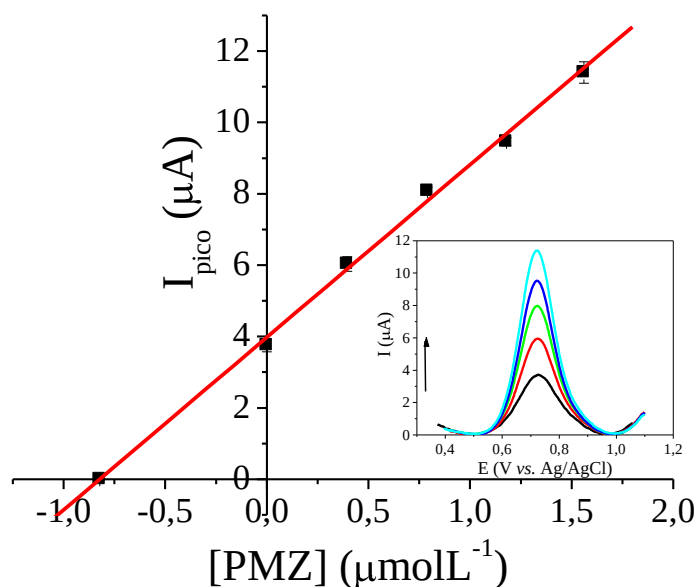


Figura 3.13: Relação entre I_{pico} vs concentração de PMZ para curva de recuperação em amostra do medicamento Lisador[®] obtida a partir dos valores médios de corrente de pico ($n = 3$), com suas respectivas barras de desvio padrão. Na inserção, voltamogramas da PMZ na faixa de concentração de $7,94 \times 10^{-7}$ a $2,34 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

A Tabela 3.4 apresenta os resultados obtidos destas determinações. Cálculos estatísticos dos resultados mostraram boa concordância entre os métodos a um nível de confiança de 95 %, indicando que o eletrodo proposto pode ser utilizado na determinação de PMZ em medicamentos. Estes resultados estão condizentes com a literatura, por exemplo Ribeiro *et al.* ^[18] encontraram valores de recuperação entre 87 e 97 %, para amostras de cloridrato de prometazina, sob a forma de comprimidos e injetável, utilizando como eletrodo de trabalho um eletrodo sólido de diamante dopado com boro. Em outro trabalho, Rama *et al.* ^[10] encontraram valores entre 97 e 102 %, para um sistema de injeção em fluxo (FIA).

Tabela 3.3: Resultados obtidos para curvas de recuperação de PMZ em eletrólito puro e em formulações comerciais por VOQ sobre filme LbL ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$)₅ com $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. $[\text{PMZ}]_{\text{adicionada}} = 7,94 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

	Eletrólito	Fenergan [®] injetável	Fenergan [®] comprimido	Lisador [®] gotas	Lisador [®] comprimido
Dosagem nominal	-	50 mg/2mL	25 mg/compr.	5 mg/1,5mL	25 mg/compr.
$[\text{PMZ}]_{\text{rec.}}/\text{mol L}^{-1}$	$8,51 \times 10^{-7}$	$8,90 \times 10^{-7}$	$8,03 \times 10^{-7}$	$8,21 \times 10^{-7}$	$9,18 \times 10^{-7}$
Recuperação (%)	107,21	112,07	99,51	104,41	115,57
RSD (%)	0,81	1,60	4,68	3,99	3,77

3.4. CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste capítulo, abordou-se a utilização do filme automontado (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₅ no desenvolvimento e otimização de uma metodologia eletroanalítica para determinação do fármaco cloridrato de prometazina (PMZ). Com os resultados deste trabalho pode-se concluir que o mecanismo de oxidação da PMZ envolve a formação de um produto adsorvido que oxida facilmente, produzindo um novo processo com menor valor de potencial. A intensidade do pico 2 foi mais significativa, por este motivo este foi escolhido para o desenvolvimento da metodologia eletroanalítica. A utilização da voltametria de onda quadrada resultou em uma ótima correlação linear entre as correntes de pico ($R = 0,999$) e a concentração de PMZ. O método proposto apresentou boa sensibilidade, precisão e especificidade, caracterizadas pelos baixos valores de LD ($1,92 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$), LQ ($6,41 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) e recuperação de $8,90 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $8,03 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (115,57% e 99,51%, respectivamente) obtidos em amostras de formulações comerciais, sem necessidade de procedimento complexo para preparação da amostra ou para renovação da superfície eletródica. Dessa forma este eletrodo modificado com filme LbL apresenta grande potencialidade para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos, uma vez que se mostrou estável e reprodutível como eletrodos de uso convencional em eletroanalítica.

3.5. REFERÊNCIAS

- [1] MENEGATTI, R.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; LIMA, V.L.E.; RATES, S.M.K.; COSTA, T.D. Esquizofrenia: Quarenta Anos da Hipótese Dopaminérgica sob a Ótica da Química Medicinal. **Química Nova**. v. 27, p. 447-455, 2004.
- [2] NI, Y.; WANG, L.; KOKOT, S. Voltammetric determination of chlorpromazine hydrochloride and promethazine hydrochloride with the use of multivariate calibration. **Analytica Chimica Acta**. v. 439, p. 159-168, 2001.
- [3] LI, J.; ZHAO, F.; ZENG, B. Characterization of a graphite powder-ionic liquid paste coated gold electrode, and a method for voltammetric determination of promethazine. **Microchimica Acta**. v. 157, p. 27-33, 2007.
- [4] LARA, F.J.; GARCIA-CAMPANÃ, A.M.; ALÉS-BARRERO, F.; BOSQUESENDRA, J.M. Determination of thiazinamium, promazine and promethazine in pharmaceutical formulations using a CZE method. **Analytica Chimica Acta**. v. 535, p. 101-108, 2005.

- [5] GÓMEZ, M.A.M.; SAGRADO, S.; CAMANÃS, R.M.V.; HERNÁNDES, M.J.M. Enantioseparation of phenothiazines by affinity electrokinetic chromatography using human serum albumin as chiral selector Application to enantiomeric quality control in pharmaceutical formulations. **Analytica Chimica Acta**. v. 582, p. 223-228, 2007.
- [6] WOJCIAK-KOSIOR, M.; SKALSKA, A.; MATYSIK, A. Determination of phenothiazine derivatives by high performance thin-layer chromatography combined with densitometry. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 41, p. 286-289, 2006.
- [7] GILPIN, R.K.; GILPIN, C.S. Pharmaceuticals and Related Drugs. **Analytical Chemistry**. v. 79, p. 4275-4294, 2007.
- [8] DANIEL, D.; GUTZ, I.G.R. Flow injection spectroelectroanalytical method for the determination of promethazine hydrochloride in pharmaceutical preparations. **Analytica Chimica Acta**. v. 494, p. 215-224, 2003.
- [9] FENG, S.; LI, C.; FAN, J.; CHEN, X. Sequential Injection Technique for the Determination of Chlorpromazine Hydrochloride in Pure Form and Pharmaceutical Formulations. **Journal Analytical Chemistry**. v. 62, p. 233-237, 2007.
- [10] RAMA, M.J.R.; MEDINA, A.R.; DÍAZ, A. Bead injection spectroscopy-flow injection analysis (BIS-FIA): an interesting tool applicable to pharmaceutical analysis Determination of promethazine and trifluoperazine. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 35, p. 1027-1034, 2004.
- [11] GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G.S.; COUTINHO, C.F.B.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A.; MACHADO, S.A.S. Utilização de Técnicas Eletroanalíticas na Determinação de Pesticidas em Alimentos. **Química Nova**. v. 29, p. 105-112, 2006.
- [12] BISHOP, E.; HUSSEIN, W. Electroanalytical studies of phenothiazine neuroleptics at gold and platinum-electrodes. **Analyst**. v. 109, p. 229-234, 1984.
- [13] BLANKERT, B.; HAYEN, H.; VAN LEEUWEN, S.M.; KARST, U.; BODOKI, E.; LOTREAN, S.; SANDULESCU, R.; DIEZ, N.M.; DOMINGUEZ, O.; ARCOS, J.; KAUFFMANN, J.M. Electrochemical, Chemical and Enzymatic Oxidations of Phenothiazines. **Electroanalysis**. v. 17, p. 1501-1510, 2005.
- [14] ZHOU-SHENG, Y.; ZHAO, J.; ZHANG, D. P.; LIU, Y.C. Electrochemical Determination of Trace Promethazine Hydrochloride by a Pretreated Glassy Carbon Electrode Modified with DNA. **Analytical Sciences**. v. 23, p. 569-572, 2007.
- [15] TANG, H.; CHEN, J.; CUI, K.; NIE, L.; KUANG, Y.; YAO S. Immobilization and electro-oxidation of calf thymus deoxyribonucleic acid at alkylamine modified carbon nanotube electrode and its interaction with promethazine hydrochloride. **Journal Electroanalytical Chemistry**. v. 587, p. 269-275, 2006.

- [16] THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; FAJGELJ, A.; WILLETTS, P.; WOOD, R. Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. **Pure And Applied Chemistry**. v. 71, p. 337-348, 1999.
- [17] LI, J.W.; ZHAO, F.Q.; ZENG, B.Z. Characterization of a graphite powder-ionic liquid paste coated gold electrode, and a method for voltammetric determination of promethazine. **Microchimica Acta**. v. 157, p. 27-33, 2007.
- [18] RIBEIRO, F.W.P.; CARDOSO, A.S.; PORTELA, R.R.; LIMA, J.E.S.; MACHADO, S. A.S.; LIMA-NETO, P. de; SOUZA, D. de; CORREIA, A.N. Electroanalytical Determination of Promethazine Hydrochloride in Pharmaceutical Formulations on Highly Boron-Doped Diamond Electrodes Using Square-Wave Adsorptive Voltammetry. **Electroanalysis**. v. 20, p. 2031-2039, 2008.
- [19] BARD, A.J.; FAULKNER, L.R. **Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications**, Wiley, New York, 2001.
- [20] XIAO, P.; WU, W.; YU, J.; ZHAO, F. Voltammetric Sensing of Promethazine on a Multi-Walled Carbon Nanotubes Coated Gold Electrode. **International Journal of Electrochemical Science**. v. 2, p. 149-157, 2007.
- [21] SOUZA, D. de; MACHADO, S.A.S.; AVACA, L.A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**. v. 26, p. 81-89, 2003.
- [22] PEDROSA, V.A.; CODOGNOTO, L.; AVACA, L.A. Determinação Voltamétrica de 4-Clorofenol Sobre o Eletrodo de Diamante Dopado com Boro Utilizando a Voltametria de Onda Quadrada. **Química Nova**. v. 26, p. 844-849, 2003.
- [23] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**, RE nº 899, de 29/05/2003.
- [24] YANG, Z.S.; ZHAO, J.; ZHANG, D.P.; LIU, Y.C. Electrochemical determination of trace promethazine hydrochloride by a pretreated glassy carbon electrode modified with DNA. **Analytical Sciences**. v. 23, p. 569-572, 2007.
- [25] WANG, J.; RIVAS, G.; CAI, X.; SHIRAISHI, H.; FARIAS, P.A.M.; DONTA, N.; LUO, D. Accumulation and trace measurements of phenothiazine drugs at DNA-modified electrodes. **Analytica Chimica Acta**. v. 332, p. 139-144, 1996.
- [26] SIQUEIRA Jr, J.R. GASPAROTTO, L.H.S.; CRESPILO, F.N.; CARVALHO, A.J.F.; ZUCOLOTO, V.; OLIVEIRA Jr., O.N. Physicochemical Properties and Sensing Ability of Metallophthalocyanines/Chitosan Nanocomposites. **The Journal of Physical Chemistry B**. v. 110, p. 22690-22694, 2006.
- [27] ZUCOLOTO, V.; FERREIRA, M.; CORDEIRO, M.R.; CONSTANTINO, C.J.L.; MOREIRA, W.C.; OLIVEIRA Jr, O.N. Nanoscale processing of polyaniline and

phthalocyanines for sensing applications. **Sensors and Actuators B.** v. 113, p. 809-815, 2006.

4.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1.1. Biossensores

Biossensor é definido como um dispositivo que usa um elemento de reconhecimento biológico (como enzimas, anticorpos, proteínas, microorganismos, etc) em contato a transdutores (como os eletroquímicos, ópticos, térmicos, etc), que, juntos, se relacionam e são capazes de reconhecer determinada substância com alta especificidade ^[1,2]. A Figura 4.1 ilustra as partes típicas de um biossensor: o elemento de reconhecimento biológico (bioreceptor) que interage seletivamente ao analito (amostra). A Figura 4.1 mostra as partes típicas de um biossensor: o elemento de reconhecimento biológico ligado ao analito (amostra); o transdutor que converte o sinal eletrônico e amplifica para o circuito de detecção usando uma referência apropriada; um computador que converte o sinal para um significado físico descrevendo o processo investigado; e finalmente, o resultado é apresentado em uma interface para o operador humano. Os biossensores eletroquímicos são geralmente muito seletivos devido à possibilidade de adequar as interações específicas de compostos biológicos através da sua imobilização sobre a superfície de um eletrodo.

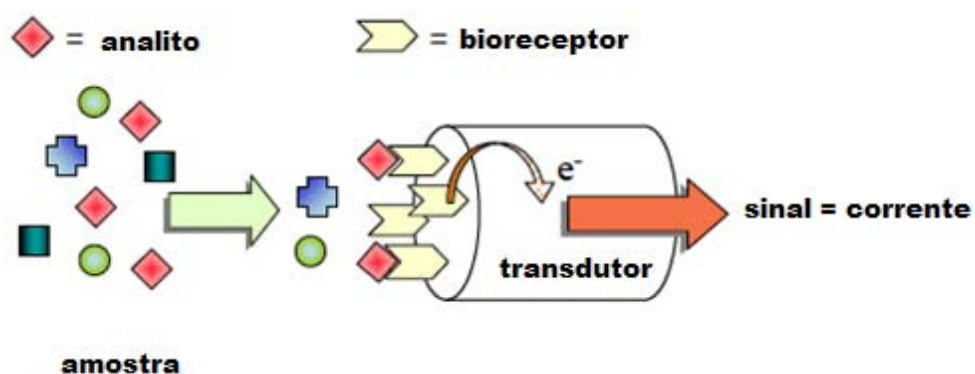


Figura 4.1: Elementos e componentes de um biossensor.

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o tipo de elemento de reconhecimento biológico, com o modo de transdução de sinal ou ainda pela combinação de ambos. Estes podem também ser classificados como amperométricos, potenciométricos, condutimétricos ^[1,2].

Dentre estes, os biossensores eletroquímicos amperométricos são os mais utilizados por causa de sua alta sensibilidade e ampla faixa linear ^[3]. Estes baseiam-se na corrente resultante de oxidação ou redução eletroquímica de uma espécie eletroativa em um potencial fixo. A corrente resultante é diretamente proporcional com a concentração da espécie eletroativa, ou com o seu consumo ou sua geração durante a interação biológica ^[1,2].

Os biossensores amperométricos se classificam em três gerações, podendo ser de primeira, segunda e terceira geração, de acordo com o processo envolvido na transferência de carga ^[4], como ilustrados na Figura 4.2.

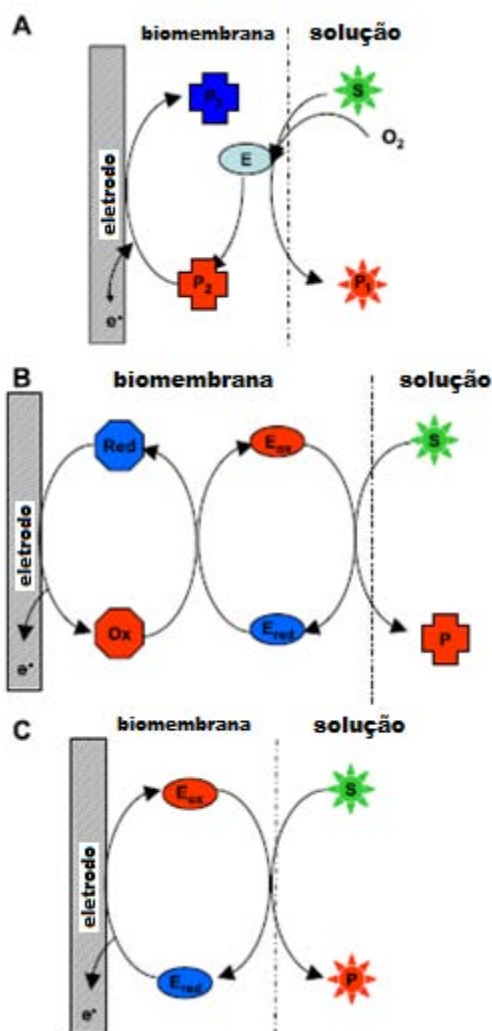


Figura 4.2: Biossensor amperométrico: (A) primeira geração, (B) segunda geração, (C) terceira geração ^[5].

Os biossensores amperométricos de primeira geração trabalham a altos potenciais e baseiam-se na eletroatividade do substrato da enzima ou no produto gerado da reação enzimática. O princípio de funcionamento de um biossensor de segunda geração baseia-se no

uso de um mediador para transferência de carga entre o sítio ativo da enzima e a superfície do eletrodo, a fim de se diminuir o potencial aplicado no eletrodo de trabalho. Finalmente, os biossensores de terceira geração se caracterizam pela transferência direta de elétrons entre a enzima e a superfície do eletrodo, a baixos potenciais ^[4,6].

4.1.2. Biossensores enzimáticos a base de filmes LbL

Dentre as moléculas utilizadas em biossensores as mais comumente empregadas são as enzimas oxirredutases devido à possibilidade de poderem ser utilizadas em sua forma pura e interagirem com um substrato específico ^[7]. A possibilidade de se minimizar a desnaturação da proteína, uma vez que o processo de adsorção é efetuado em soluções aquosas, sob condições suaves, se torna a principal vantagem de imobilizar as enzimas pelo método LbL, bem como a alta organização destes.

O H_2O_2 é um metabólito natural em muitos organismos, o qual, quando decomposto, resulta em oxigênio molecular e água. A sua determinação é de grande importância uma vez que este se encontra presente em inúmeras reações biológicas como principal produto de várias oxidases, entre elas a glicose oxidase (GOx).

Wang *et al.* ^[8] produziram um filme LbL entre a poli(etilenoimina) (PEI) e carboximetilcelulose (CMC) sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo (CV) previamente modificado com ácido *p*-aminobenzenossulfônico (*p*-ABS) para tornar a superfície do CV carregada negativamente. Nas condições experimentais utilizadas a interação entre PEI e CMC ocorreu através da atração eletrostática, porque PEI e CMC são carregados positivamente e negativamente, respectivamente. O eletrodo (PEI-CMC)₅/CV foi revestido com hemina através da imersão deste na solução da mesma. A interação entre o filme (PEI-CMC)₅/CV e a hemina está relacionada ao fato de que o filme LbL contém cargas positivas como um sítio de ligação para espécies carregadas negativamente, ou seja, a hemina por se encontrar em pH neutro (7,4) encontra-se negativamente carregada. O eletrodo modificado resultante exibiu uma resposta amperométrica linear em função da redução eletroquímica de H_2O_2 na faixa de concentração de 0,005-1,0 mmol L⁻¹ aplicando um potencial de -0,6 V.

Dentre os biossensores LbL contendo enzimas, os mais estudados e caracterizados são os que apresentam a enzima glicose oxidase (GOx) ^[9,10,11]. Neste sentido, Ferreira *et al* ^[9]

imobilizaram a GOx em um filme LbL adsorvido alternadamente com o polícatión hidrocloreto de poli(alilamina) (PAH), sobre um substrato de ITO modificado com azul da prússia (PB). Neste caso, a GOx interage eletrostaticamente com o polieletrólito, pois em pH 7 apresenta cargas negativas devido ao pH estar acima de seu ponto isoelétrico. Os eletrodos ITO/PB/PAH-GOx apresentaram alta sensibilidade ($16 \mu\text{A mmol L}^{-1} \text{cm}^{-2}$) e um limite de detecção de $0,20 \text{ mmol L}^{-1}$ frente a glicose. Estas propriedades foram atribuídas à natureza ultrafina dos filmes LbL a qual minimiza os problemas relativos ao transporte de massa. Além disso, devido à aplicação de um potencial tão baixo (0,0 V), foi possível assegurar a seletividade analítica do biossensor, uma vez que a interferência do ácido ascórbico, ácido úrico e acetoaminofeno foram evitadas.

Materiais a base de carbono, tais como os nanotubos de carbono, também têm sido extensivamente utilizados na fabricação de filmes LbL juntamente com enzimas. Nesta perspectiva, Deng *et al.* ^[10] fabricaram um biossensor sensível e estável por LbL entre GOx e PEI sobre um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono (CNT), obtendo-se os filmes ($\{\text{GOx/PEI}\}_n/\text{CNT/CV}$), com $n = 1-3$ (onde n = número de bicamadas). Pode-se observar que a corrente do pico catódico aumentou linearmente com o número de bicamadas, portanto, o filme $\{\text{GOx/PEI}\}_3$ foi aplicado como biossensor de glicose. Este apresentou alta sensibilidade ($106,57 \mu\text{A mmol L}^{-1} \text{cm}^{-2}$) na presença de sucessivas adições de $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose. Além disso, apresentou excelente estabilidade operacional, sem redução na atividade da enzima durante uma semana. O CNT agiu como um excelente nanomaterial, melhorando a transferência eletrônica direta entre a GOx em $\{\text{GOx/PEI}\}_n$ com o eletrodo, proporcionando um microambiente favorável para manter a bioatividade da GOx.

Por sua vez, Zeng *et al.* ^[12] desenvolveram um método pouco convencional para a automontagem de grafeno em filmes LbL. A deposição do filme foi realizado em duas etapas: folhas de grafeno foram modificadas com poli(ácido acrílico) (PAA) e em seguida automontadas com PEI, formando o filme $(\text{PEI/PAA-grafeno})_n$ sobre um eletrodo de CV. Inicialmente, a atividade eletrocatalítica frente a H_2O_2 para o filme $(\text{PEI/PAA-grafeno})_n$ foi avaliada em comparação com o eletrodo de CV. O eletrodo modificado com o filme mostrou correntes de oxidação e redução superiores em relação ao não modificado. A dependência da corrente de oxidação de H_2O_2 com o número de bicamadas de $(\text{PEI/PAA-grafeno})_n$ foi investigada e observou-se que o seu valor aumenta significativamente até a terceira bicamada e em seguida há um decréscimo na corrente. Este resultado ocorre, pois com o aumento do

número de bicamadas a transferência eletrônica é dificultada. Com base nestas propriedades, sob o filme (PEI/PAA-grafeno)₃, um sistema para detecção de glicose foi produzido, alternado o polímero PEI com GOx, denominado (PEI/PAA-grafeno)₃(PEI/GOx)₅ (Figura 4.3).

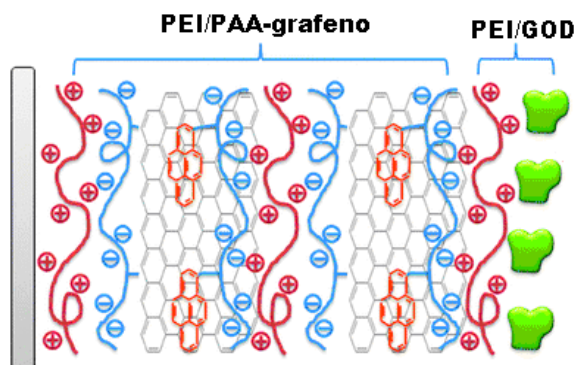


Figura 4.3: Processo de imobilização da enzima GOx sobre o eletrodo (PEI/PAA-grafeno)_n ^[12]

O biossensor proposto exibiu excelente linearidade ($R = 0,999$) na presença de glicose, com baixos valores de limite de detecção e com alta sensibilidade, fato atribuído à excelente propriedade eletroquímica do grafeno.

A imobilização da enzima GOx também pode ocorrer pela chamada ligação cruzada (*cross-linking*) com um agente bifuncional de entrecruzamento, o glutaraldeído (GA). Nesta imobilização GA reage com resíduos de lisina no exterior das proteínas ^[11]. A ideia do método é estabelecer uma ligação entre o polieletrólito e a enzima, fazendo com que a GOx fique fortemente estabilizada na superfície do eletrodo.

Desta maneira, Crespilho *et al.* ^[13] depositaram sobre ITO três bicamadas de (PVS/PAMAM-Au), seguida da eletrodeposição de hexacianoferrato de cobalto (CoHCF) e, finalmente, a glicose oxidase foi imobilizada utilizando o método *cross-linking* (Figura 4.4).

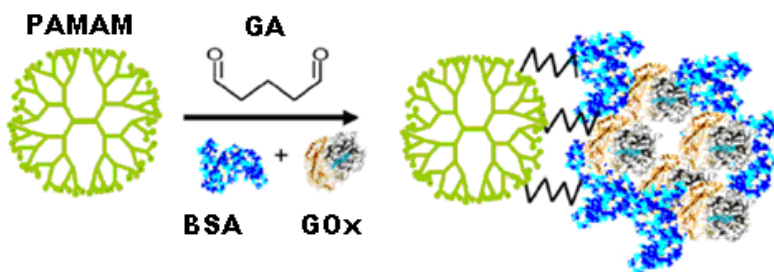


Figura 4.4: Ligação cruzada entre PAMAM e o sistema BSA/GOx usando o glutaraldeído ^[13].

Dois procedimentos de imobilização da GOx foram comparados: o *dip-coating* e o *drop-coating*. O biossensor otimizado, ITO-(PVS/PAMAMAu)₃CoHCF-GOx com GOx

imobilizada por *drop-coating* apresentou resposta cerca de 30% maiores e limite de detecção até três vezes mais baixo em comparação ao método *dip-coating*. A razão para esta diferença pode ser devido ao método de preparação. No caso da deposição por *drop-coating*, é provável a formação de um biosensor mais robusto, permitindo uma ligação mais forte entre a enzima e o dendrímero. Além disso, a quantidade de enzima imobilizada é melhor controlada por este método.

4.1.3. Utilização do nafion para a construção de biossensores enzimáticos

Outra possibilidade para imobilizar a enzima sobre a superfície dos eletrodos é a utilização de filmes de Nafion® (Nf). O Nafion®, cuja estrutura química está representada na Figura 4.5, é um polímero perfluorado de troca catiônica com unidades de tetrafluoropoliétileno ($n = 5$ a 13), ligado a um éter que se encontra por sua vez ligado a um ácido sulfônico ^[14]. O Nafion® apresenta características ideais de membrana semi-permeável, ideais para o uso em sensores e biossensores. Este é pouco solúvel em água, não condutor e quimicamente inerte, além de estabilidade térmica, resistência mecânica e propriedade anti-incrustante ^[15].

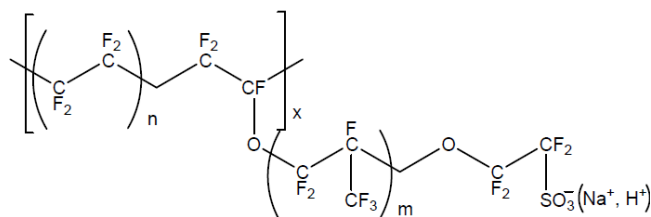


Figura 4.5: Fórmula estrutural do Nafion.

Neste sentido, Chen e colaboradores ^[16] propuseram um eletrodo modificado sobre a superfície de ouro para a formação de um biossensor de glicose. Inicialmente houve a eletrodeposição de um filme contendo quitosana, azul da Prússia, nanotubos de carbono com paredes múltiplas e nanocadeias de PtCo-HPtCo sobre o ouro. Depois desta etapa, a GOx gotejada sobre o filme e após secagem foi adicionado 3 μL de Nafion® (0,5%) para manter a estabilidade do eletrodo. A Figura 4.6 ilustra o processo de formação do eletrodo.

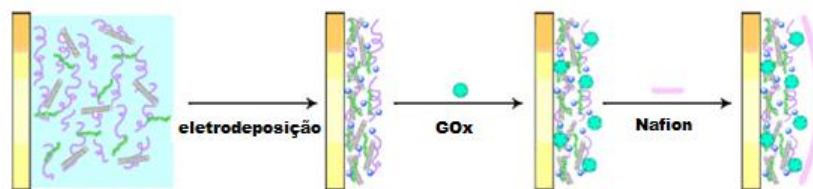


Figura 4.6: Ilustração do processo de preparação do biossensor de glicose ^[16].

O biossensor exibiu uma resposta melhor amperométrica em comparação ao eletrodo contendo somente PB. Por causa dos efeitos sinérgicos entre as MWNTs, nanocadeias de H-PtCo e PB, o biossensor apresentou excelente desempenho nos méritos de alta sensibilidade, boa estabilidade e reprodutibilidade, ampla faixa de resposta linear, tempo de resposta curto e forte capacidade anti-interferência). A reprodutibilidade do biossensor foi avaliada e observou-se um desvio padrão relativo (RSD) na presença de $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose de 3,3% para cinco medições sucessivas e reprodutibilidade de preparação para 5 eletrodos diferentes de 4,8%. A estabilidade do biossensor foi avaliada a partir de medidas sucessivas ao longo de vários dias e observou-se que não houve mudanças significativas na resposta amperométrica durante os 3 primeiros dias. Após o armazenamento de duas semanas e um mês, os biossensores apresentaram ainda 92,1% e 85,3% respectivamente da sua sensibilidade original. Outra característica importante proporcionada pela membrana de Nafion foi a minimização do efeito de potenciais interferentes, dopamina, glicina, L-cisteína, ácido ascórbico e etanol.

Em outro trabalho descrito na literatura, Ammam, M. *et al.* ^[17] sintetizaram nanopartículas de Pt suportadas em carbono (Vulcan) (Pt/C). Essa matriz foi utilizada para encapsular a glucose oxidase juntamente com uma pequena quantidade de Nafion e para a fabricação de um sensor de glicose sobre a superfície do eletrodo de CV. O sensor de glicose resultante apresentou alta sensibilidade ($1,25 \text{ } \mu\text{A/mM mm}^{-2}$), grande faixa linear de até 45mM, baixa interferência de espécies endógenas, tempo de resposta curto ($<5 \text{ s}$) e manteve-se estável durante pelo menos 1 mês, possibilitando a determinação da glicose em soro humano.

Gu e colaboradores ^[18] utilizaram a técnica da LbL para desenvolver um biossensor amperométrico de grafeno funcionalizado por ligações covalentes com uma amina (denominado, IL-RGO - polication) e com ácido sulfônico (denominado, S-RGO poliânion) sobre a superfície de carbono vítreo. O eletrodo (IL-RGO/S-RGO)₅ exibiu excelente

eletroatividade frente ao peróxido de hidrogênio. Nestas condições, o eletrodo foi imerso na suspensão de IL-RGO para introduzir a carga positiva. Em seguida, na solução de GOx com carga negativa permitindo atração eletrostática. Finalmente, o eletrodo foi revestido com uma fina camada de Nafion 0,5%. O eletrodo resultante {IL-RGO/S-RGO}₅/GOx/Nafion exibiu boa linearidade, com limite de detecção de 3,33 µM (S/N = 3), excelente estabilidade retendo quase 83% da sua atividade inicial após duas semanas de armazenamento a + 4 °C.

Em outro trabalho Gao, Q. *et al.* ^[19] automontaram sobre um eletrodo impresso de carbono o polímero redox poli(1-vinilimidazol), designado por PVI-Os (não, é o símbolo utilizado no artigo) com nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT). O eletrodo resultante PVI-Os/SWCNT foi imerso na solução de GOx durante 40 min. Com o intuito de reduzir a interferência causada por anions presentes em meios biológicos, uma fina membrana de Nafion foi adicionada sobre a superfície do eletrodo. O biossensor resultante GOx/SWCNT/PVI-Os exibiu um intervalo linear de 0,5 a 6,0 mM, sensibilidade de 16,4 µA/(mM cm⁻²), e um tempo de resposta de cerca de 5 s com limite de detecção de 0,1 mM (S/N=3). O eletrodo mostrou-se seletivo na presença dos interferentes acetamidofenol (AP), ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU), atribuída ao revestimento do biossensor com uma camada de Nf.

Este capítulo aborda, a imobilização da enzima glicose oxidase sobre filmes LbL de (SiPy⁺Cl⁻/CuPsTc)₂, recobertos com filme de Nafion®. Inicialmente, os parâmetros eletroquímicos na presença do produto da reação enzimática (peróxido de hidrogênio) para o filme automontado de (SiPy⁺Cl⁻/CuPsTc)₂ foram otimizados, a fim de verificar as melhores condições para o desenvolvimento e caracterização do biossensor enzimático.

4.2. PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados nos experimentos são de pureza analítica (PA), a enzima glicose oxidase (GOx, 155 unidades/mg), Nafion® (Nf, 5% etanólica), foram obtidos da Sigma Aldrich e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 35 % v/v) da Dinâmica.

4.2.2. Detecção do Peróxido de Hidrogênio

As soluções padrão de H_2O_2 $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas antes da realização das medidas. O eletrólito de suporte utilizado foi tampão PBS (pH 6,5). Os estudos eletroquímicos foram realizados utilizando-se potenciostato PalmSens[®] (Palm Instrument BV), com célula eletroquímica convencional de três eletrodos: eletrodo de referência de Ag/AgCl, fio de Pt como eletrodo auxiliar e filme LbL ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$)_n como eletrodo de trabalho, com 1 cm^2 de área geométrica. A resposta voltamétrica dos filmes ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$)_n foi estudada em função do número de bicamadas ($n = 1$ a 10) para verificar qual o número de bicamadas apresentava a melhor atividade eletrocatalítica para redução de H_2O_2 . Um estudo comparativo com o substrato de FTO (Flexitec, $R_s = 10\text{-}20 \Omega$) filmes tipo *cast* de SiPy^+Cl^- e CuTsPc e filme LbL ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$)₂ foi realizado a fim de verificar a viabilidade da utilização do filme como sensor eletroquímico. O estudo do efeito do pH sobre a resposta do eletrodo, foi avaliado em soluções tampão PBS pH 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0, empregando-se a técnica de voltametria cíclica.

A partir da escolha do número de bicamadas e melhor pH, ensaios amperométricos com potencial fixo entre -0,40 e 0,00 V foram realizados a fim de avaliar em que potencial a redução do peróxido de hidrogênio ocorria com melhor resposta de corrente. Escolhido o potencial, curvas analíticas foram obtidas adicionando-se alíquotas de 50 μL de uma solução estoque de H_2O_2 $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. O desvio padrão da corrente média de dez brancos (S_b) e a inclinação da reta da curva analítica estatística (s) foram empregados para calcular os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), usando as equações $\text{LD} = 3 S_b/s$ e $\text{LQ} = 10 S_b/s$ recomendadas pela IUPAC [20]. A precisão e a exatidão da metodologia desenvolvida foram avaliadas por meio de experimentos de repetibilidade envolvendo cinco medidas ($n = 5$) amperométricas sucessivas de uma mesma solução de H_2O_2 $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Já para os testes de reprodutibilidade de medida foram efetuadas 5 medidas ($n = 5$) em soluções diferentes de tampão PBS pH = 6,5, na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 . A partir dos dados obtidos foi calculado o desvio padrão relativo. Antes de todas as medidas foi realizada a remoção prévia do oxigênio por meio do fluxo de gás N_2 .

4.2.3. Preparação do biossensor de glicose

O biossensor de glicose foi preparado como mostrado na Figura 4.7. Inicialmente uma nova camada do polycation SiPy^+Cl^- foi adicionada sobre o filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2$. Em seguida, o eletrodo $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)$ foi lavado com água destilada e seco ao ar. Depois 15 μL da solução GOx, correspondendo 50 U (2 mg GOx foram dissolvidos em 100 μL de tampão PBS 0,1 mol L^{-1} , pH 6,5) foram gotejados sobre o eletrodo e deixado secar à temperatura ambiente. Finalizando, o eletrodo foi revestido com 10 μL de uma solução 0,3% de Nafion[®]. O eletrodo resultante foi designado $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx}/\text{Nf})$. Como experimentos de controle, o eletrodo $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx}/\text{Nf})$, $(\text{CuTsPc}/\text{GOx}/\text{Nf})$ e $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PSS})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx}/\text{Nf})$ foram fabricados.

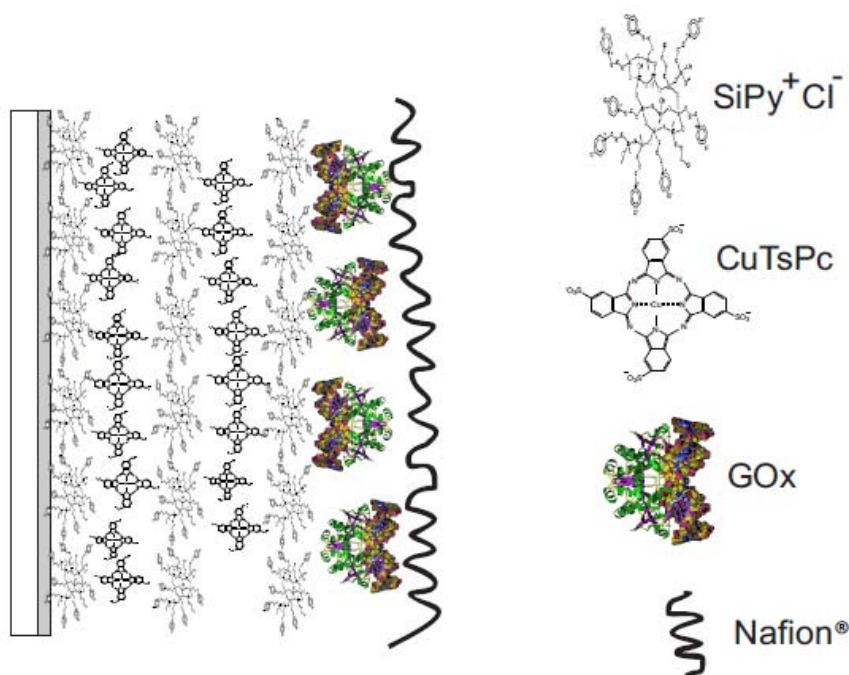


Figura 4.7: Ilustração do processo de preparação do biossensor de glicose $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PSS})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx}/\text{Nf})$

4.2.4. Caracterização do Biossensor

4.2.4.1 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS)

Os experimentos de EIS foram realizadas em meio de tampão PBS 0,1 mol L^{-1} contendo 8 mmol L^{-1} $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (1:1) à temperatura ambiente, utilizando uma amplitude de 5 mV, e frequência aplicada na faixa de 10 kHz e 0,1 Hz.

4.2.4.2 Espectroscopia de fluorescência

Com o intuito de avaliar a presença da GOx sobre o filme LbL (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂(SiPy⁺Cl⁻/GOx/Nf) depositados sobre quartzo, medidas de fluorescência foram realizadas, fixando-se o comprimento de onda de excitação em $\lambda = 280$ nm, pois o aminoácido triptofano apresenta absorção por volta de 280 nm e emissão por volta de 340 nm e é o aminoácido mais sensível nas proteínas. As medidas de fluorescência foram realizadas num espectrofluorímetro ISS K₂.

4.2.4.3 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

Os espectros de FTIR foram obtidos no modo de transmissão, na região 4000-400 cm⁻¹ com espectrômetro da SHIMADZU modelo 8400 FTIR. A resolução espectral foi fixada em 2 cm⁻¹ e 140 scans foram realizados para cada espectro. Obteve-se os espectros para os filmes (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂, (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂(SiPy⁺Cl⁻/GOx/Nf) e *cast* da enzima GOx sobre substrato de silício.

4.2.4.4 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

A estrutura secundária de uma molécula pode ser determinada pela espectroscopia Dicroísmo Circular (CD), que se baseia na diferença de absorção entre a luz circulamente polarizada à esquerda e luz circulamente polarizada à direita, em moléculas opticamente ativas (com centro quiral), como por exemplo, dendrímeros, carboidratos e proteínas. Quando a molécula interage com a luz circulamente polarizada provoca uma alteração nesta luz incidente. A técnica do CD está baseada nesta alteração da luz incidente ^[4].

O dicroísmo circular está na região do espectro eletromagnético referente ao extremo ultravioleta cujo comprimento de onda se estende de 190 a 250 nm e possibilita determinar a composição de misturas quirais, mudanças conformacionais da estrutura secundária de macromoléculas (α -hélice, fitas- β , voltas e estruturas não ordenadas), bem como a interação dessas macromoléculas com outras moléculas menores, principalmente as aquirais ^[4]. A Figura 4.8 mostra os espectros de CD de proteínas compostas por diferentes tipos de estrutura secundária.

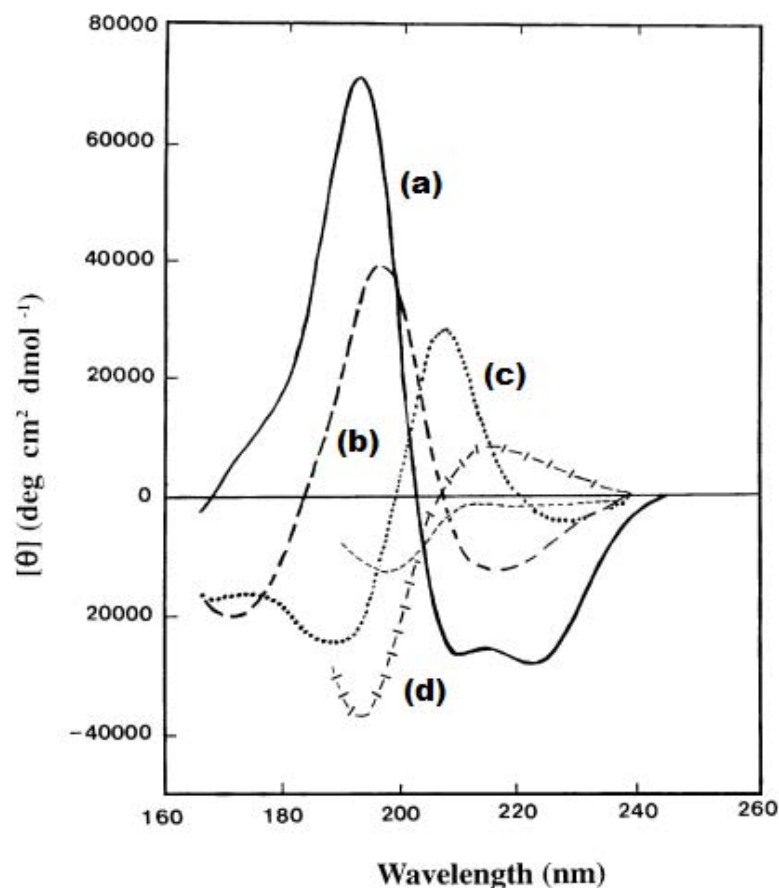


Figura 4.8: Espectros de CD característicos de diferentes conformações das enzimas: (a) α -hélice; (b) folha- β ; (c) volta β e (d) irregular.

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).

A estrutura secundária da enzima antes e após sua imobilização foi avaliada por experimentos de CD. Os espectros foram obtidos por um espectropolarímetro Jasco (J-815), na faixa de 195 a 250 nm. Foram realizadas medidas para os filmes sem e com a GOx imobilizada $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2$ e $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx}/\text{Nf})$, respectivamente, sobre substrato de quartzo. Para efeito de comparação obteve-se o espectro para solução de GOx (0,015 mg/mL).

4.2.5 Estudos amperométricos do biossensor

4.2.5.1 Estudo da estabilidade e reprodutibilidade do biossensor

Para a determinação do tempo de vida útil do biossensor, realizou-se o monitoramento da resposta dos dispositivos, dia após dia, usando o mesmo eletrodo de trabalho, durante 30 dias. Durante a avaliação do tempo de vida do biossensor, a estocagem foi realizada a 4 °C, em meio de tampão PBS pH = 6,5. Para tal, todos os dias a resposta amperométrica do biossensor na presença de 1 mmol de glicose foi obtida. Após este estudo, a reprodutibilidade de preparação do biossensor foi avaliada por meio da resposta amperométrica de diferentes eletrodos preparados nas mesmas condições (como descrito na sessão 4.2.3.) em tampão PBS pH 6,5, na presença de 1 mmol L⁻¹ de glicose.

4.2.5.2 Desenvolvimento da Metodologia Analítica para o Biossensor

Determinadas as condições para o desenvolvimento do biossensor, construíram-se as curvas analíticas adicionando-se alíquotas de 100 µL de uma solução estoque de glicose 0,1 mol L⁻¹ na faixa de 1 a 10 mmol L⁻¹. As medidas amperométricas para detecção de glicose foram realizadas em um Potenciostato-galvanostato modelo Autolab-PGSTAT 100, aplicando-se um potencial fixo de -0,10 V, em tampão PBS pH = 6,5.

4.2.5.3 Análise de interferentes

Um dos fatores de análise mais importantes para um biossensor amperométrico é a seletividade do sensor em direcionar o analito. Neste estudo, alguns potenciais interferentes, dopamina (DA), ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU) foram usados para conduzir o teste de interferência. A resposta amperométrica foi obtida por injeção sucessiva de 1 mmol L⁻¹ de glicose e espécies interferentes (5 x 10⁻⁵ mol L⁻¹).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Detecção do Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

A detecção do H₂O₂, gerado pela reação catalítica das enzimas oxidases, é a principal ferramenta de detecção em biossensores amperométricos, pois sua concentração é diretamente proporcional à concentração do substrato (analito) da enzima. Uma maneira indireta de verificar o comportamento enzimático é determinar a quantidade deste subproduto formado.

Neste sentido, a detecção de peróxido de hidrogênio foi realizada, acompanhando sua redução segundo a Equação 4.1:



Inicialmente, a técnica de voltametria cíclica foi empregada para confirmar a viabilidade de aplicação do eletrodo modificado pela técnica LbL como sensor eletroquímico para este analito. Um estudo comparativo foi realizado entre o filme LbL e os polieletrólitos SiPy⁺Cl⁻ e CuTsPc sob a forma de filme *cast* e com o substrato de FTO. Como pode ser observado na Figura 4.9, todos os filmes e o substrato de FTO apresentaram eletroatividade na redução de H₂O₂. Percebe-se que, para o substrato de FTO, que o processo de redução é menos definido e ocorre em potenciais mais negativos (-0,43 V) quando comparado ao filme LbL. O mesmo comportamento é apresentado pelo filme *cast* do polielectrolito SiPy⁺Cl⁻. Entretanto para a ftalocianina um processo de redução com maior intensidade de corrente e mais bem definido é observado em torno de -0,39 V. Para o filme (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂, obteve-se maiores valores de corrente em relação aos demais eletrodos (filmes *cast* dos polieletrólitos e para o substrato FTO). Além disso, o filme LbL apresentou o pico de redução para o H₂O₂ em potenciais menos negativos (-0,35 V) comparado com os polieletrólitos, que exibiram um potencial de -0,39 V. Observou-se ainda que o filme LbL mostrou-se altamente estável sobre a superfície do substrato, mantendo sua resposta por mais de cem ciclos de varredura, diferentemente dos filmes contendo somente os polieletrólitos, os quais lixiviam para a solução, após dez sucessivas varreduras.

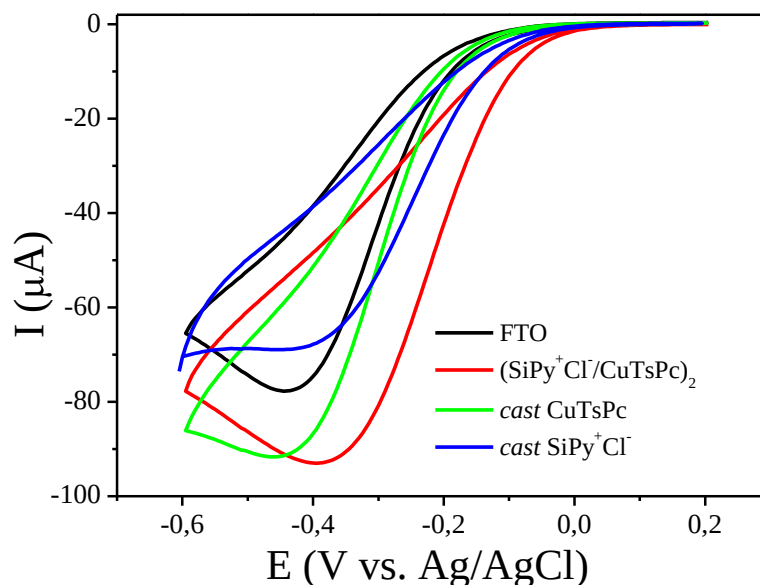


Figura 4.9: Voltamogramas cíclicos para o substrato FTO, filmes *cast* de CuTsPc e SiPy⁺Cl⁻ e filme LbL (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂ na presença de [H₂O₂] = 4,76 x 10⁻⁴ mol L⁻¹, ν = 50 mV s⁻¹, em tampão PBS, pH = 6,5.

Para verificar a influência do número de bicamadas na resposta eletrocatalítica frente a H₂O₂, voltamogramas cíclicos foram obtidos com o eletrodo (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)_n, com n = 1 a 10. Observou-se um processo catódico em torno de -0,35 V para os diferentes números de bicamadas (Figura 4.10). No entanto, foi constatado que a corrente não aumentou de maneira linear com o número de bicamadas. Dentre os filmes analisados, aquele contendo duas bicamadas, foi o que apresentou o maior acréscimo de corrente na presença do H₂O₂. Para as demais bicamadas, o decréscimo no valor de corrente pode ser atribuído a um aumento na resistividade do material uma vez que com o aumento no número de bicamadas, uma maior quantidade de material é depositada, aumentando a espessura do filme o que dificulta a transferência eletrônica. Isto já foi observado em outro estudo para determinação de dopamina [21].

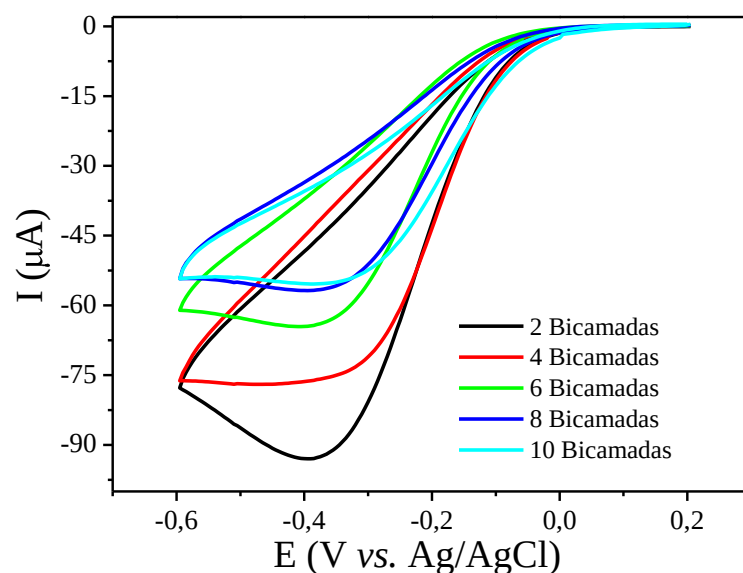


Figura 4.10: Voltamogramas cíclicos para o filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_n$ onde $n = 2, 4, 6, 8, 10$, na presença de $[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, em tampão PBS, $\text{pH} = 6,5$.

A dependência do pH sobre a redução eletroquímica do H_2O_2 foi estudada por voltametria cíclica no intervalo de 5,0 até 7,0 na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 em tampão PBS. A escolha da faixa de pH deve-se ao fato de que posteriormente a enzima glicose oxidase será imobilizada nas condições otimizadas para a determinação do peróxido de hidrogênio. Sabe-se ainda que o pH ótimo para glicose oxidase é de 5,5, porém ela possui ampla atividade de pH 4,0 a 7,0 ^[22]. A Figura 4.11 mostra os voltamogramas cíclicos do filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2$ em diferentes pH.

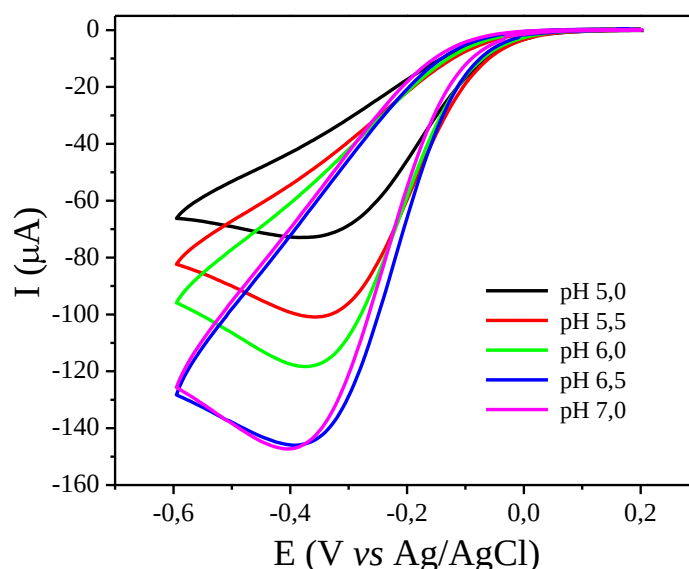


Figura 4.11: Voltamogramas cíclicos para o filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2$, em diferentes valores de pH, na presença de $[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, em tampão PBS, pH = 6,5.

Observa-se que com o aumento do pH, a corrente aumentou do pH 5,0 a 6,5, estabilizando em pH 7,0. Assim, o pH 6,5 foi selecionado como pH de trabalho, pois este apresentou maior definição do pico de redução, além de ser um valor de pH mais próximo ao qual a enzima glicose oxidase possui ampla atividade. Estes resultados estão de acordo com a literatura, pois vários são os trabalhos que reportam a determinação de H_2O_2 sobre filmes LbL em pHs que variam de 6,5 a 8,0 ^[10,12,23].

Com a finalidade de se evidenciar o tipo de transporte de massa envolvido no processo de redução do peróxido de hidrogênio, foi realizado um estudo de variação da velocidade de varredura de potencial utilizando a técnica de VC. As velocidades de varredura foram variadas em um intervalo de 10 - 100 mV s^{-1} , em tampão PBS (pH = 6,5) contendo $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 (Figura 4.12). Observou-se que a corrente de pico catódica (I_{pc}) aumenta com o aumento da velocidade de varredura.

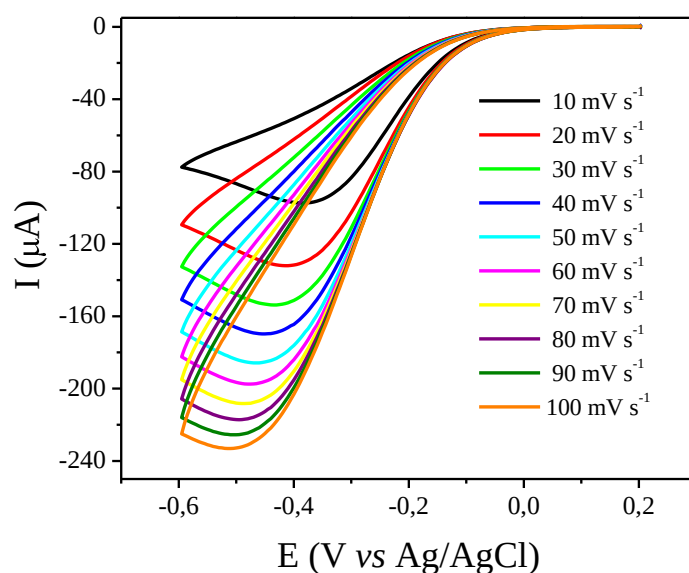


Figura 4.12: Voltamogramas cíclicos para o filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2$, em diferentes em diferentes velocidades de varredura (10 a 100 mV s^{-1}), na presença de $[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, em tampão PBS, pH = 6,5.

A Figura 4.13 A e B mostra a variação I_{p_c} como função da velocidade de varredura (v) e da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$), respectivamente. A I_{p_c} do eletrodo $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2$ obteve uma maior linearidade com a $v^{1/2}$, descrita pela equação: $I_{p_c} (\mu\text{A}) = 43,727 + 19,474 v (\text{mV s}^{-1})$, com $R = 0,996$. Tais resultados permitem concluir que o processo eletroquímico é controlado por difusão da espécie eletroativa até a superfície do eletrodo.

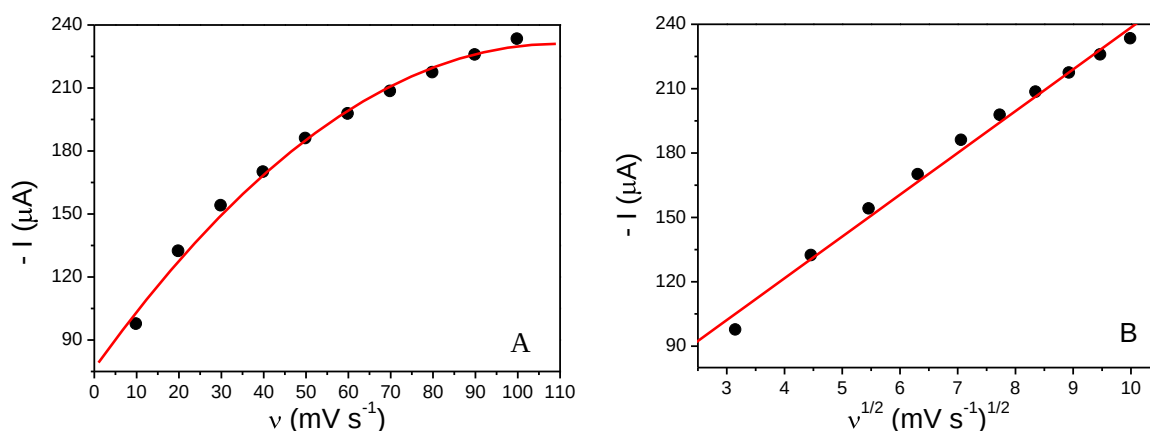


Figura 4.13: Variação da intensidade de corrente de pico: (A) com a velocidade de varredura, (B) com a raiz quadrada da velocidade de varredura na presença de $[\text{H}_2\text{O}_2] = 4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão PBS pH = 6,5.

Para definir o melhor potencial para a redução eletroquímica de H_2O_2 foram realizados estudos a partir da técnica de amperometria. A partir dos voltamogramas (Figura 4.9) na presença de H_2O_2 , pode-se observar que já a partir do potencial 0,0 V inicia-se redução de H_2O_2 . Portanto experimentos amperométricos em potenciais fixos foram realizados na faixa de 0,0 V a -0,40 V (vs. Ag/AgCl). O filme exibiu resposta amperométrica para H_2O_2 para todos os potenciais estudados. As curvas de calibração do eletrodo são mostrados na Figura 4.14.

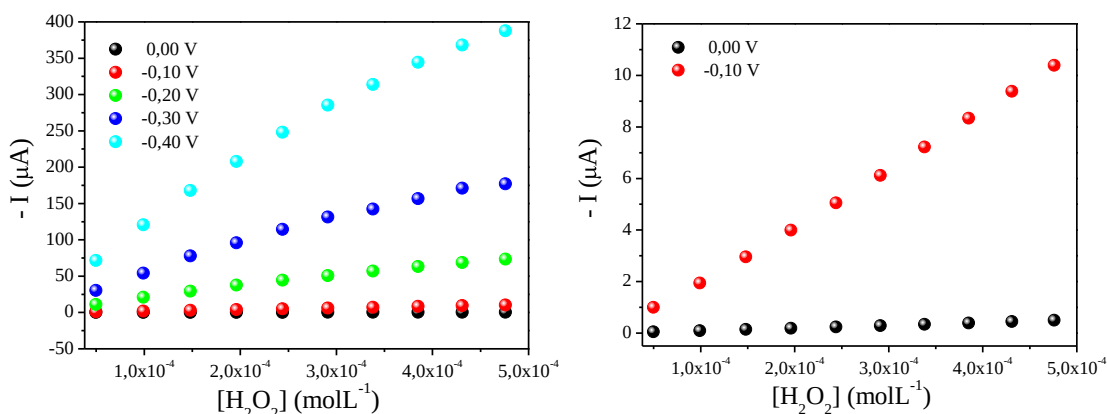


Figura 4.14: Curvas de corrente vs. $[\text{H}_2\text{O}_2]$ para o eletrodo $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2$ com adições sucessivas de 100 μL de H_2O_2 , em tampão PBS pH = 6,5.

Dentro da faixa de concentração estudada de $9,90 \times 10^{-5}$ a $5,66 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, a resposta amperométrica é linear em função da concentração para todos os potenciais. Embora o sensor apresente uma maior sensibilidade em -0,40 V é preferível um baixo potencial (menos negativo) a fim de evitar ou reduzir a interferência causada por algumas espécies eletroativas e fazer os níveis de ruído de fundo atingir valores mais baixos. Assim, -0,10 V, foi escolhido como o potencial a ser aplicado para as medidas amperométricas. Estes resultados corroboram com a literatura, pois é reportado que a redução do peróxido de hidrogênio (Equação 1) sobre diferentes eletrodos (incluindo filmes LbL) ocorre na faixa entre de -0,1 a -0,60 V ^[8,24,25,26].

Após a otimização dos parâmetros, número de bicamadas, pH e potencial a ser aplicado (2 bicamadas, pH = 6,5 e -0,10 V), curvas analíticas foram obtidas no intervalo de $4,97 \times 10^{-6}$ a $4,76 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 4.15 apresenta o cronoamperograma que mostra a dependência da corrente de redução do H_2O_2 com o aumento da sua concentração. Ainda na Figura 4.15 está inserida a curva analítica construída por meio da média das correntes de redução vs a concentração. Pode-se observar que após sucessivas adições de H_2O_2 , a corrente

de redução aumenta linearmente, com o aumento da concentração de H_2O_2 . O limite de detecção foi calculado utilizando-se o desvio padrão da média aritmética de dez amperogramas de brancos. O LD obtido foi de $0,33 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Além do limite de detecção, o limite de quantificação também foi avaliado. O valor de LQ obtido foi $1,11 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Resultados semelhantes foram obtidos para o eletrodo CV/(IL-RGO/S-RGO)₅, onde grafeno foi funcionalizado por ligações covalentes com uma amina (IL-RGO) e com ácido sulfônico (S-RGO). O eletrodo exibiu excelente linearidade com $R = 0,995$ e LD de $0,21 \mu\text{mol L}^{-1}$ [18].

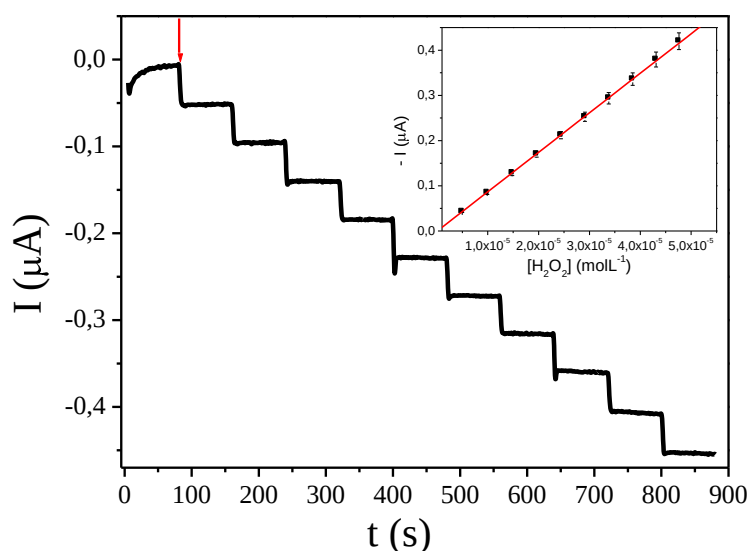


Figura 4.15: Resposta amperométrica para H_2O_2 em um eletrodo de $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2$ em tampão PBS pH = 6,5, em potencial fixo de -0,10 V. Figura inserida: dependência entre a corrente e a concentração de H_2O_2 .

4.3.6. Estudo da Repetibilidade e Reprodutibilidade de Medida do sensor

As medidas de repetibilidade do sensor $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2$ foram realizadas em uma série de 5 medidas ($n = 5$) numa mesma solução, na concentração de H_2O_2 $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão PBS pH 6,5, onde o RSD foi de 0,26%. Para os testes de reprodutibilidade do método foram efetuadas 5 medidas ($n = 5$) em soluções diferentes, de mesma concentração ($4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), onde o RSD foi de 12,6%.

4.3.2. Caracterização do biossensor

4.3.2.1. Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS)

A imobilização de GOx sobre o filme LbL foi primeiramente analisada por espectroscopia de impedância eletroquímica. Esta técnica tem sido utilizada para caracterizar a formação de filmes multicamadas na superfície do eletrodo ^[27]. Na EIS, o diâmetro do semicírculo no espectro de impedância se refere a resistência de transferência de elétrons (Ret) da solução até a superfície do eletrodo ^[28]. A Figura 4.16 mostra o gráfico de Nyquist obtido para eletrodo somente do substrato de FTO, para o filme (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂ e para o biossensor (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂(SiPy⁺Cl⁻/GOx/Nf) na presença de 8 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]^{4-/3-} em meio de solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹.

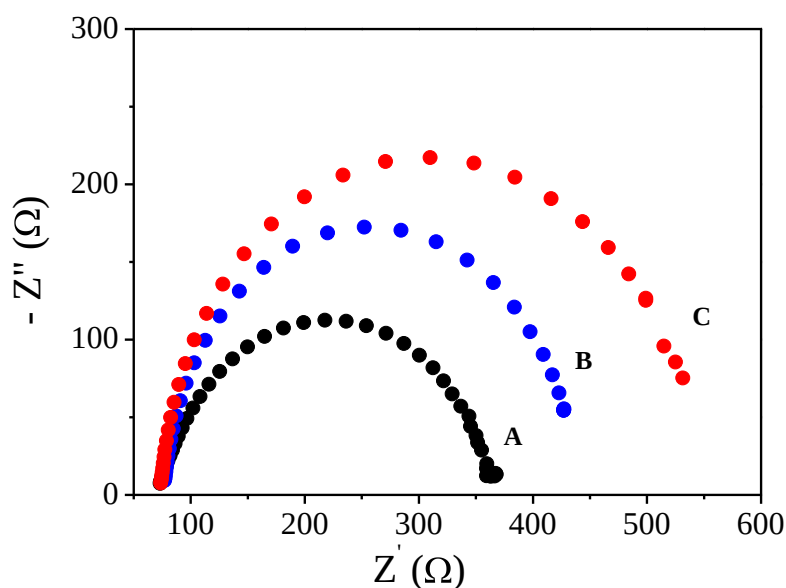


Figura 4.16: Diagramas de Nyquist dos diferentes eletrodos (A) FTO, (B) filme (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂ e (C) biossensor (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂(SiPy⁺Cl⁻/GOx/Nf) em meio de 8 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{4-/3-}.

Como pode ser visto, foram observadas diferenças significativas nos resultados de impedância durante o processo de modificação do substrato de FTO. O eletrodo somente do substrato (FTO) exibiu um pequeno semicírculo (curva A, o valor da resistência foi de 295,72 Ω), o que implica numa baixa resistência a transferência de elétrons. Após a deposição do filme LbL (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂ sobre o FTO, o diâmetro do semicírculo aumentou (curva B, e a Ret aumentou para 367,97 Ω), mostrando que o filme LbL bloqueou a transferência eletrônica. Quando a GOx e o Nf foram imobilizados no eletrodo modificado com o filme

LbL, o valor da resistência aumentou para 478,50 Ω , aumentando ainda mais a resistência de transferência eletrônica (curva C). A GOx e o Nf criaram uma camada de isolamento sobre a superfície do eletrodo que fez bloquear a transferência de elétrons, por conseguinte, aumentar a impedância do eletrodo. Este aumento sugere que os filmes de GOx e Nf exibem propriedades não condutoras. A alteração nos valores de resistência obtida após o processo de imobilização do filme LbL ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$)₂, GOx e Nf prova que foram sucessivamente depositados na superfície do FTO. A literatura reporta comportamento semelhante, para os eletrodos sem modificação, onde estes apresentam menor resistência em comparação com o biossensor proposto. Che, X. *et al.* mostram para um eletrodo de ouro que a resistência a transferência de elétrons inicial foi de 97 Ω . Após a imobilização da enzima GOx, a resistência aumentou para 272 Ω ^[16], ao passo que Wang, C. observou uma baixa resistência (134 Ω) para o eletrodo CG e após a imobilização da GOx, um aumento (513 Ω) foi notado ^[29]. Estas modificações na resistência sugerem a eficiente imobilização da enzima sobre a superfície do eletrodo, uma vez que existe um efeito de inibição da macromolécula para o processo de transferência de elétrons.

4.3.2.2. Espectroscopia de fluorescência

A fim de determinar a imobilização da enzima GOx no filme LbL, espectros de fluorescência da solução (0,015 mg/mL) e da GOx imobilizada na superfície do filme foram obtidos (Figura 4.17). As proteínas em geral contêm aminoácidos que agem como cromóforos intrínsecos, como o triptofano, a tirosina e a fenilalanina. O triptofano é o fluoróforo mais intrínseco que contribui para o espectro de emissão destas macromoléculas. A tirosina tem uma emissão semelhante ao triptofano, mas o seu espectro de emissão está mais estreitamente distribuído na escala de comprimento de onda. O triptofano absorve em cerca de 295 nm e tem o seu máximo de emissão em água perto de 350 nm ^[30]. O espectro de fluorescência da solução da Gox (Figura 4.17 A) exibiu uma banda intensa em 327 nm referente à emissão do amino ácido triptofano. O filme ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$)₂($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx-Nf}$) apresentou emissão, com uma banda bem definida em 330 nm (Figura 4.17 B). Tal emissão também está relacionada ao triptofano, uma vez que os filmes ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$)₂ não apresentam emissão nesta faixa, comprovando que a GOx foi imobilizada na superfície do eletrodo.

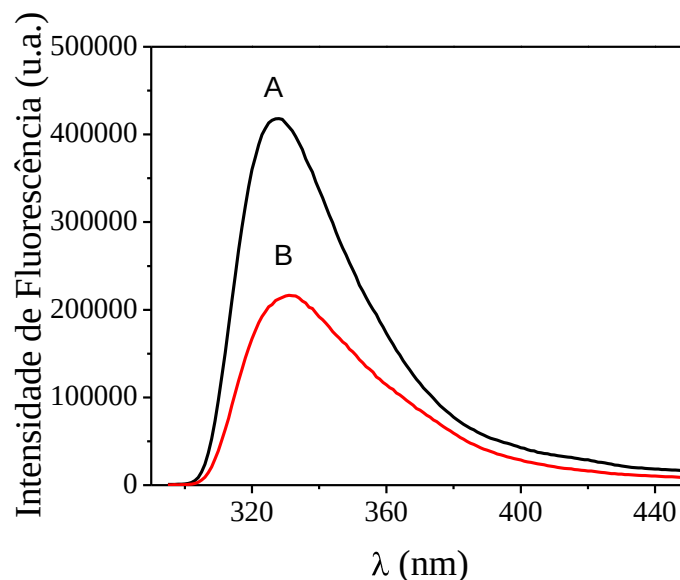


Figura 4.17: Espectros de fluorescência para (A) solução de GOx (0,015 mg/mL) em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹, pH = 6,5 e para o filme (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂(SiPy⁺Cl⁻/GOx-Nf).

4.3.2.3. Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

Complementando a espectroscopia de fluorescência, espectros de FTIR foram obtidos para o filme LbL (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂ (espectro A), *cast* da GOx (espectro B) e do filme LbL contendo a GOx imobilizada (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂(SiPy⁺Cl⁻/GOx-Nf) (espectro C) (Figura 4.18). Os espectros para o filme LbL (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂ apresentou as bandas características do polieletrólito SiPy⁺Cl⁻ e da CuTsPc com intensidades diferentes (Figura 4.18 A), tal como relatado na literatura ^[21]. Nas Figuras 4.18 B e C, são relatados os espectros para a enzima GOx nativa e para o biossensor (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂(SiPy⁺Cl⁻/GOx-Nf), respectivamente. As bandas de vibração de amida I (atribuída as vibrações de C=O nas ligações peptídicas da estrutura da proteína) e as de amida II (resultante de uma combinação de NH em flexão no plano e CN dos grupos de peptídeos), da GOx nativa, 1650 e 1536 cm⁻¹, sofreram deslocamento para 1654 e 1546 cm⁻¹, respectivamente quando esta foi imobilizada na superfície do filme. Estas pequenas mudanças são indicativos de possíveis interações eletrostáticas entre a superfície do filme (carregado positivamente) com a GOx (carregada negativamente). A presença das bandas de amida I e II são indicativos de que possivelmente a estrutura secundária e a bioatividade da enzima GOx são preservadas após a sua imobilização no filme LbL. Estes resultados são consistentes com outros trabalhos relatados na literatura ^[31,32,33].

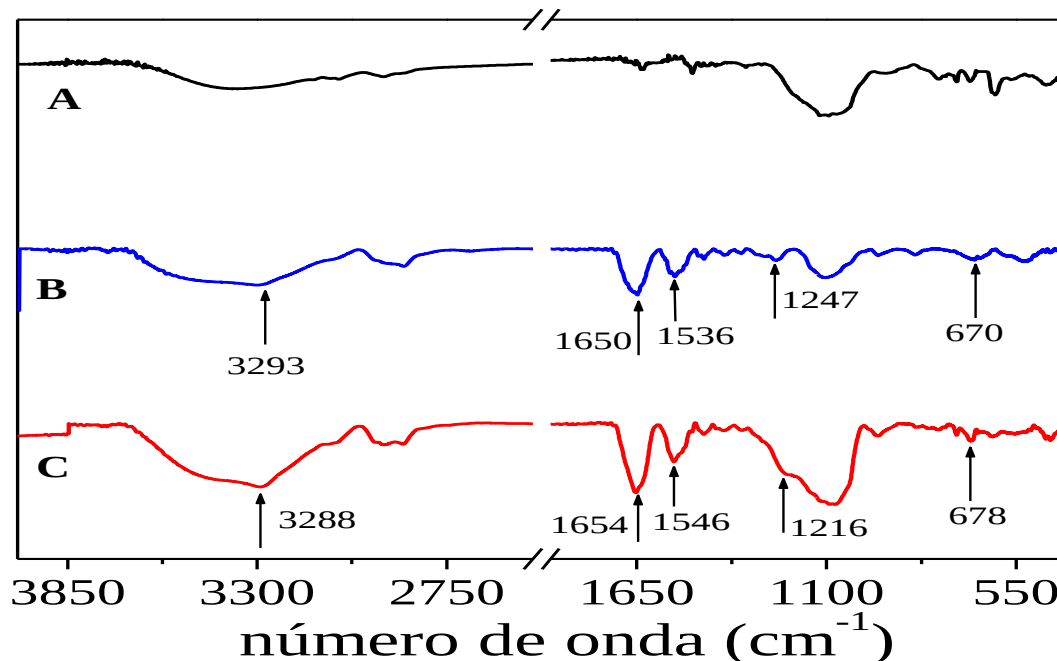


Figure 4.18: (A) Espectro de FTIR para o filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2$, (B) Filme *cast* GOx e (C) $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx}/\text{Nf})$ sobre silício.

Além destas bandas, também podem ser observadas as bandas relacionadas com a amida A (a 3293 cm^{-1}), amida III (1247 cm^{-1}), amida IV e/ou amida V (a 670 cm^{-1}) para GOx nativa, que são deslocadas para a GOx imobilizada em 3288 , 1216 e em 678 cm^{-1} , respectivamente ^[34]. A banda de amida A é essencialmente devido à vibração de alongamento de N-H. A banda de amida III depende de parâmetros como o campo de força, a natureza das cadeias laterais e de ligações de hidrogênio. As bandas de amida IV e V estão relacionadas aos esterimamentos OCN e N-H fora do plano, respectivamente ^[34]. Também é observada uma banda larga de cerca de 1000 cm^{-1} para o filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx-Nf})$, que é, provavelmente, devido à contribuição dos estiramentos Si-OC, Si-O, CO e SO_3 dos precursores do filme (SiPy^+Cl^- , CuTsPc e Nafion[®]). Na Tabela 4.1, estão descritas as atribuições das principais bandas para os espectros de FTIR da GOx livre e imobilizada sob o filme LbL.

Tabela 4.1: Atribuição das principais bandas (cm^{-1}) para os espectros de FTIR da GOx livre e imobilizada no filme LbL.

Atribuições	GOx livre	GOx imobilizada
Amida A	3293	3293
Estiramento assimétrico de CH no CH_3	2957	2958
Estiramento assimétrico de CH no CH_2	2928	2931
Estiramento simétrico de CH no CH_3	2874	2875
Estiramento C=O de amida I	1650	1654
Flexão N-H de amida II	1536	1546
Flexão C-H no CH_3	1395	1397
Amida III	1247	1216
Estiramento C-O	1090	1091
Amida IV e/ou Amida V	670	678

4.3.2.4. Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

Espectros de dicroísmo circular (CD) têm sido amplamente utilizados para analisar as propriedades e as principais características de soluções enzimáticas e destas imobilizadas em filmes ^[32]. Os espectros de CD de proteínas imobilizadas indicam se após a imobilização houve o desnovelamento da estrutura da proteína e conseqüentemente sua desnaturação. Desta forma, espectros de CD foram utilizados para caracterizar a estrutura secundária da GOx após imobilização nos filmes automontados. A Figura 4.19 mostra o espectro de CD da solução de GOx (0,015 mg/mL) e para os filmes $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2$ e $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)$

/GOx-Nf). A estrutura secundária das proteínas quando em α -hélice exibem três transições características na região de 190-250 nm, no espectro de CD. Estas correspondem às transições eletrônicas do tipo $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ [35]. Há uma banda fraca e ampla referente à transição $n \rightarrow \pi^*$, centrada em torno de 210 nm e uma intensa em 190 nm, referente a transição $\pi \rightarrow \pi^*$. Esta última indica a presença de elementos helicoidais da estrutura secundária da proteína, de acordo com o que tem sido relatado na literatura [36].

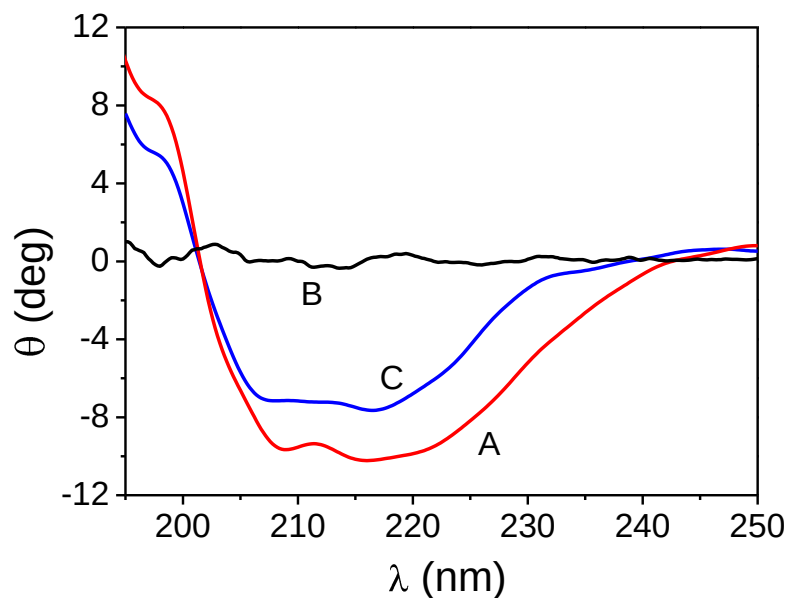


Figure 4.19: Espectros de CD para (A) solução de GOx em tampão PBS 0,1 M, pH = 6,5, (B) filme (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂ e (C) filme (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂(SiPy⁺Cl⁻/GOx/Nf).

O espectro de CD do filme (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂ não apresentou nenhuma transição característica (Figura 4.19 B). No entanto, o espectro do biossensor (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂ (SiPy⁺Cl⁻/GOx/Nf) é semelhante ao da GOx pura (Fig. 4.19 A), o que indica que a mesma foi adsorvida sobre a superfície do filme automontado (Figura 4.19 C). Outro indicativo desta semelhança entre os espectros é que a estrutura secundária em α -hélice foi preservada após imobilização. Comportamento semelhante foi observado por Zucolotto *et al* [37] após a imobilização de Cl-catecol 1,2-dioxigenase (CCD) em filmes nanoestruturados automontados. Também é evidente a ocorrência de deslocamento das bandas de absorção no espectro da solução da enzima em relação a mesma imobilizada no filme LbL (de 206 para 208 nm e de 216 para 222 nm, respectivamente). Isto pode estar relacionado com as possíveis interações entre a enzima GOx, com a superfície do filme.

4.3.3. Biossensor para glicose

Com base na elevada atividade eletrocatalítica para H_2O_2 do filme (uma vez que este é um dos produtos da reação de várias enzimas) e comprovada a eficiente imobilização da GOx sobre o filme LbL, medidas amperométricas foram realizadas na presença de glicose. Inicialmente, com o intuito de verificar a atividade eletrocatalítica frente a glicose diferentes filmes foram investigados. Inicialmente realizaram-se as medidas para os filmes contendo somente os polieletrólitos ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx-Nf}$) e ($\text{CuTsPc}/\text{GOx-Nf}$) e um experimento de controle ($(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PSS})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx-Nf})$). O polieletrólito de carga negativa (PSS) foi usado no lugar de ftalocianina a fim de explorar suas propriedades eletrocatalíticas. Pode-se observar pela Figura 4.20 que todos os filmes exibiram resposta frente a glicose. Para o eletrodo ($(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PSS})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx-Nf})$), o sinal amperométrico respondeu rapidamente com a alteração da concentração de glicose, atingindo um estado estável em 5 s. O experimento de controle ($(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{PSS})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx-Nf})$) confirma que a ftalocianina é responsável pela elevada atividade eletrocatalítica nos filmes ($(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx-Nf})$), uma vez que este mostrou-se sensível apenas na primeira adição de glicose, mantendo sua corrente constante nas demais adições. No entanto, ambos os eletrodos ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx-Nf}$) e ($\text{CuTsPc}/\text{GOx-Nf}$) exibiram uma pequena resposta para glicose, comparando-se estes eletrodos, o filme da ftalocianina apresentou maiores valores de correntes de redução, mostrando sua excelente atividade eletrocatalítica para a glicose, em comparação com o filme contendo somente o SiPy^+Cl^- . Considerando que, um aumento drástico da corrente de resposta foi observada para o eletrodo ($(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx-Nf})$), este resultado demonstrou que o biossensor baseado na interação entre SiPy^+Cl^- e CuTsPc exibiram uma melhor atividade eletrocatalítica de glicose atribuída ao efeito sinérgico ocorrido pela interação entre os polieletrólitos, promovendo uma excelente transferência de elétrons entre a enzima e a superfície do eletrodo.

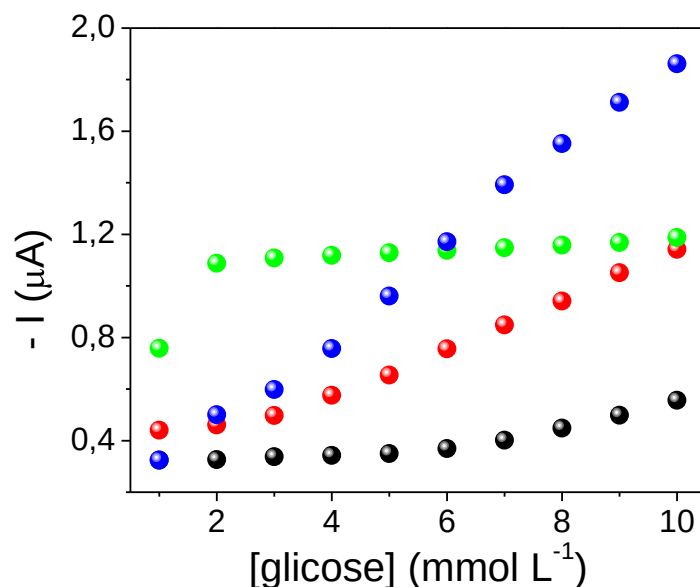


Figure 4.20: Curvas de calibração para os filmes *cast* (●) (SiPy⁺Cl⁻/GOx-Nf), (●) (CuTsPc/GOx-Nf), (●) LbL (SiPy⁺Cl⁻/PSS)₂(SiPy⁺Cl⁻/GOx-Nf) e (●) LbL (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂(SiPy⁺Cl⁻/GOx-Nf), com sucessivas adições de 1 mmol L⁻¹ de glicose.

A Figura 4.21 A, apresenta o cronoamperograma que mostra a dependência da corrente de redução do peróxido com a adição de glicose. Ainda na A Figura 4.21 está a curva de calibração com sucessivas adições de 1 mmol L⁻¹ de glicose.

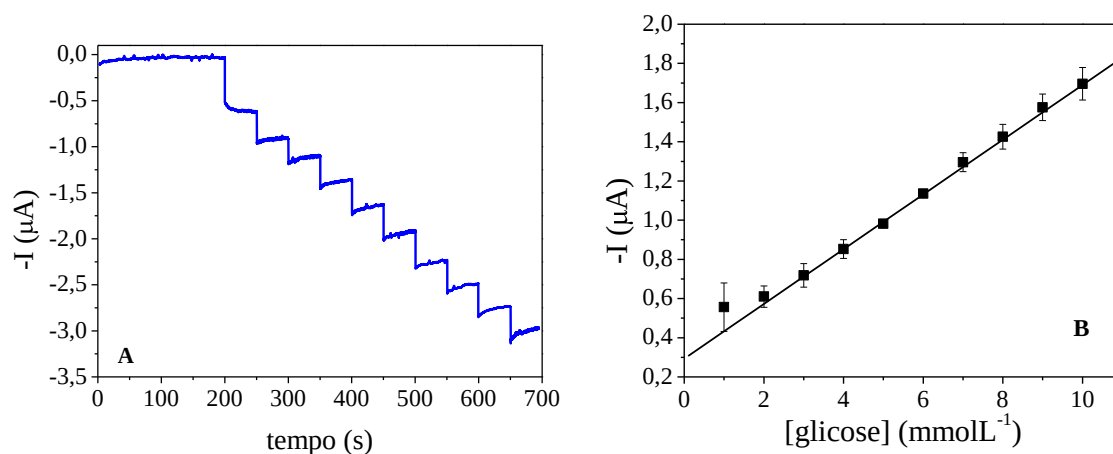


Figure 4.21: (A) Cronoamperograma obtido para a adição de padrão usada na determinação de glicose em meio de solução tampão PBS 0,10 mol L⁻¹, pH = 6,5, na faixa de 1 a 10 mmol L⁻¹. E aplicado: -0,10 V vs Ag/AgCl. (B): Curva de calibração para o biossensor (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂(SiPy⁺Cl⁻/GOx-Nf).

A corrente aumentou linearmente com a concentração de glicose dentro de 10 mmol L⁻¹ ($R^2 = 0,996$). O limite de detecção (LD) foi calculado utilizando-se o desvio padrão da média aritmética de dez amperogramas de brancos (como mostrado no item 3.2.3). O limite de detecção obtido foi de 0,16 mmol L⁻¹. Além do limite de detecção, o limite de

quantificação (LQ) também foi avaliado e o valor obtido foi de $0,54 \text{ mmol L}^{-1}$. Para o eletrodo $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx-Nf})$, calculou-se a constante aparente de Michaelis-Menten (k_m^{app}), com base na curva analítica representada na Figura 4.22.

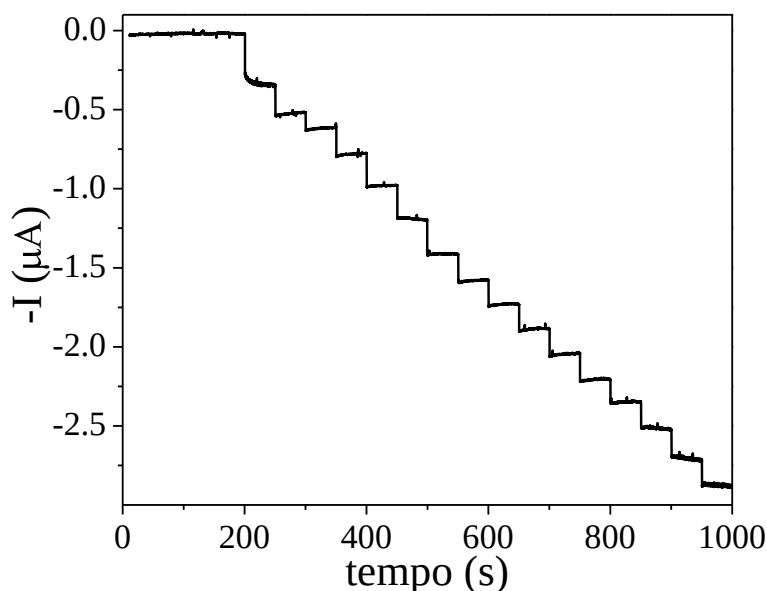


Figure 4.22: Cronoamperograma obtido para a adição de padrão usada na determinação de glicose em meio de solução tampão PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,5$, na faixa de 1 a 18 mmol L^{-1} para o biossensor $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx-Nf})$. E aplicado: $-0,10 \text{ V}$ vs Ag/AgCl .

O k_m^{app} fornece informações a cerca da cinética enzimática, a qual pode ser obtida a partir da equação de Lineweaver-Burk^[38].

$$\frac{1}{I_{ss}} = \frac{1}{I_{\max}} + \frac{k_m^{app}}{I_{\max} C_{glucose}}$$

onde, I_{ss} é a corrente de estado estacionário, após a adição do substrato, $I_{\max}$ é a corrente máxima obtida após a saturação do substrato e C é a concentração de glicose na solução. Utilizando a equação, obtida a partir do gráfico da Figura 4.23, o valor do k_m^{app} para o eletrodo modificado $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx-Nf})$ foi de 10 mmol L^{-1} . O valor de k_m^{app} indica a facilidade da difusão do substrato até a superfície do eletrodo. Este resultado indica que o biossensor proposto tem uma elevada afinidade biológica para glicose. Resultados semelhantes são descritos na literatura, para diferentes eletrodos modificados por filmes automontados. O biossensor de filme LbL baseado em nanopartículas de ouro (AuNPs) e nanotubos de carbono multi-paredes (MWCNT), $\text{GOx}/(\text{AuNPs}/\text{MWCNT})_5/\text{Au}$ exibiram uma

constante de $6,7 \text{ mmol L}^{-1}$ [28]. O biossensor fabricado entre nanopartículas de ouro (PNB) e poli(alilamina) (PAA) (Pt(PAA/PIB)₆GOx) apresentaram um valor de $10,5 \text{ mmol L}^{-1}$ [39].

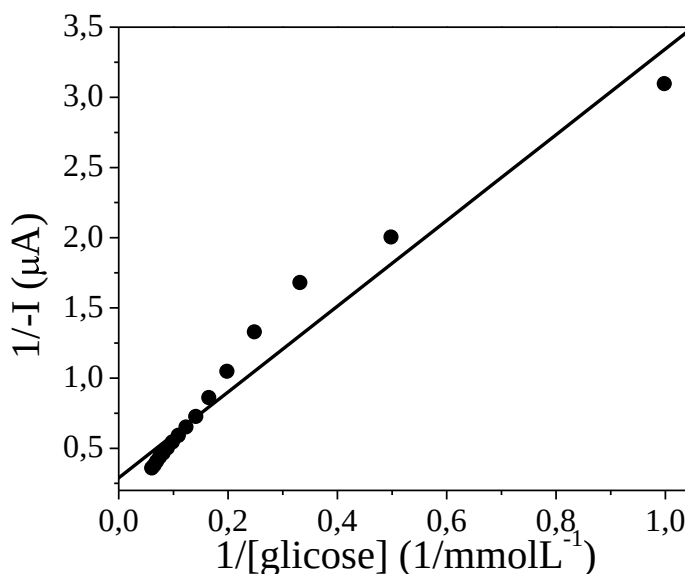


Figure 4.23: Gráfico de Duplo recíproco ou Lineweaver and Burk, obtido para o filme (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂(SiPy⁺Cl⁻/GOx-Nf) (E = -0,10 V).

A Tabela 4.2 apresenta as características de resposta de diferentes eletrodos para glicose, incluindo sensibilidade, o valor k_m^{app} e limite de detecção. É evidente que as características de resposta variam de acordo com o protocolo de imobilização enzimática. Pode-se observar que alguns eletrodos enzimáticos previamente relatados na literatura têm limites de detecção mais baixos em relação ao biossensor com filme LbL proposto neste trabalho. Este fato pode estar relacionado com a utilização de diferentes materiais, tais como nanotubos de carbono (CNT) de parede simple ou múltiplas (SWCNT ou MWCNT), grafeno, nanopartículas metálicas, os quais apresentam propriedades mais condutoras, além do uso de mediadores de elétrons, como PB, e a utilização de eletrodos sólidos de metais nobres (Au, Pt, Ag). No entanto, considerando os níveis de glicose no sangue, com o intervalo de concentração normal compreendida entre 80 a 120 mg / dL ($4,4\text{-}6,6 \text{ mmol L}^{-1}$) [4], o LD obtido para biossensor (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂(SiPy⁺Cl⁻/GOx-Nf) permite o seu uso como um sensor de glicose no sangue humano.

Tabela 4.2: Construção e perfomace de diferentes eletrodos modificados com filmes LbL.

eletrodo	sensibilidade $\mu\text{A}/\text{mmol L}^{-1}\text{cm}^{-2}$	k_m^{app} mmol L^{-1}	LD mmol L^{-1}	Ref.
$(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx-Nf})$	0,14	10	0,16	Este trabalho
$\text{Pt}(\text{PAA}/\text{GNP})_6\text{GOx}$	0,55	10,5	0,007	39
Grafeno/AuNPs/CHIT/Au	17,5	N	0,18	40
$(\text{PEI}/\text{PAA-grafeno})_3(\text{PEI}/\text{GOx})_5$	0,26	N	0,18	12
ITO/PB/(PAH/GOx) ₁₄	16	N	0,20	9
CG/CNT/{GOx/PEI} ₃ /PEI	106,57	0,95	0,05	10
$\text{Pt}(\text{PDDA-SWCNTs}/\text{GOx})_7$	0,064	8,46	0,004	41

N = não reportado

4.3.4. Estudo da Estabilidade e reprodutibilidade do Biossensor

Avaliou-se o tempo de vida do biossensor proposto. Para isso, medidas diárias foram realizadas usando sempre o mesmo biossensor. Os resultados estão apresentados na Figura 4.24.

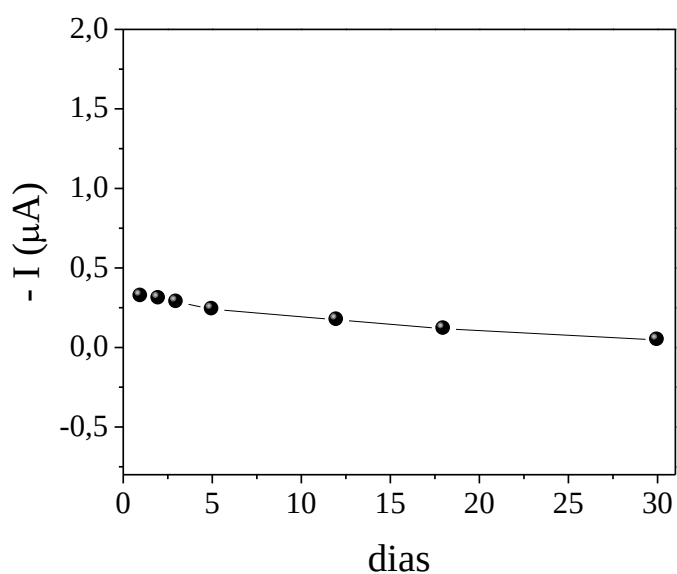


Figura 4.24: Efeito do tempo de estocagem do biossensor $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx-Nf})$ para análise diária em solução de tampão PBS pH = 6,5, contendo 1 mmol L^{-1} de glicose.

Foi possível observar uma considerável estabilidade de corrente até o terceiro dia e, que após este período, inicia-se um pequeno decréscimo na resposta. No entanto, cabe ressaltar que mesmo com esta diminuição da resposta, o biossensor ainda apresenta sensibilidade suficiente para ser utilizado em análise e após um mês de estocagem retem ainda 85,4 % de sua atividade. Pode-se concluir que o polímero Nafion[®] age como uma barreira impedindo a lixiviação da enzima, sendo assim de fundamental importância na estabilidade do eletrodo. A estabilidade do biossensor proposto é condizente com outros biossensores utilizando-se o Nafion. Por exemplo, a estabilidade do biossensor Nafion/GOx/CS-PB-MWNTs-H-PtCo/Au^[16] foi avaliada a partir de medidas sucessivas ao longo de vários dias e observou-se que não houve mudanças significativas na resposta amperométrica durante os 3 primeiros dias. Após o armazenamento de duas semanas e um mês, os biossensores apresentaram ainda 92,1% e 85,3% respectivamente da sua sensibilidade original. Em outro trabalho, o biossensor {IL-RGO/S-RGO}₅/GOx/Nafion exibiu excelente estabilidade retendo quase 83% da sua atividade inicial após duas semanas de armazenamento a +4 °C^[18].

A reprodutibilidade de preparação do biossensor foi avaliada por meio da resposta amperométrica de diferentes eletrodos em tampão PBS pH 6,5, na presença de 1 mmol L⁻¹ de glicose. A reprodutibilidade foi avaliada usando o desvio padrão relativo (RSD) que foi de 3,56%. Eletrodos com boa reprodutibilidade apresentam RSD inferiores a 5%^[18].

O gráfico da Figura 4.25 mostra o comportamento de 3 diferentes biossensores em função da corrente.

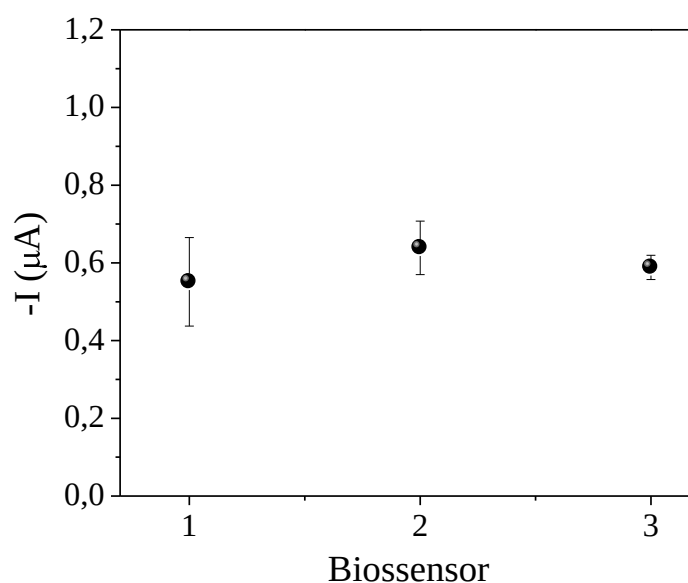


Figura 4.25: Dependência da corrente em função do biossensor.

4.3.5. Análise de interferentes

Os efeitos de interferentes representam algumas das maiores dificuldades para a obtenção de biossensores amperométricos. As respostas amperométricas para o eletrodo $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx-Nf})$ na presença de três substâncias interferentes (ácido ascórbico, dopamina, ácido úrico) em solução tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) a $-0,1 \text{ V}$ são mostrados na Figura 4.26.

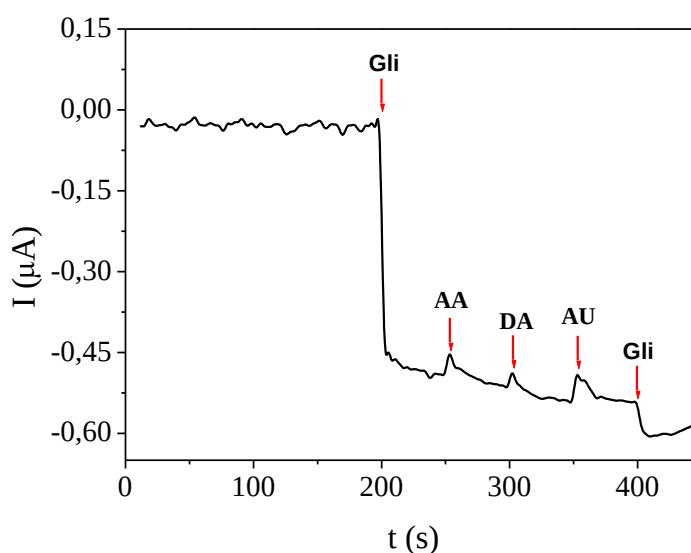


Figura 4.26: Cronoamperograma obtido do biossensor $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx-Nf})$ para adições da de glicose com concentração de 1 mmol L^{-1} e de possíveis interferentes na concentração de $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de solução tampão PBS $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 6,5. E aplicado: $-0,1 \text{ V}$ vs Ag/AgCl.

Primeiramente, foi adicionada uma alíquota de 1 mmol L^{-1} de glicose até estabilização da corrente e, por conseguinte, foram adicionados separadamente cada um dos possíveis interferentes todas na mesma concentração ($5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e finalmente mais uma alíquota de glicose. Para os interferentes analisados observa-se que após as adições, consegue-se minimizar os efeitos dos interferentes. Pode-se observar, no entanto que após a adição dos interferentes há um decréscimo na resposta de corrente para a glicose, o que pode ser decorrente da adsorção das espécies sobre o filme.

Estes resultados podem ser comparados com os obtidos por Che e colaboradores, que produziram biossensores para glicose com a GOX imobilizada sobre eletrodo de Au e um filme eletrodepositado (CS-PB-MWNTs-H-PtCo), a $-0,1 \text{ V}$, revestidos com uma fina camada de Nafion. Não houveram alterações significativas da resposta de corrente após a adição das substâncias interferentes. Portanto, estes resultados demonstram que o biossensor obtido

(SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂(SiPy⁺Cl⁻/GOx-Nf) apresenta uma elevada seletividade para a determinação da glicose, fato atribuído ao baixo potencial utilizado na determinação e ao revestimento do biossensor com a camada do polímero Nafion.

4.4. CONCLUSÕES PARCIAIS

O filme LbL (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)_n apresentou-se sensível para a determinação de peróxido de hidrogênio, com um processo de redução em torno de -0,40 V, sobretudo o filme contendo duas bicamadas, o qual proporcionou um maior incremento de corrente. No entanto, o potencial de -0,10 V foi escolhido como o potencial a ser aplicado nas medidas amperométricas, pois é preferível um potencial menos negativo a fim de evitar ou reduzir a interferência de outras espécies eletroativas. O biossensor resultante (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)₂(SiPy⁺Cl⁻/GOx-Nf) exibiu excelente resposta à glicose a um potencial de -0,1 V, com uma boa resposta linear para glicose. Além disso, também mostraram elevada reprodutibilidade, excelente estabilidade e com um tempo de vida de pelo menos 20 dias, sem mudança significativa na resposta, fato atribuído a presença do polímero Nafion[®]. Desta forma, o eletrodo modificado com o filme (SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc)_n apresenta potencial aplicação como biossensor eletroquímico em sistemas bioanalíticos. A utilização do polímero Nf possibilitou a diminuição do efeito de interferentes na resposta do biossensor.

4.5. REFERÊNCIAS

- [1] THÉVENOT, D.R.; TOTH, K.; DURST, R.A.; WILSON, S.G. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 16, p.121-131, 2001.
- [2] GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VOROS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical Biosensors-Sensor Principles and Architectures. **Sensors**. v. 8, p. 1400-1458, 2008.
- [3] WANG, J. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 19, p. 47-53, 1999.
- [4] WANG, J. Electrochemical Glucose Biosensors. **Chemical Reviews**. v. 108, p. 814-825, 2008.
- [5] MOUSTY, C. Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes-new trends. **Applied Clay Science**. v. 27, p. 159-177, 2004.

- [6] FREIRE, F.S.; PESSOA, C.A.; MELLO, L.D.; KUBOTA, L.T. Direct Electron Transfer: An Approach for Electrochemical Biosensors with Higher Selectivity and Sensitivity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 14, p. 230-243, 2003.
- [7] BELLUZO, M.S.; RIBONE, M.E.; LAGIER, C.M. Assembling Amperometric Biosensors for Clinical Diagnostics. **Sensors**. v. 8, p. 1366-1399, 2008.
- [8] WANG, B.; DU, X.; WANG, M.; GONG, W.; ANZAI, J. A Facile Preparation of H₂O₂ Sensors Using Layer-by-Layer Deposited Thin Films Composed of Poly(ethyleneimine) and Carboxymethyl Cellulose as Matrices for Immobilizing Hemin. **Electroanalysis**. v. 20, p. 1028-1031, 2008.
- [9] FERREIRA, M.; FIORITO, P. A.; OLIVEIRA Jr, O. N.; TORRESI, S.I.C de. Enzyme-mediated amperometric biosensors prepared with the layer-by-layer (LbL) adsorption technique. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 19, p. 1611-1615, 2004.
- [10] DENG, C.; CHEN, J.; NIE, 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.
- [11] CRESPILO, F. N.; GHICA, M. E.; FLORESCU, M.; NART, F.C.; OLIVEIRA JR, O.N.; BRETT, C.M.A A strategy for enzyme immobilization on layer-by-layer dendrimer-gold nanoparticle electrocatalytic membrane incorporating redox mediator. **Electrochemistry Communications**. v. 8, p. 1665-1670, 2006.
- [12] ZENG, G.; XING, Y.; GAO, J.; WANG, Z.; ZHAN, X. Unconventional Layer-by-Layer Assembly of Graphene Multilayer Films for Enzyme-Based Glucose and Maltose Biosensing. **Langmuir**. v. 26, p. 15022–15026, 2010.
- [13] CRESPILO, F.N.; GHICA, M.E; CARIDADE, C.G.; OLIVEIRA JR, O.N.; BRETT, C.M.A. Charge Enzyme immobilisation on electroactive nanostructured membranes(ENM): Optimised architectures for biosensing. **Talanta**. v. 76, p. 922-928, 2008.
- [14] FUNGARO, D.A.; BRETT, C.M.A. Eletrodos modificados com polímeros perfluorados e sulfonados: aplicações em análises ambientais. **Química Nova**. v. 23, p. 805-811, 2000.
- [15] IOST, R.M.; MADURRO, J.M.; MADURRO, A.G.B.; NANTES, I.L.; CASELI, L.; CRESPILO, F.N. Strategies of Nano-Manipulation for Application in Electrochemical Biosensors. **International Journal of Electrochemical Science**. v. 6, p. 2965-2997, 2011.
- [16] CHEN, X.; YUAN, R.; CHAI, Y.; LI, J.; SONG, Z.; LI, W.; ZHONG, X. A glucose biosensor based on chitosan-Prussian blue-multiwall carbon nanotubes-hollow PtCo nanochains formed by one-step electrodeposition. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 84, p. 454-461, 2011.

- [17] AMMAM, M.; EASTON, B. High-performance glucose sensor based on glucose oxidase encapsulated in new synthesized platinum nanoparticles supported on carbon Vulcan/Nafion composite deposited on glassy carbon. **Sensors and Actuators B**. v. 155, p. 340-346, 2011.
- [18] GU, H. YU, Y.; LIU, X.; NI, B.; ZHOU, T.; SHIA, G. Layer-by-layer self-assembly of functionalized graphene nanoplates for glucose sensing in vivo integrated with on-line microdialysis system. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 32, p. 118-126, 2012.
- [19] GAO, Q.; GUO, Y.; LIU, J.; YUAN, X.; QI, H.; ZHAN, 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.
- [20] MOCÁK, J.; BOND, A.M.; MITCHELL, S.; SCOLLARY, G. A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: application to voltammetric and stripping techniques. **Pure and Applied Chemistry**. v. 69, p. 297-328, 1997.
- [21] JESUS, C.G.; SANTOS, V. dos; CANESTRARO, C.D.; ZUCOLOTTI, V.; FUJIWARA, S.T.; GARCIA, GUSHIKEM, Y.; WOHNATH, K.; PESSOA, C.A. Silsesquioxane as a New Building Block Material for Modified Electrodes Fabrication and Application as Neurotransmitters Sensors. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v. 11, p. 3499-3508, 2011.
- [22] Sigma Aldrich. **Disponível em** <http://www.sigmaaldrich.com>. Acesso em: 17 de jul. de 2012.
- [23] PILLAY, J.; OZOEMENA, K.I. Layer-by-layer self-assembled nanostructured phthalocyaninatoiron(II)/SWCNT-poly(*m*-aminobenzenesulfonic acid) hybrid system on gold surface: Electron transfer dynamics and amplification of H₂O₂ response. **Electrochimica Acta**. v. 54, p. 5053-5059, 2009.
- [24] ZHANG, L.P.; GONG, W.J.; PAN, Y.; ZHANG, Y.Z. Fabrication of Multilayer-Film-Modified Gold Electrode Composed of Myoglobin, Chitosan, and Polyelectrolyte-Wrapped Multi-Wall Carbon Nanotubes by Layer-by-Layer Assembled Technique and Electrochemical Catalysis for Hydrogen Peroxide and Trichloroacetic. **Russian Journal of Electrochemistry**. v. 44, p. 1366-1376, 2008.
- [25] KAFI, A. K. M.; LEE, D.; PARK, S.; KWON, Y. Amperometric biosensor based on direct electrochemistry of hemoglobin in poly-allylamine (PAA) film. **Thin Solid Films**. v. 515, p. 5179-5183, 2007.
- [26] KOZAN, J.V.B.; SILVA, R.P.; SERRANO, S.H.P.; LIMA, A.W.O.; ANGNES, L. Biosensing hydrogen peroxide utilizing carbon paste electrodes containing *peroxidases* naturally immobilized on coconut (*Cocos nucifera* L.) fibers. **Analytica Chimica Acta**. v. 591, p. 200-207, 2007.

- [27] SUN, Y.; BAI, Y.; YANG, W.; SUN, C. Controlled multilayer films of sulfonate-capped gold nanoparticles/thionine used for construction of a reagentless bienzymatic glucose biosensor. **Electrochimica Acta**. v. 52, p. 7352-7361, 2007.
- [28] SI, P.; KANNAN, P.; GUO, L.; SON, H.; KIM, D.H. Highly stable and sensitive glucose biosensor based on covalently assembled high density Au nanostructures. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 26, p. 3845-385, 2011.
- [29] WANG, C.; CHEN, S.; XIANG, Y.; LI, W.; ZHONG, X.; CHE, X.; LI, J. Glucose biosensor based on the highly efficient immobilization of glucose oxidase on Prussian blue-gold nanocomposite films. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 69, p. 1-7, 2011.
- [30] LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3ed., Nova Iorque: Springer. 2006. p. 63.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] ZUO, S.; TENG, Y.; YUAN, H.; LAN, M. Direct electrochemistry of glucose oxidase on screen-printed electrodes through one-step enzyme immobilization process with sílica sol-gel/polyvinyl alcohol hybrid film. **Sensors and Actuators B**. v. 133, p. 555-560, 2008.
- [34] 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. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**. v. 57, p. 204-211, 2011.
- [35] GALHARDO, K.S.; TORRESI, R.M.; TORRESI, SI.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 agent. **Electrochimica Acta**. v. 73, p. 123-128, 2012.
- [36] KELLY, S.M.; JESS, T.J.; PRICE, N.C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica Biophysica Acta**. v. 1751, p. 119-139, 2005.
- [37] ZUCOLOTTO, V.; PINTO, A.P.A.; TUMOLO, T.; MORAES, M.L.; BAPTISTA, M.S.; RIUL Jr., A.; ARAUJO, A.P.U.; OLIVEIRA Jr, O.N. Catechol biosensing using a nanostructured layer-by-layer film containing Cl-catechol 1,2-dioxygenase. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 21, p. 1320-1326, 2006.

- [38] SHI, W.; MA, Z. Amperometric glucose biosensor based on a triangular silver nanoprisms/chitosan composite film as immobilization matrix. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 26, p. 1098-1103, 2010.
- [39] WU, B.Y.; HOU, S.H.; YIN, F.; LI, J.; ZHAO, Z.X.; HUANG, J.; DONG, J.; 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. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 22, p. 838-844, 2007.
- [40] SHAN, C.; YANG, H.; HAN, D.; ZHANG, Q.; IVASKA, A.; NIU, L. Graphene/AuNPs/chitosan nanocomposites film for glucose biosensing. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 25, p. 1070-1074, 2010.
- [41] WANG, Y.; WANG, X.; WU, B.; ZHAO, Z.; YIN, F.; LI, S.; QIN, X.; CHEN, Q. Dispersion of single- walled carbon nanotubes in poly(diallyldimethylammonium chloride) for preparation of a glucose biosensor. **Sensors and Actuators B**. v. 130, p. 809-815, 2008.

A utilização de filmes finos do cloreto de 3-*n*-propilpiridínio silsesquioxano (SiPy^+Cl^-) e a ftalocianina tetrassulfonada de cobre (II) (CuTsPc) por meio da técnica *Layer-by-Layer* (LbL) mostrou-se bastante versátil, uma vez que, foi possível aplicar estes em no desenvolvimento de diferentes sensores.

O filme ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$) apresentou propriedades eletrocatalíticas para determinação do fármaco cloridrato de prometazina (PMZ), possibilitando o desenvolvimento e otimização de uma metodologia para a determinação deste fármaco. Os resultados deste trabalho mostraram que a combinação deste novo eletrodo associado à voltametria de onda quadrada resultou em uma ótima correlação linear entre as correntes de pico ($R = 0,999$) e a concentração de PMZ, apresentando boa sensibilidade, precisão e especificidade, caracterizadas pelos baixos valores de LD ($1,92 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$), LQ ($6,41 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) e recuperação de $8,90 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $8,03 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (112,07% e 99,51%, respectivamente) obtidos em amostras de formulações comerciais, sem necessidade de procedimento complexo para preparação da amostra ou para renovação da superfície eletródica.

Foi possível a fabricação de biossensores eletroquímicos baseados na técnica LbL contendo a enzima glicose oxidase. Os biossensores resultantes ($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc}$)₂($\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx-Nf}$) foram aplicados na determinação de glicose. A GOx foi imobilizada no filme através de interações eletrostáticas entre a superfície do filme carregado positivamente (SiPy^+Cl^-). A espectroscopia de Dicroísmo Circular confirmou que a estrutura secundária da enzima é preservada após sua imobilização no filme. Este biossensor exibiu excelente resposta à glicose, com excelente linearidade. Além disso, também mostrou alta reprodutibilidade, e estabilidade, com tempo de vida de pelo menos 20 dias, sem mudança significativa na resposta, fato atribuído à presença do polímero Nafion[®]. A utilização do polímero Nf também possibilitou a diminuição do efeito de interferentes na resposta do biossensor.

Tais estudos mostram a potencialidade destes filmes os quais podem ser utilizados para a imobilização de outras biomoléculas na construção de diferentes biossensores. Cabe ressaltar ainda, que complexos a base de porfirinas e ftalocianinas têm sido bastante utilizados em estudos para mimetizar as enzimas, nos chamados sensores biomiméticos. Neste caso, o mecanismo de reconhecimento molecular de substratos enzimáticos ocorre através de enzimas artificiais, como no caso das ftalocianinas, que imitam o sítio ativo de

alguma enzima redox. Estes dispositivos visam superar as limitações de biossensores enzimáticos tais como custo e instabilidade das enzimas.

Com o intuito de aprimorar as propriedades do filme automontado aqui descrito, a seguir tem-se algumas propostas para a continuidade deste trabalho:

- Estudar as interações entre os filmes e os respectivos analitos, tais como a prometazina através da Espectroscopia de Raman ressonante. Tais estudos já se encontram em andamento.
- Incorporação de nanopartículas metálicas (Pt, Ag, Au) ao SiPy^+Cl^- , com objetivo de aprimorar processos de transferência de elétrons dos filmes obtidos.
- Utilização de outras ftalocianinas e /ou porfirinas metaladas de modo a aprimorar as propriedades eletrocatalíticas dos filmes obtidos, com o objetivo de incrementar alguns parâmetros analíticos tais como sensibilidade, limite de detecção e quantificação.
- Testar aplicabilidade do biossensor $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{GOx-Nf})$ na detecção de glicose em amostras de sangue para aplicações clínicas.
- Utilização de outras enzimas incorporadas ao filme $(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-/\text{CuTsPc})_2$.
- Desenvolver novas configurações do filme com a incorporação de DNA, com o intuito de favorecer as interações com as biomoléculas.