

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

JULIANE RENATA SEMPIONATTO

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES ESTÍMULO RESPONSIVAS DOS
POLÍMEROS ESCOVAS**

Botucatu

2015

JULIANE RENATA SEMPIONATTO

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES ESTÍMULO RESPONSIVAS DOS
POLÍMEROS ESCOVAS**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de mestre em Química de Materiais ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Orientador: Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa

Botucatu

2015

Sempionatto, Juliane Renata.

Estudo das propriedades estímulo responsivas dos
polímeros escova/Juliane Renata Sempionatto, - 2015
100 f.; il.; graf.; quadros.; fotos

Orientador: Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa
Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual
Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2015

1.Sensores Eletroquímicos. 2. ITO 3. Polímero
Escova. 4. L-SPR. 5. Nanopartícula de ouro. 6. pH. 7.
força iônica. I. Universidade Estadual Paulista.
Faculdade de Ciências. II.Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JULIANE RENATA SEMPIONATTO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DO(A) FACULDADE DE CIÊNCIAS DE BAURU.

Aos 29 dias do mês de maio do ano de 2015, às 14:00 horas, no(a) Sala de Defesa da Pós-graduação / Instituto de Biociências de Botucatu, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. VALBER DE ALBUQUERQUE PEDROSA do(a) Departamento de Química e Bioquímica / Instituto de Biociências de Botucatu, Prof. Dr. GUSTAVO ROCHA DE CASTRO do(a) Departamento de Química e Bioquímica / Instituto de Biociências de Botucatu, Profa. Dra. Ivana Cesarino do(a) Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de JULIANE RENATA SEMPIONATTO, intitulada "ESTUDO DAS PROPRIEDADES ESTÍMULO RESPONSIVAS DOS POLÍMEROS ESCOVAS". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADO . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.



Prof. Dr. VALBER DE ALBUQUERQUE PEDROSA



Prof. Dr. GUSTAVO ROCHA DE CASTRO



Profa. Dra. Ivana Cesarino

JULIANE RENATA SEMPIONATTO

ESTUDO DAS PROPRIEDADES ESTÍMULO RESPONSIVAS DOS POLÍMEROS
ESCOVAS

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa
Orientador
Departamento de Química e Bioquímica
Instituto de Biociências – IBB/UNESP
Faculdade de Ciências de Bauru – FC/UNESP

Prof. Dr. Gustavo Rocha de Castro
Membro
Departamento de Química e Bioquímica
Instituto de Biociências – IBB/UNESP

Prof^a. Dra. Ivana Cesarino
Membro
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia
Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA/UNESP

Data da defesa: 29 de Maio de 2015

Apoio FAPESP, processo: 2013/12623-2.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Método "grafting to" e "grafting from".....	2
Figura 2. Regime "mushroom" e regime "brush".....	3
Figura 3. Polímero escova ancorado ao substrato sólido. Recebendo-se estímulo positivo a configuração das cadeias encontra-se favorável ao sinal (ON), recebendo estímulo negativo, configuração desfavorável (OFF).	4
Figura 4. Estruturas químicas dos polímeros escovas. A) PAA, B) P2VP e C) PDMAEMA.....	4
Figura 5. Esquema ilustrativo dos tipos de regime salino de um polímero escova submetido a diferentes concentrações de sal.	8
Figura 6. Diagrama esquemático ilustrando: A) Polarização de plasma de superfície ou propagação plasmônica. B) Plasma de superfície localizado (adaptado de WILLETS; VAN DUYNE, 2007b).	10
Figura 7. Representação esquemática do processo de limpeza e modificação do eletrodo ITO.	16
Figura 8. Processo de adsorção do PAA no eletrodo de ITO.....	18
Figura 9. Representação esquemática da célula eletroquímica utilizada durante os experimentos, com W(eletrodo de trabalho – ITO modificado), R (eletrodo referência) e C (contra eletrodo).	19
Figura 10. Representação esquemática para os experimentos de espectroscopia no UV-vis. A) Eletrodo ITO modificado com uma dobra indicativa da superfície modificada. B) Cubeta com caminho óptico de 1 cm. C) Eletrodo dentro da cubeta com a face não modificada voltada para a luz incidida e a parte modificada voltada para a solução.....	21
Figura 11. A) Micrografia (TEM) nanopartículas de Au, escala: 0,1 μm . B) Distribuição de tamanho, N=400 (ImageJ).	22
Figura 12. UV-vis Nanopartículas Au, pico de absorção obtido: 530 nm.....	23
Figura 13. Eletrodo ITO modificado com PAA (curva azul). Eletrodo ITO modificado com PAA/Au (curva preta).	24
Figura 14. Nanopartículas de ouro com A) 0,001; B) 0,005; C) 0,010; D) 0,050; E) 0,100; F) 0,500 e G) 1,000 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl, respectivamente.	25
Figura 15. Nanopartículas de ouro com pH A) 3,0; B) 4,0; C) 4,35; D) 4,65; E) 5,0; F) 6,0; G) 7,4; 1) 2,0 e 2) 12,0 respectivamente.	25
Figura 16. A) Nanopartículas carregadas negativamente devido ao uso de citrato como agente estabilizante, as cargas negativas estabilizam os colóides de se agregarem e precipitarem. B) Mudança no espectro para maiores comprimentos de onda quando as	

nanopartículas de ouro se aproximam e para maiores comprimentos de onda quando as nanopartículas se afastam. C) Aproximação das nanopartículas devido ao aumento da concentração de contraíons. D) Aproximação das nanopartículas devido a diminuição do pH. E) Afastamento das nanopartículas devido ao aumento do pH.	26
Figura 17. Micrografias MEV A) ITO, barra de escala: 100 μm . B) ITO modificado com o filme de PAA, barra de escala: 2 μm . C) ITO modificado com PAA e nanopartículas de Au, barra de escala: 2 μm	27
Figura 18. EDX do eletrodo ITO modificado com PAA e nanopartículas de ouro.	28
Figura 19. – Micrografias de AFM e <i>cross-sections</i> do eletrodo modificado com PAA. A) Eletrodo modificado até a etapa de PAA, rugosidade rms de 2,6 nm. B) Eletrodo ITO modificado até a etapa das nanopartículas de ouro, rugosidade rms de 28,0 nm. ...	29
Figura 20. Eletrodo PAA. Micrografias mostrando descamação do filme formado.	29
Figura 21. Escovas de PAA. Configurações variam dependendo do pH.	30
Figura 22. Eletrodo PAA/Au variando-se os valores de pH A) Voltametria cíclica do eletrodo PAA/Au, ferrocianeto de potássio 1,2 mol L ⁻¹ , tampão fosfato, velocidade de varredura 50 mV s ⁻¹ ; B) Espectroscopia de Impedância eletroquímica.	31
Figura 23. Eletrodo modificado PAA/Au A) Variação de potencial de pico vs pH; B) Variação de corrente de pico vs pH.	31
Figura 24. Eletrodo modificado PAA/Au. A) Variação resistência superficial, R_{ct} vs pH. B) Variação resistência solução, R_s vs pH.	32
Figura 25. A) PAA/Au em pH<4,7, cadeias colapsadas deixam as nanopartículas mais próximas a superfície. B) PAA/Au em pH>4,7, cadeias estendidas, porém carregadas negativamente, impedem o íon $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ de chegar a superfície do ITO.	33
Figura 26. Eletrodo modificado com PAA/Au A) Espectros de L-SPR variando-se o pH de 3,00 a 6,00; B) Curva de titulação.	34
Figura 27. Eletrodo PAA/Au variando-se os valores de força iônica A) Voltametria cíclica, tampão fosfato, ferrocianeto 1,2 mol L ⁻¹ , velocidade de varredura 50 mV s ⁻¹ . B) Espectroscopia de Impedância eletroquímica.	36
Figura 28. Eletrodo modificado PAA/Au A) Variação de potencial de pico vs $[\text{NaCl}]$ 50 mV s ⁻¹ ; B) Variação de corrente de pico vs $[\text{NaCl}]$, 50 mV s ⁻¹ . Os inserts em cada gráfico correspondem a uma ampliação da região selecionada no gráfico	36
Figura 29. Eletrodo modificado PAA/Au. A) Variação resistência superficial, R_{ct} vs $[\text{NaCl}]$. B) Variação resistência solução, R_s vs $[\text{NaCl}]$. Os <i>inserts</i> em cada gráfico correspondem a uma ampliação da região selecionada no gráfico.	37
Figura 30. Transição entre regimes osmótico, osmótico não convencional e salino.	38
Figura 31. Eletrodo modificado com PAA/Au A) Espectros de L-SPR variando-se o valor da força iônica de 0,001 a 1,000 mol·L ⁻¹ ; B) Curva de titulação.	39

Figura 32. Micrografias obtidas por MEV do eletrodo ITO modificado com P2VP/Au. A) escala: 100 μm ; B) escala: 10 μm ; C) escala: 5 μm .	40
Figura 33. EDX do eletrodo ITO modificado com P2VP e nanopartículas de ouro.	40
Figura 34. Micrografias de AFM e <i>cross-sections</i> do eletrodo modificado com P2VP. A) Eletrodo modificado até a etapa de P2VP, rugosidade rms de 7,8 nm. B) Eletrodo ITO modificado até a etapa das nanopartículas de ouro, rugosidade rms de 123,3 nm.	41
Figura 35. A) P2VP em pH = 5,3, cadeias colapsadas. B) P2VP em pH < 5,3, cadeias estendidas, carregadas positivamente.	42
Figura 36. Eletrodo P2VP/Au variando-se os valores de pH A) Voltametria cíclica do eletrodo P2VP/Au, tampão fosfato, ferrocianeto 1,2 molL ⁻¹ , velocidade de varredura 50 mV s ⁻¹ ; B) Espectroscopia de Impedância eletroquímica.	42
Figura 37. Eletrodo modificado P2VP/Au A) Variação de potencial de pico vs pH; B) Variação de corrente de pico vs pH.	43
Figura 38. Eletrodo modificado P2VP/Au. A) Variação resistência superficial, R_{ct} vs pH. B) Variação resistência solução, R_s vs pH.	43
Figura 39. A) P2VP/Au em pH < 5,3, cadeias estendidas, carregadas positivamente favorecem que o íon $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ chegue a superfície do eletrodo. B) P2VP/Au em pH < 5,3 cadeias colapsadas impedem o íon $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ de chegar a superfície do ITO.	44
Figura 40. Eletrodo modificado com P2VP/Au A) Espectros de L-SPR variando-se o pH de 3,00 a 7,40, tampão fosfato; B) Curva de titulação.	45
Figura 41. Eletrodo P2VP/Au variando-se os valores de força iônica A) Voltametria cíclica do eletrodo P2VP/Au, tampão fosfato, ferrocianeto de potássio 1,2 molL ⁻¹ , velocidade de varredura 50 mV s ⁻¹ ; B) Espectroscopia de Impedância eletroquímica.	46
Figura 42. Eletrodo modificado P2VP/Au A) Variação de potencial de pico vs $[\text{NaCl}]$ 50 mV s ⁻¹ ; B) Variação de corrente de pico vs $[\text{NaCl}]$, 50 mV s ⁻¹ .	46
Figura 43. Eletrodo modificado P2VP/Au. A) Variação resistência superficial, R_{ct} vs $[\text{NaCl}]$. B) Variação resistência solução, R_s vs $[\text{NaCl}]$. Os <i>inserts</i> em cada gráfico correspondem a uma ampliação da região selecionada no gráfico.	47
Figura 44. Transição entre regimes osmótico, osmótico não convencional e salino.	48
Figura 45. Eletrodo modificado com P2VP/Au A) Espectros de L-SPR variando-se o valor de força iônica de 0,001 a 1,000 mol·L ⁻¹ ; B) Curva de titulação.	49
Figura 46. Etapas para a fabricação do biosensor	49
Figura 47. Ilustração esquemática do mecanismo de detecção para o biosensor de glicose.	50
Figura 48. Resposta amperométrica para o biosensor P2VP/Au/Gox a sucessivas adições de glicose em tampão fosfato pH 4,0 e 7,0 a um potencial de +0,26V vs Ag AgCl. <i>Insert</i> : Curva de calibração da resposta amperométrica vs concentração de	

glicose sensibilidade $1,51 \mu\text{A mM}^{-1}$ e R^2 de 0,998 para pH 4. (Faixa de concentração de 2 a $18 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$).	51
Figura 49. Micrografias obtidas para o eletrodo de ITO modificado com PDMAEMA/Au. A) escala: $5,0 \mu\text{m}$; B) Corte em ângulo, escala: $5,0 \mu\text{m}$.	52
Figura 50. EDX do eletrodo ITO modificado com PDMAEMA e nanopartículas de ouro.	53
Figura 51. Micrografias de AFM e cross-sections do eletrodo modificado com PDMAEMA. A) Eletrodo modificado até a etapa de PDMAEMA, rugosidade rms de $6,2 \text{ nm}$. B) Eletrodo ITO modificado até a etapa das nanopartículas de ouro, rugosidade rms de $119,7 \text{ nm}$.	53
Figura 52. Eletrodo PDMAEMA/Au variando-se os valores de pH A) Voltametria cíclica, tampão fosfato, ferrocianeto $1,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, velocidade de varredura 50 mV s^{-1} ; B) Espectroscopia de Impedância eletroquímica.	54
Figura 53. Eletrodo modificado PDMAEMA/Au A) Variação de potencial de pico vs pH; B) Variação de corrente de pico vs pH.	55
Figura 54. Eletrodo modificado PDMAEMA/Au. A) Variação resistência superficial, R_{ct} vs pH. B) Variação resistência solução, R_s vs pH.	55
Figura 55. Eletrodo modificado com PDMAEMA/Au A) Espectros de L-SPR variando-se o pH de 3,00 a 7,40; B) Curva de titulação.	56
Figura 56. Eletrodo PDMAEMA/Au variando-se os valores de força iônica A) Voltametria cíclica, tampão fosfato, ferrocianeto $1,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, velocidade de varredura 50 mV s^{-1} ; B) Espectroscopia de Impedância eletroquímica.	57
Figura 57. Eletrodo modificado PDMAEMA/Au A) Variação de potencial de pico vs $[\text{NaCl}]$ 50 mV s^{-1} ; B) Variação de corrente de pico vs $[\text{NaCl}]$, 50 mV s^{-1} .	58
Figura 58. Eletrodo modificado PDMAEMA/Au. A) Variação resistência superficial, R_{ct} vs $[\text{NaCl}]$. B) Variação resistência solução, R_s vs $[\text{NaCl}]$.	58
Figura 59. Eletrodo modificado com PDMAEMA/Au A) Espectros de L-SPR variando-se o valor de força iônica de $0,001$ a $1,000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; B) Curva de titulação, <i>insert</i> corresponde a uma ampliação de uma região selecionada no gráfico.	60
Figura 60. Esquema ilustrativo da confecção e detecção do imunosensor para o vírus CDV. (1) Eletrodo ITO. (2) PDMAEMA. (3) Nanopartículas de ouro. (4) MUA. (5) EDC/NHS. (6) Anticorpo. (7) Vírus CDV (amostra positiva).	61
Figura 61. Espectro de impedância eletroquímica $100 \text{ kHz} - 100 \text{ mHz}$, tampão fosfato $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,4, $1,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. A) Amostra positiva. B) Amostra negativa.	61
Figura 62. Micrografias de AFM e cross-sections do eletrodo modificado com P2VP/PAA. A) Eletrodo modificado até a etapa dos polímeros, rugosidade rms de 2,2	

nm. B) Eletrodo ITO modificado até a etapa das nanopartículas de ouro, rugosidade rms de 80,2 nm.	63
Figura 63. Representação esquemática da mudança coformacional das cadeias poliméricas da mistura de polímeros P2VP/PAA em pH básico e ácido.	64
Figura 64. Ilustração esquemática da dependência do sinal obtido através dos probes positivo e negativo com a variação do pH.	65
Figura 65. Voltametria cíclica com velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} , eletrodo referência de Ag AgCl, tampão fosfato $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ contendo $1,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$ e $0,6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{+3}$	66
Figura 66. Voltametria de pulso diferencial. Tampão fosfato $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ contendo $0,6 [\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{+3}$ e $1,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$, velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} vs eletrodo referência de Ag AgCl.	66
Figura 67. Curva de titulação para ITO/P2VP/PAA/Au.	67
Figura 68. Eletrodo modificado com P2VP/PAA/Au A) Espectros de L-SPR variando-se o pH de 3,00 a 7,40; B) Curva de titulação	68
Figura 69. Ilustração representativa da liberação de DNA via eletroquímica.	69
Figura 70. Voltametria cíclica a 50 mVs^{-1} de uma solução tampão fosfato pH 3,0 na ausência e na presença de oxigênio vs Ag AgCl. Para a retirada de oxigênio, Ar foi borbulhado por 30 min.	70
Figura 71. Tampão fosfato pH 3,0 $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ na presença de $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de fenolftaleína. A) -1V aplicado por 5 min. B) -1,0V aplicado por 20 min.	71
Figura 72. Voltametria de pulso diferencial em tampão fosfato pH 3 contendo $0,6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{+3}$ e $1,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$. A diferença de potencial de -1,0V foi aplicado durante 30 minutos.	71
Figura 73. Espectros de fluorescência obtidos após o eletrodo ITO/P2VP/PAA/DNA ser deixado em repouso na solução tampão fosfato pH 3 por 2 horas (a) e após a aplicação de -1,0V por 30 min (b).	72
Figura 74. Micrografias da superfície do eletrodo ITO/P2VP/PAA/DNA obtidas a partir de microscópio confocal. Aumento de 100x.	72

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Principais técnicas de caracterização de polímeros escova.	12
Quadro 2. Resumo dos principais dados obtidos para os eletrodos PAA/Au, P2VP/Au e PDMAEMA/Au, variando-se os valores de pH e força iônica.....	73

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Estudos Eletroquímicos	6
1.2 Estudos Plasmônicos.....	8
2. OBJETIVO.....	14
2.1. Objetivos Específicos	14
3. MATERIAIS E MÉTODO.....	15
3.1. Reagentes e Soluções.....	15
3.2. Metodologia	15
3.2.1. Preparo de Nanopartículas de Ouro.....	15
3.2.2. Modificação do Eletrodo	15
3.3. Modificação superficial	17
3.4. Procedimento Experimental.....	19
3.4.1. Análises Eletroquímicas	19
3.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV.....	20
3.4.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão - TEM.....	20
3.4.4. Microscopia de Força Atômica - AFM.....	20
3.4.5. Análises Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Nanopartículas de Ouro	22
4.1.1 Caracterização	22
4.1.2 Potenciais aplicações.....	24
4.2 Poli(ácido acrílico) – PAA.....	27
4.2.1 Caracterização	27
4.2.2 Ensaios variando-se o pH	30
4.2.3 Ensaios variando-se a Força Iônica	35
4.3 Poli(2-vinil piridina) – P2VP	39
4.3.1 Caracterização	39
4.3.2 Ensaios variando-se o pH	41
4.3.3 Ensaios variando-se a Força Iônica	45
4.3.4 Aplicação Proposta.....	49
4.4 Poli(2-dimetil amino etil metacrilato) – PDMAEMA	52

4.4.1	Caracterização	52
4.4.2	Ensaio variando-se o pH	54
4.4.3	Ensaio variando-se a Força Iônica	56
4.4.4	Aplicação Proposta	60
4.5	P2VP/PAA	62
4.5.1	Ensaio variando-se o pH	63
4.5.2	Aplicação Proposta	69
5.	CONCLUSÕES	73
6.	REFERÊNCIAS	75
7.	TRABALHOS CIENTÍFICOS	80

RESUMO

Neste trabalho foram estudadas a produção e caracterização de filmes finos poliméricos escovas sobre substrato de óxido de índio e estanho (ITO), a fim de se avaliar as propriedades estímulo-responsivas que levam às mudanças estruturais dos filmes. Para a caracterização das superfícies dos filmes foram utilizadas as técnicas de microscopia atômica de varredura (MEV), energia dispersiva de raio-X (EDX) e microscopia de força atômica (AFM). A influência do pH e da força iônica foram avaliadas pelos métodos eletroquímicos e de ressonância plasmônica de superfície localizada (L-SPR). Os polímeros Poli(ácido acrílico)-(PAA), Poli(2-vinil piridina)-(P2VP), Poli(2-dimetil amino etil metacrilato) (PDMAEMA) e a mistura de P2VP com PAA foram utilizados na construção dos filmes em escova. Os ensaios eletroquímicos revelaram uma dependência da conformação dos polímeros escovas com a variação de força iônica e pH, sendo que, P2VP e PDMAEMA tiveram melhor resposta em pH ácido, uma vez que as cadeias poliméricas estavam estendidas e carregadas positivamente, permitindo a difusão da espécie redox carregada negativamente até a superfície do eletrodo. Contra intuitivamente, o polímero PAA também apresentou uma resposta amperométrica ótima em pH ácido, quando suas cadeias estavam neutras colapsadas sobre a superfície, esse fato curioso foi devido ao fato da espécie redox utilizada nos ensaios ser carregada negativamente, ocorrendo, portanto, repulsão eletrostática na configuração em que o PAA estava com suas cadeias estendidas e carregadas negativamente (pH básico). Os ensaios de L-SPR corroboraram com os obtidos por via eletroquímica. Também foi possível obter o valor da sensibilidade dos eletrodos frente a variação de pH, sendo que o sensor mais sensível foi o de P2VP, para cada unidade de pH o sensor deslocou 11 unidades de comprimento de onda. Foi possível a determinação dos regimes osmótico, osmótico não convencional e salino por meio dos ensaios de variação de força iônica. Os eletrodos de P2VP, PDMAEMA e P2VP/PAA foram aplicados como biossensor de glicose, imunossensor específico para o vírus da cinomose canina e sistema de “gene delivery” respectivamente.

Palavras Chave: Sensores eletroquímicos; ITO; Polímero escova; P2VP, PAA, PDMAEMA; L-SPR; nanopartícula de ouro; pH; força iônica.

ABSTRACT

This study describes the production and characterization of polymer brushes thin films build on indium tin oxide substrate (ITO) in order to study the stimuli-responsive properties that lead to structural changes of the films. To characterize the surfaces atomic microscopy, energy dispersive X-ray and atomic force microscopy techniques were used. The influence of pH and ionic strength were evaluated by electrochemical methods and localized surface plasmon resonance (L-SPR). The polymers poly (acrylic acid) - (PAA), poly (2-vinyl pyridine) - (P2VP), poly (2-dimethyl amino ethyl methacrylate) (PDMAEMA) and the mixture P2VP with PAA were used to construct the brush films. Electrochemical tests showed a dependence of the polymer brushes conformation with ionic strength and pH. P2VP and PDMAEMA had better response at acidic pH, since the polymer chains were extended and positively charged, allowing the diffusion of the negatively charged redox species through the film to the electrode surface. Not intuitively, PAA polymer film also showed a better amperometric response in acid pH, when their chains were collapsed on the surface. This curious response was because the redox species used in the tests were charged negatively, occurring thus electrostatic repulsion between the PAA negatively stretched chains (basic pH) and the negatively charged redox specie, thus leading to a major signal in acidic pH where the PAA brushes were neutral. The results obtained by electrochemistry were corroborated using L-SPR assays. It was also possible to obtain the sensitivity value due to pH variation using L-SPR measurements. P2VP showed the highest sensibility: for each pH unit, 11 units wavelength were shifted. It was also determined the range of salt concentration related with the osmotic regime, unconventional osmotic regime and salted regime transitions for each electrode. The electrodes P2VP, PAA, PDMAEMA and P2VP/PAA were applied as glucose biosensor, immunosensor specific for canine distemper virus and “gene delivery” system, respectively.

Key Words: Electrochemical sensors; ITO; polymer brush; P2VP, PAA, PDMAEMA; L-SPR; gold nanoparticle; pH; ionic strength.

1. INTRODUÇÃO

São chamados de polímeros escovas, os sistemas cuja uma das terminações da cadeia polimérica encontra-se fixa a um substrato. Assim, quando uma grande densidade de cadeias poliméricas está fixada na superfície do substrato, o sistema adquire uma configuração de escova, onde as cadeias dos polímeros atuam como cerdas. As escovas poliméricas possuem a capacidade de mudança de conformação (estendida ou colapsada) dependendo do estímulo externo aplicado, isso faz com elas sejam excelentes candidatas para o desenvolvimento de sensores e biossensores.

Durante as últimas décadas, o desenvolvimento de sensores tem sido objeto de estudo devido à demanda crescente por plataformas de sensores e biossensores para monitoramento ambiental e médico (LEE et al., 2011; SZUNERITS; BOUKHERROUB, 2012; YAO; HU, 2010a). Esforços consideráveis vêm sendo empregados na pesquisa de sensores economicamente viáveis, altamente sensíveis e seletivos. Recentemente, filmes finos de polímeros escova ativados por estímulos externos vêm atraindo considerável atenção no desenvolvimento de sensores para uso em sistemas químicos e bioquímicos (ANTONIO; BASSO, 2013; MATSUSHITA; KYOTANI; AKAGI, 2011; YAO; HU, 2010b).

O método de síntese de sensores utilizando polímeros escova como plataforma baseia-se no ancoramento de cadeias poliméricas à superfície de um substrato. Tal processo pode ser realizado por basicamente dois métodos: “grafting to” e “grafting from” (ZHAO; BRITAIN, 2000). Em ambos os métodos, a superfície deve ser modificada primeiramente para tornar possível a interação física ou química das cadeias poliméricas com o substrato. No primeiro método, a interação pode ser química ou física. A adsorção física é obtida quando utilizamos a propriedade de monocamadas auto-organizáveis dos copolímeros em blocos em que pelo menos um dos blocos possui adsorção preferencial a superfície. A eficiência desta técnica depende da interação entre o solvente e o polímero, assim como da hidrofobicidade/hidrofilicidade e/ou interações coulombicas entre a superfície e o polímero. Neste método, as cadeias poliméricas estão reversivelmente ancoradas ao substrato e podem sofrer clivagem com mudança de solvente, tratamento térmico ou deslocamento de equilíbrio. A ligação não covalente limita fortemente a estabilidade dos filmes escova. Quando as cadeias poliméricas estão ligadas covalentemente a estabilidade da superfície aumenta consideravelmente e podemos ter uma ampla faixa de aplicação em diversas áreas da ciência. Quando utilizamos método

“grafting to”, temos a limitação da densidade de cadeias que podem ser enxertadas, uma vez que cada cadeia precisa se difundir através da outra para chegar ao substrato. Neste caso, o impedimento estérico é um fator limitante.

O método “grafting from” representa um método poderoso para a construção de densas camadas poliméricas. Neste método, a polimerização se dá a partir da superfície, que é previamente modificada com iniciadores, e colocada em contato com monômeros. O tamanho da cadeia a ser crescida pode ser controlado interrompendo-se a reação de polimerização, com este método, é possível obter controle de estrutura, densidade e tamanho de cadeia. Na Figura 1 é possível observar um esquema ilustrando os métodos “grafting to” e “grafting from”.

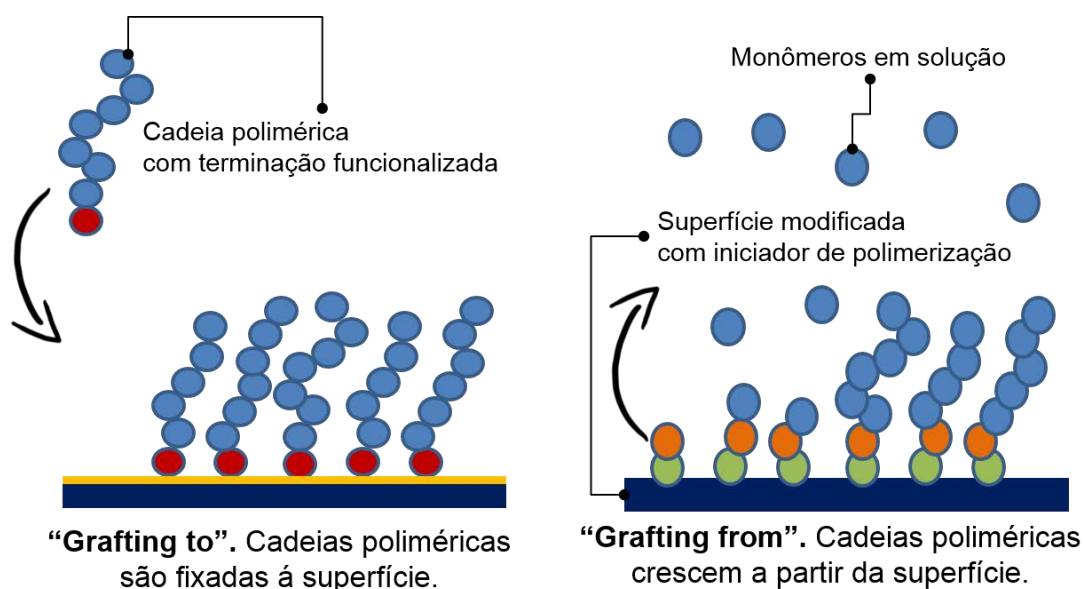


Figura 1. Método "grafting to" e "grafting from".

Quando uma cadeia polimérica possui uma de suas terminações fixadas a uma superfície, podemos ter diferentes regimes poliméricos, que dependem da densidade de cadeia fixada na superfície. Quando uma baixa quantidade de cadeia polimérica está presa por uma de suas terminações a um substrato, temos uma baixa densidade polimérica e o polímero encontra-se no regime tipo “mushroom”. Neste regime, a distância entre uma cadeia e outra é menor que o raio de giro (R_g) da cadeia e quando colapsadas, as cadeias poliméricas formam “ilhas”, cogumelos, na superfície e não chegam a se sobrepor. Uma vez que a distância entre uma cadeia enxertada e outra é menor que o raio de giro da

cadeia polimérica, ocorre a sobreposição de cadeias quando elas se colapsam. Quando a densidade é extremamente alta, a própria repulsão estérica faz com que as cadeias fiquem alongadas, longe da superfície, como as cerdas de uma escova, temos então o chamado regime tipo “brush”. O regime “brush” também é possível de ser obtido utilizando-se o método “grafting to”, neste caso é necessário ter-se as condições de síntese apropriadas, tais como tempo de reação, temperatura e pressão. A Figura 2 ilustra os regimes “mushroom” e “brush”.

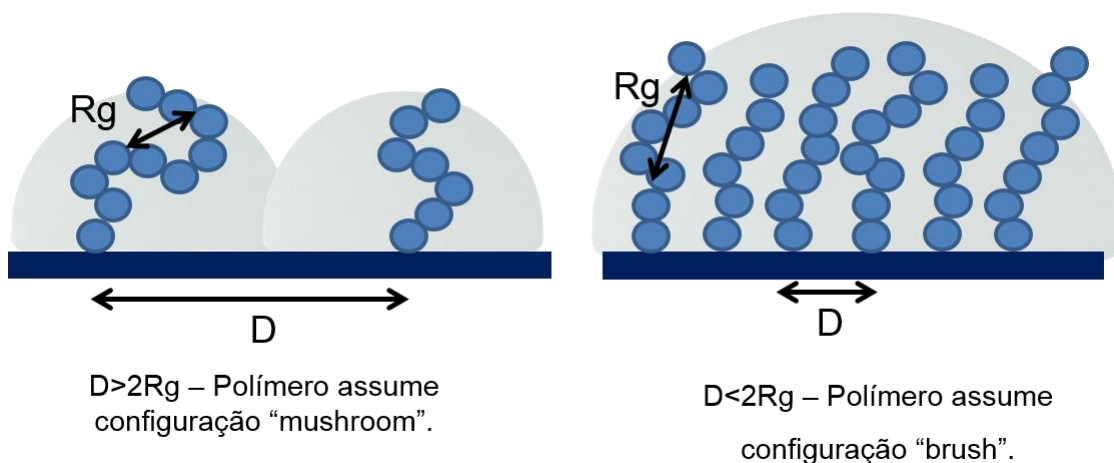


Figura 2. Regime "mushroom" e regime "brush".

Na literatura, é possível se observar que os sensores construídos utilizando-se ambos os métodos mostram-se sensíveis às mudanças físicas ou químicas na sua interface, por mudança de: solvente (AHN et al., 2004), temperatura (SUN et al., 2004), força iônica (MOTORNOV et al., 2008), luz (WITTEMANN et al., 2005) ou pH (IONOV et al., 2006).

Estas mudanças no meio externo alteram a conformação das cadeias poliméricas ancoradas na superfície. Quando um estímulo positivo é aplicado, tal como “bom solvente” (solvente miscível em relação ao polímero), as cadeias poliméricas interagem com a solução e se afastam da superfície; quando um estímulo negativo, tal como “mau solvente” (solvente imiscível em relação ao polímero), é aplicado, as cadeias se colapsam, aproximando-se da superfície (Figura 3). Estas propriedades responsivas são reversíveis e promovem a base para o desenvolvimento dos chamados “smart materials” ou “smart surfaces”. Tais materiais são capazes de responder de maneira diferenciada aos estímulos externos específicos.



Figura 3. Polímero escova ancorado ao substrato sólido. Recebendo-se estímulo positivo a configuração das cadeias encontra-se favorável ao sinal (ON), recebendo estímulo negativo, configuração desfavorável (OFF).

Neste trabalho foram avaliadas as mudanças conformacionais das cadeias dos polieletrólitos com a variação do pH e da força iônica utilizando-se os polímeros escova PAA (Poli(ácido acrílico)), P2VP(Poli (2-vinil piridina)), PDMAEMA(Poli (dimetil amino etil metacrilato)) e a mistura de P2VP e PAA. Estes polímeros foram escolhidos por possuírem características de ácidos e bases fracos, uma vez que a dissociação dos grupos ácidos/básicos fracos depende fortemente de fatores do meio externo.

O PAA (Figura 4A) é um poliácido fraco, isto significa que suas cadeias poliméricas não se dissociam completamente, a dissociação dos grupamentos ácidos fica dificultada conforme os primeiros grupos se dissociam. A dissociação das cadeias deste polímero (grupamentos carboxílicos) depende fortemente das condições do meio, o que o faz excelente candidato a estudos de variação de condições do meio externo, como pH, temperatura, força iônica, além da capacidade de solvatação do solvente. O P2VP (Figura 4B) é uma base fraca e como o PAA, a dissociação das cadeias poliméricas (nitrogênio do grupo piridina) depende fortemente das condições do meio externo. Assim como o P2VP, o PDMAEMA (Figura 4C) também é uma polibase, porém o grupo que se protona (nitrogênio do grupamento amina) não está ligado a um anel aromático como no P2VP.

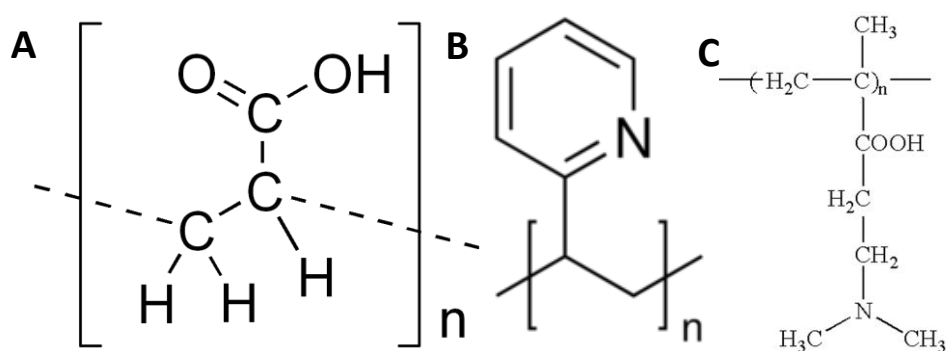


Figura 4. Estruturas químicas dos polímeros escovas. A) PAA, B) P2VP e C) PDMAEMA.

A mistura de dois ou mais tipos de cadeias poliméricas em uma única superfície nos permite a criação de uma classe nova de materiais inteligentes. Polímeros “mixed”, ou copolímeros em bloco (MINKO, 2006), consistem em dois ou mais tipos de polímeros randomicamente aderidos a um substrato.

O mecanismo de resposta desta mistura de polímeros é diferente dos homopolímeros escovas. Cadeias poliméricas de diferentes tipos tendem a evitar contato desfavoráveis e se separam lateral ou verticalmente em escala nanométrica, dependendo do tipo de incompatibilidade dos polímeros e da interação com o meio externo (solvente, pH, força iônica, temperatura, etc) (IONOV, 2010).

Dependendo da interação das cadeias poliméricas com o meio externo, as escovas podem ser comutadas entre os estados quando as cadeias poliméricas de um polímero estão estendidas e dominam a topografia da camada polimérica da mistura (SIDORENKO et al., 1999) e quando as mesmas estão colapsadas. Selecionando-se o solvente apropriado pode-se atingir um amplo espectro de estados intermediários.

Polímeros “mixed” e copolímeros em bloco vem sendo utilizados para a construção de superfícies com propriedades comutáveis (IONOV et al., 2004a, 2004b; MINKO et al., 2003), adesão (RETSOS et al., 2005), controle de adsorção de proteínas (IONOV et al., 2009) e como elementos ativos de dispositivos microfluidicos (IONOV et al., 2003, 2006).

A mistura de P2VP e PAA representa um caso particularmente interessante de polímeros “mixed”. A mistura P2VP e PAA consiste em dois polímeros escova de polieletrólitos com cargas opostas (MOTORNOV et al., 2009; TAM et al., 2010b), por ser sensível a mudanças de pH, concentração de sal, temperatura, etc. essa mistura é bastante visada na aplicação como regulador de adsorção de proteínas (DRAPER et al., 2004; IONOV et al., 2006; UHLMANN et al., 2007) e desenvolvimento de filmes inteligentes (MOTORNOV et al., 2009; WAN et al., 2012). Neste tipo de mistura, interações eletrostáticas são fundamentais e controlam a resposta do filme.

Recentemente, as propriedades da mistura de P2VP/PAA foi estudada no desenvolvimento de um sistema eletroquímico de propagação iônica frente a variação de pH. As transições morfológicas da mistura de polímeros associadas a superfície do eletrodo resultaram na abertura, fechamento, ou seleção precisa dos canais formados no filme nanoestruturado, moderando a permeabilidade iônica em resposta as mudanças de

pH. Em comparação com os homopolímeros escova, o sistema P2VP/PAA demonstrou uma variação muito mais ampla de transporte iônico através do filme (TAM et al., 2010b). Este estudo será melhor detalhado na próxima seção.

1.1 Estudos Eletroquímicos

Como os polímeros empregados neste estudo são polieletrólitos, técnicas eletroquímicas de caracterização e de transdução de sinais são uma excelente ferramenta para um estudo preciso e robusto. Polímeros com estruturas similares aos utilizados neste trabalho foram estudados frente à variação de pH e/ou força iônica utilizando-se técnicas eletroquímicas.

Recentemente, Katz e coautores (TAM et al., 2008) estudaram as propriedades comutativas dos polímeros escovas utilizando o polímero poli(4-vinil piridina) (P4VP) modificado com complexo redox de ósmio e utilizando ITO como suporte. O P4VP é uma polibase fraca e a mudança do pH do meio externo afeta diretamente o estado de protonação das cadeias poliméricas. O eletrodo modificado foi sensível as mudanças de pH do meio, sendo que, em pH ácido (4,0) o filme polimérico redox demonstrou atividade eletroquímica ($E^\circ = 0,29 \text{ V}$ (vs Ag/AgCl)) enquanto em $\text{pH} > 6$ não demonstrou nenhuma atividade. Uma explicação dada no trabalho em questão está relacionada à protonação dos grupamentos amina do anel piridínico. Quando em pH ácido, no qual as cadeias estão protonadas resultando no afastamento das cadeias da superfície condutora de ITO devido a repulsão eletrostática, a troca de elétrons entre os grupamentos redox e superfície do eletrodo é permitida. Já em $\text{pH} > 6$, as cadeias poliméricas encontram-se neutras causando o colapso sobre a superfície, formando um filme hidrofóbico que dificulta a troca eletrônica. Os autores mostraram a propriedade comutativa do eletrodo variando-se o pH de ácido para neutro e a conseguinte aplicação do mesmo como plataforma para construção de biossensores de glicose.

Em outro trabalho de Katz et al (TAM et al., 2010c), estudaram eletrodos de ITO modificados com uma mistura de P2VP e PAA, sensíveis a variação de pH. O estudo foi realizado utilizando-se dois *probes* na solução, um positivo ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$) e outro negativo ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$). Em $\text{pH} < 3,0$ as escovas de P2VP estavam protonadas e positivamente carregada, gerando domínios hidrofílicos na superfície do eletrodo, o qual foi permeável as espécies negativamente carregadas $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$. Na faixa de pH de 4,0 a

5,0, a mistura de polímeros formou um complexo polieletrólítico hidrofóbico, criando uma barreira para qualquer espécie carregada, e em valores de $\text{pH} > 5,5$ os grupos carboxilas do PAA tornaram-se dissociados e negativamente carregado, criando domínios de cadeias estendidas carregadas negativamente, permeável somente a espécies catiônicas $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$. Com base neste estudo, podemos fazer uma previsão do comportamento dos polímeros separadamente. Espera-se que em pH ácido as escovas de P2VP sejam eletroquimicamente ativas, utilizando-se uma espécie redox negativamente carregada, e as escovas de PAA eletroquimicamente inativas em valores de $\text{pH} > 5,5$.

Estudos relacionados à variação de força iônica (ZHOU et al., 2006) também foram publicados para polímeros escova com estruturas semelhantes aos estudados. Wanless et al (WILLOTT; MURDOCH; HUMPHREYS, 2014) estudou o efeito do aumento da concentração de sal (KNO_3) no polímero escova PDEA (poli(2-dimetilamino) etil metacrilato), um polieletrólito básico. Neste estudo, foi possível observar uma diminuição na espessura do filme com o aumento da força iônica; em valores de pH favoráveis a uma resposta eletroquímica, o aumento da concentração salina fez com que houvesse uma diminuição considerável da resposta analítica mostrando que com o aumento gradual da força iônica as cadeias de PDEA se colapsaram gradualmente, isto porque as cargas das cadeias poliméricas são compensadas pelas cargas opostas dos íons provenientes do sal.

Também foi mostrado que dependendo do valor da força iônica, o PDEA se comporta segundo diferentes regimes salinos, sendo que em baixas concentrações de sal, o regime dominante é o osmótico, e em altas concentrações de sal, o regime dominante é o salino. Esse tipo variado de comportamento em relação aos regimes é devido as interações eletrostáticas entre as cargas das cadeias poliméricas e os contra íons das soluções salinas. Mesmo em polímeros escova modestamente carregados a diferença de regime pode ser observada devido a interação com os íons da vizinhança.

Quando o volume de contra íons no interior das escovas poliméricas faz com que a espessura do polímero seja comparável à do polímero carregado e estendido, os contra íons começam a exercer uma pressão osmótica sobre os segmentos das cadeias, a intensidade desta pressão é o que define os diferentes tipos de regime salino. No regime neutro, o estiramento das cadeias é ditado pelo equilíbrio entre o volume excluído dos monômeros e a entropia das cadeias. No regime osmótico, a espessura do filme é determinada pelo equilíbrio entre a pressão osmótica dos contra íons presos no interior da

cadeia e a entropia de estiramento das cadeias; neste regime, a maioria dos contra íons da vizinhança estão presos no interior das cadeias, fazendo com que haja uma diferença de concentração entre a solução e o interior do filme causando uma pressão osmótica, quando a pressão osmótica supera as forças de repulsão entre os segmentos da cadeia, temos o *regime osmótico*, neste caso, um polímero escova em pH desfavorável para a abertura das cadeias pode ter seus segmentos poliméricos estirados para longe da superfície somente pela adição de sal. No regime salino, a concentração de cargas iguais no interior do filme é consideravelmente menor que a concentração de sal na solução. Neste caso, a saturação das cadeias com contra íons, faz com que a distância efetiva das forças eletrostáticas entre as cadeias seja diminuída, fazendo com que as cadeias se colapsem sobre a superfície (WEIR; PARNELL, 2011; ZHULINA; BIRSHTEIN; BORISOV, 1995). A Figura 5 ilustra os três tipos de regime mencionados.

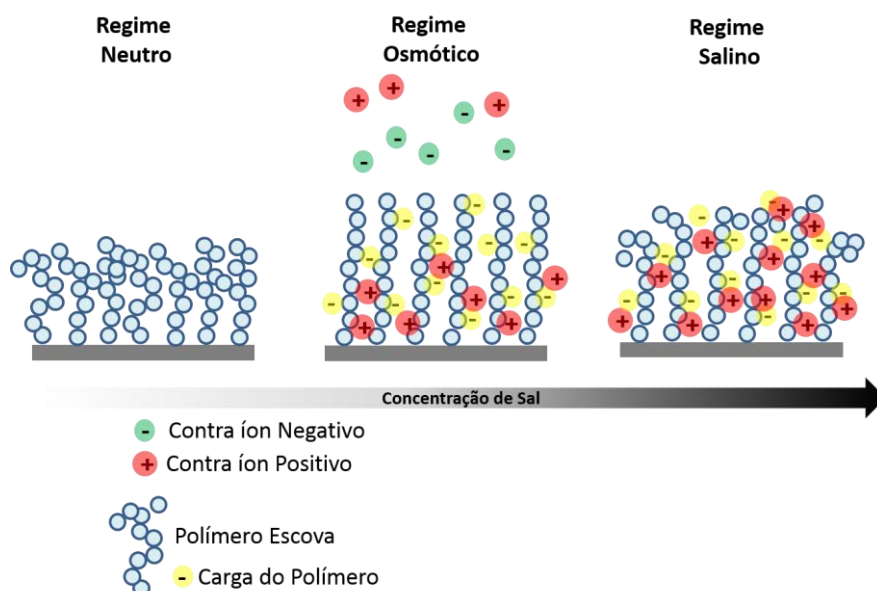


Figura 5. Esquema ilustrativo dos tipos de regime salino de um polímero escova submetido a diferentes concentrações de sal.

1.2 Estudos Plasmônicos

Atualmente, a técnica de ressonância plasmônica de superfície localizada (L-SPR) vem sendo bastante utilizada em estudos de transições de conformação em polímeros escova (BHAGAWATI; YOU; PIEHLER, 2013; MOCK et al., 2012; SZUNERITS; BOUKHERROUB, 2012; TOKAREV; TOKAREVA; MINKO, 2008). A ressonância plasmônica de nanopartículas de metais nobres (ouro, prata, platina) é altamente sensível a distância relativa entre uma nanopartícula e outra, quando imobilizadas em uma

superfície modificada com polímeros escovas, o comprimento de onda medido irá variar dependendo da conformação das cadeias poliméricas, que podem estar mais próximas ou mais afastadas entre si.

Na L-SPR, o sinal é medido na forma de luz absorvida relativa aos plasmas ressonantes do metal nanoplasmonico. Suspensões de nanopartículas de metais nobres interagem fortemente com a luz, dando origem a soluções coloridas.

Nanopartículas de ouro exibem uma banda de absorção forte no UV-vis que não está presente no espectro do *bulk* do metal (HAYNES; VAN DUYNE, 2001). Esta banda de absorção ocorre quando a frequência do fóton de luz incidente entra em ressonância com os elétrons da banda de condução (elétrons livres).

Esta oscilação coletiva é conhecida como ressonância plasmônica de superfície localizada (L-SPR). L-SPR ocorre em um comprimento de onda seletivo, com coeficiente de extinção molar extremamente alto de aproximadamente $3 \times 10^{11} \text{ (mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1} \text{cm}^{-1}$ (JENSEN et al., 2000), o espalhamento Rayleigh ressonante tem a eficiência equivalente a 10^6 fluoróforos (YGUERABIDE; YGUERABIDE, 1998) e o aumento do campo eletromagnético local próximo à superfície da nanopartícula é responsável pelos sinais intensos observados em todas as espectroscopias de superfícies “enhanced” (G.C. SCHATZ AND R.P. VAN DUYNE, 2002).

A Figura 6 mostra a diferença entre SPR (espectroscopia plasmônica de superfície) e L-SPR (espectroscopia plasmônica de superfície localizada). O brilho característico das superfícies metálicas é devido ao fenômeno de ressonância plasmônica, na qual os elétrons livres da camada de valência da superfície dos metais entram em ressonância com a luz incidida, emitindo luz. Essa emissão ocorre em ambos os eixos x e y da superfície e se propaga continuamente pela superfície. Na L-SPR essa ressonância fica confinada na superfície da nanopartícula, localizada sobre a mesma. A propagação ocorre em apenas um eixo, intensificando o sinal de ressonância (WILLETS; VAN DUYNE, 2007a).

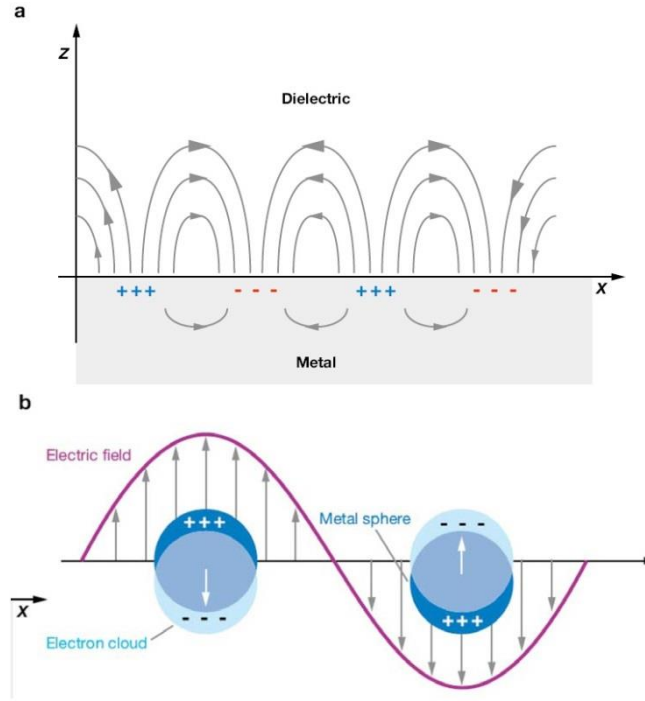


Figura 6. Diagrama esquemático ilustrando: A) Polarização de plasma de superfície ou propagação plasmônica. B) Plasma de superfície localizado (adaptado de WILLETS; VAN DUYNE, 2007b).

A aproximação teórica mais simplificada para modelar as propriedades ópticas das nanopartículas é a teoria de Mie, que estima a extinção de uma esfera metálica em longos comprimentos de onda, limitado pelo dipolo eletrostático. A equação 1 descreve este comportamento (HAES; VAN DUYNE, 2004):

$$E(\lambda) = \frac{24\pi N_A a^3 \varepsilon_m^{\frac{3}{2}}}{\lambda \ln(10)} x \frac{\varepsilon_i}{(\varepsilon_r + \chi \varepsilon_m)^2 + \varepsilon_i^2} \quad \text{Equação 1}$$

$E(\lambda)$ é a extinção (soma da absorção e espalhamento), N_A é a densidade de área da partícula, a é o raio da nano esfera metálica ε_m a constante dielétrica do meio (assume-se que seja um numero real positivo independente do comprimento de onda), λ é o comprimento de onda da radiação absorvida, ε_i é a porção imaginária da função dielétrica da partícula metálica, ε_r é a parte real e χ é o termo que descreve a razão de aspecto da nanopartícula (igual a 2 se for uma esfera). O espectro L-SPR de uma nanoesfera isolada em um meio externo dielétrico depende do raio da nanopartícula (a), do material da nanopartícula (ε_i e ε_r) e da constante dielétrica do meio (ε_m).

Quando as nanopartículas estão (em solução) mais próxima uma da outra (espaçamento entre as nanopartículas menor que o diâmetro da nanopartícula), é possível

que haja interação eletromagnética através do mecanismo de acoplamento dos dipolos. Este fenômeno causa um deslocamento para o vermelho no espectro de L-SPR. Esta mudança pode ser facilmente monitorada usando espectroscopia no UV-vis.

Estas mudanças na posição das nanopartículas vêm sendo largamente empregada como base para sensores plasmônicos. Muitos trabalhos já foram publicados sobre o tema (GUPTA et al., 2008; SANNOMIYA et al., 2010; TOKAREVA et al., 2004). Atualmente, sensores de L-SPR são considerados altamente sensíveis. Técnicas de detecção de DNA reportaram limites de detecção na faixa de dez fentomolares (MUCIC et al., 1998; PARK; TATON; MIRKIN, 2002; STORHOFF et al., 2000).

Tokarev *et al* (TOKAREV; MOTORNOV; MINKO, 2009) reportaram um sistema de polímero/metal nobre composto por um filme fino de escovas P2VP e nanopartículas de ouro para proporcionar o monitoramento de mudanças no pH da solução por meio de um sinal óptico melhorado. Eles relataram um deslocamento de 50 nm para menores comprimentos de onda quando o pH passou de 5,0 para 2,0, mostrando que a variação do pH leva ao deslocamento do comprimento de onda observado.

Tais técnicas de monitoramento do pH em sistemas polímero/nanopartículas também podem ser empregadas para o estudo de outras variáveis, como por exemplo a força iônica, pois a variação da força iônica provoca variação conformacional das cadeias poliméricas. Se uma quantidade de sal é adicionada ao sistema, as cargas das cadeias poliméricas podem ser neutralizadas com os contra-íons, levando a um colapso da escova, fazendo com que as nanopartículas fiquem mais próximas entre si, variando-se o comprimento de onda medido. Pouco ou nenhum trabalho foi publicado utilizando-se L-SPR no estudo de polímeros escovas e força iônica.

1.3 Caracterizações de Superfícies Modificadas com Polímeros Escova

A caracterização de polímeros escova não é uma tarefa simples. Existem diversas técnicas disponíveis para tal fim. Na Tabela 1 podemos ver diversas ferramentas para o estudo e caracterização de polímeros-escova (SCHÜWER, 2011).

Quadro 1. Principais técnicas de caracterização de polímeros escova.

Propriedade	Método														
	SPM*	Microscopia óptica e eletrônica	Eletroquímica	Elipsometria	Espectroscopia no Infravermelho	Medida de Ângulo de Contato	SPR*	TOF-SIMS*	QMC (-D)*	XPS*	XRR*	TGA*	NR*	GPC*	NEXAFS*
Composição química e estrutura					X	X		X		X					X
Espessura	X	X		X							X	X	X		
Peso molecular e distribuição de peso molecular	X													X	
Densidade da escova	X			X								X		X	
Topografia e estrutura de superfície	X	X				X		X		X	X				
Rigidez	X								X						
Conformação e entumecimento	X		X	X	X	X	X		X				X		X
Cinética de polimerização	X			X					X						
Propriedades eletrônicas e eletroquímicas			X												

* Microscopia de varredura por sonda (SPM); ressonância plasmônica de superfície (SPR); espectrometria de massa de íons secundários por tempo de voo (TOF-SIMS); microbalança de cristal de quartzo com monitoramento de dissipação (QCM(-D)); espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS); refletividade de raios X (XRR); análise termogravimétrica (TGA); refletividade de nêutrons (NR); cromatografia de permeação em gel (GPC); espectroscopia de estrutura fina de absorção de raios X (NEXAFS).

Considerando-se a literatura revista neste trabalho, podemos afirmar que sistemas de polímeros escovas podem ser utilizados em várias aplicações, tais como superfícies com propriedades comutáveis e adesivas, sistemas capazes de se adaptar ao ambiente, sensores e *drug delivery*. As aplicações nas áreas ambiental, bioquímica, e biomédica são apenas alguns exemplos de áreas importantes que podem se beneficiar grandemente de futuros avanços dos materiais poliméricos responsivos.

Os sistemas responsíveis, utilizando-se polímeros escova, podem ser introduzidos em muitos produtos a baixo custo, uma vez que somente uma fina camada polimérica é necessária para garantir a funcionalidade do mesmo. A propriedade adicionada pela aplicação deste material pode agregar um valor considerável no produto final. Sendo assim, a área industrial também seria bastante beneficiada pelo desenvolvimento das superfícies responsivas. No presente trabalho é estudado como estes materiais, especificamente PAA, P2VP, PDMAEMA e a mistura de P2VP e PAA, respondem a variação de estímulos externos, tais como a variação de pH e de força iônica. Estes parâmetros são fáceis de serem controlados e abrangem grande faixa de aplicação. Os conceitos aqui apresentados irão contribuir para o desenvolvimento da área de materiais *smart*, abrindo oportunidades de estudos e aplicações diversificadas utilizando-se os polímeros escovas.

2. OBJETIVO

Produção de filmes finos polieletrólitos em escova pelo método “grafting to”. Caracterização dos mesmos e estudo das propriedades estímulo-responsivas a variação de pH e força iônica, que causam mudanças conformacionais e estruturais na superfície do eletrodo modificado.

2.1. Objetivos Específicos

- a. Modificação superficial do eletrodo de ITO com polímeros escovas (PAA, P2VP, PDMAEMA e mistura de P2VP e PAA) via método “grafting to” e nanopartículas de ouro;
- b. Caracterização das nanopartículas sintetizadas;
- c. Caracterização dos filmes poliméricos em escova;
- d. Estudo das propriedades estímulo responsivas dos polímeros escova com relação à variação de pH e força iônica.
- e. Utilização dos eletrodos modificados com polímeros escova como biosensores de glicose e imunossensor para detecção do vírus da cinomose canina.

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1. Reagentes e Soluções

Poli(ácido acrílico) (PAA) (P-3981-AA, MW = 1700 g mol⁻¹, Polymer Source), Poli (2-vinil piridina) com terminações carboxílicas (P2VP) (P7546-2VPCOOH, MW = 10800 g mol⁻¹, Polymer Source), Poli (dimetil amino etil metacrilato) (PDMAEMA) (P9739-DMAEMA, MW = 3100 g mol⁻¹, Polymer Source), 3-glicidiloxipropil-trimetoxissilano (GPS, Sigma-Aldrich), Citrato de trisódio desidratado, tolueno, hexacianoferrato de potássio (II) tri-hidratado (Sigma-Aldrich), hexaammineruthenium (III) chloride, [Ru(NH₃)₆]Cl₃ (Sigma-Aldrich), cloreto de sódio (Sigma-Aldrich), tetracloroaurato de hidrogênio (III) (HAuCl₄·3H₂O), ss-DNA (5'-/56-FAM/TGC AGA CGT TGA AGG ATC CTC -3') (Integrated DNA Technologies), glicose oxidase (GOx) tipo X-S (E.C. 1.1.3.4, Sigma-Aldrich), N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma-Aldrich), N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (Sigma-Aldrich), ácido 11-mercaptopundecanóico (Sigma-Aldrich). Eletrodo flexível de Óxido de índio e estanho (ITO)-coated PET (resistividade superficial de 60 Ω sq⁻¹, Sigma-Aldrich) foi usado como substrato para o eletrodo de trabalho, Pt/Ti (fio anódico de titânio ETO78) foi usado como contra eletrodo e eletrodo de referência de Ag/AgCl (3,0 mol·L⁻¹). Água ultrapura do sistema de purificação Milli-Q (Millipore Inc.) 18,2 MΩ·cm foi empregada tanto na lavagem dos materiais como na preparação de soluções.

3.2. Metodologia

3.2.1. Preparo de Nanopartículas de Ouro

20 mL de HAuCl₄ 1,0 mmol·L⁻¹ foram aquecidos até ebulição em um erlenmeyer sobre agitação e refluxo. Em seguida, 2 mL de Na₃C₆H₅O₇ 38,8 mmol·L⁻¹ foram adicionados de uma vez e o aquecimento foi mantido até a solução mudar de cor de transparente para vermelho vinho (aproximadamente 10 min). Após mudança de coloração, o aquecimento foi desligado e agitação mantida. A solução foi deixada resfriar em temperatura ambiente e estocada em frasco escuro (MCFARLAND et al., 2004).

3.2.2. Modificação do Eletrodo

Os eletrodos de ITO foram quimicamente modificados com polímeros escovas utilizando-se o método “grafting-to” de acordo com o seguinte procedimento (TAM et al., 2008). Os eletrodos ITO foram cortados em tiras de 30 mm × 8 mm e limpos

utilizando-se 30 mL de etanol em banho ultrassônico por 15 min e secos em atmosfera ambiente. O processo de limpeza foi repetido utilizando-se 2-butanona. Em seguida, os eletrodos foram imersos em solução composta de NH_4OH , H_2O_2 , e H_2O na razão de 1:1:1 (v/v/v) durante 30 min, lavados com água e secos em nitrogênio. Os eletrodos recém-lavados foram colocados para reagir com 0,1% v/v GPS em tolueno seco, *overnight*. Os eletrodos silanizados foram lavados com várias alíquotas de tolueno. Em seguida, 60 μL de polímero 1% m/m em tolueno foram depositados sobre a superfície do eletrodo por *spin-coating* a 3000 rpm e deixado para reagir em forno a 140 °C *overnight*. Para a modificação com P2VP/PAA, primeiramente o polímero escova P2VP foi depositado sobre a superfície e deixado para reagir em forno (mesmas condições) por 1 hora, logo após, o eletrodo foi lavado com tolueno e PAA foi depositado sobre o eletrodo ITO/P2VP e deixado a reagir em forno por 2 horas, após modificação o eletrodo foi lavado várias vezes com tolueno. A Figura 7 ilustra o procedimento de limpeza e modificação empregado neste trabalho.

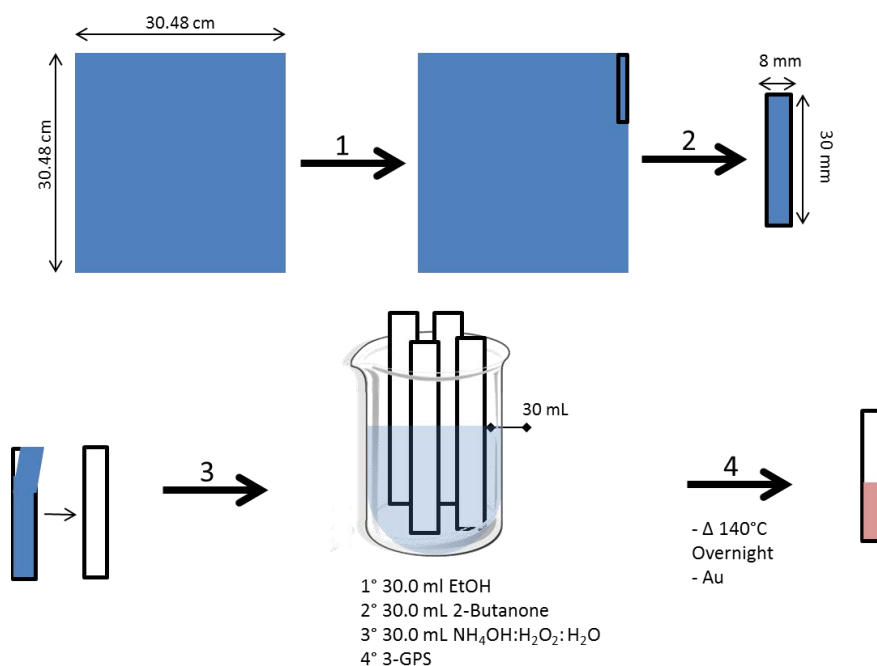


Figura 7. Representação esquemática do processo de limpeza e modificação do eletrodo ITO.

O passo final da modificação do eletrodo foi a remoção de polímeros não ligados, deixando os eletrodos em tolueno por 10 min e finalmente, nanopartículas de ouro em solução aquosa foram depositadas gota a gota (600 μL) na superfície do eletrodo. Os eletrodos modificados, contendo as nanopartículas sobre sua superfície, foram deixados

incubando *overnight*. Os eletrodos foram lavados com água para remoção das nanopartículas não ligadas.

3.3. Modificação superficial

A modificação da superfície inicia-se com a adição da solução de NH_4OH , H_2O_2 , e H_2O na razão de 1:1:1 (v/v/v) que proporciona a exposição de grupamentos hidroxilas na superfície do eletrodo. Após hidroxilação, a superfície foi deixada para reagir *overnight* com GPS para que ocorresse a silanização. Neste processo, uma molécula de metanol é liberada ocorrendo ligação química da molécula GPS na superfície.

Após silanização, ocorre a modificação do eletrodo com o polímero apropriado, que deve ter em sua cadeia polimérica, grupos capazes de reagir com o grupamento epóxi dos GPS. No caso do PAA, o grupamento carboxila reage com os grupos epóxi formando ligações ésteres, que faz com que o polímero fique ligado quimicamente à superfície e em uma configuração na qual parte das cadeias pode estar estendida para longe da superfície, promovendo propriedades de polímero escova ao sistema (este mesmo mecanismo pode ser considerado para o P2VP e PDMAEMA), (TAM et al., 2010a). No caso dos polímeros “mixed”, a modificação com o primeiro polímero utiliza apenas parte dos sítios ativos da superfície silanizada, este controle é feito pelo tempo em que o polímero fica sob alta temperatura e pressão. Os sítios não ocupados reagem com o segundo polímero, assim, ambos os polímeros ficam aleatoriamente aderidos via ligação química a superfície do eletrodo. Os passos da modificação podem ser observados na Figura 8.

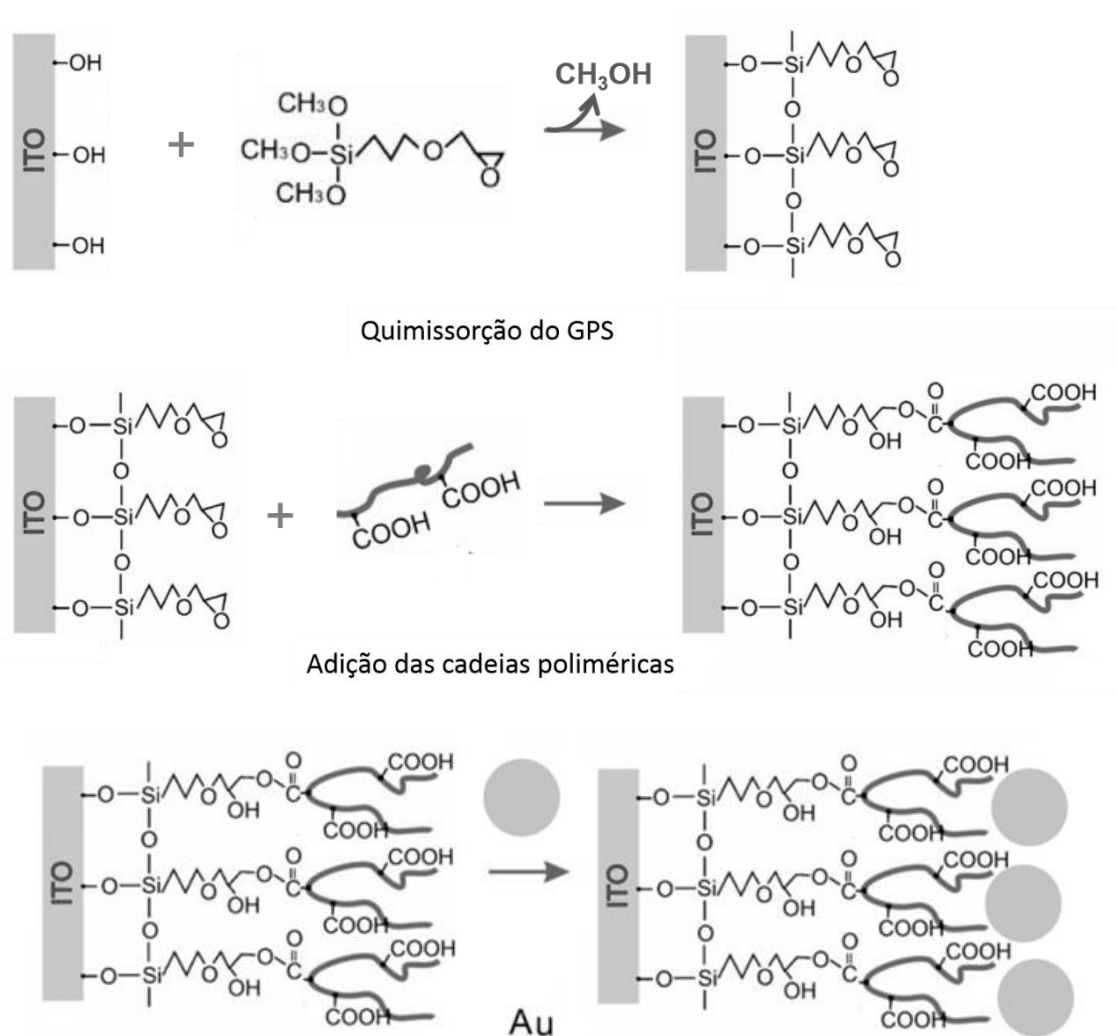


Figura 8. Processo de adsorção do PAA no eletrodo de ITO.

A probabilidade dos grupamentos carboxilas de uma única cadeia ocupar todos os sítios ativos é baixa, pois assim, ela ficaria completamente imobilizada na superfície, reduzindo drasticamente a entropia do sistema.

A adsorção das nanopartículas de ouro foi o último passo da modificação, as nanopartículas se aderem eletrostaticamente nas moléculas do polímero.

3.4. Procedimento Experimental

3.4.1. Análises Eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas com um equipamento ECO Chemie Autolab Microautolab III/FRA2 com um analisador eletroquímico e o pacote de software GPES 4.9 (General Purpose Electrochemical System). As medidas de voltametria cíclica (CV) e impedância eletroquímica (IE) foram realizadas com um sistema de três eletrodos em uma célula padrão eDAQ (Australia) ET-073, utilizando o ITO modificado com polímero escova como eletrodo de trabalho, o eletrodo de referência usado foi o de Ag/AgCl/KCl 3 mol·L⁻¹ e um fio anódico de platina Pt/Ti ETO78 como contra eletrodo. A Figura 9 mostra a configuração da célula eletroquímica utilizada.

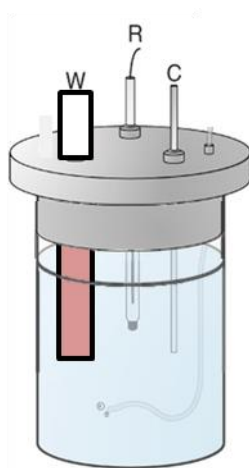


Figura 9. Representação esquemática da célula eletroquímica utilizada durante os experimentos, com W(eletrodo de trabalho – ITO modificado), R (eletrodo referência) e C (contra eletrodo).

As voltametrias cíclicas foram realizadas de -0,2 até 0,7 V e velocidade de 50 mV s⁻¹. As análises de impedância eletroquímica foram realizadas aplicando-se um potencial de 0,3 V e usando-se uma perturbação de 10 mV na faixa de frequência de 100 kHz-100 mHz. Todas as soluções foram tamponadas com tampão fosfato 0,01 mol·L⁻¹ titulado com NaOH ou HCl para atingir os valores de pH especificados no texto. As medidas foram feitas utilizando-se como probe 1,2 mol·L⁻¹ do íon ferrocianeto [Fe(CN)₆]⁴⁻ e/ou 0,6 mol·L⁻¹ do íon [Ru(NH₃)₆]⁺³. Foram analisadas a segunda varredura dos voltamogramas obtidos. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente (24 ± 2 °C). As medidas de pH foram realizadas com o equipamento Metrohm 827 pH Lab com 98% de acuracidade. Para as análises de variação de força iônica, concentrações de 0,001;

0,005; 0,010; 0,050; 0,100; 0,500 e 1,000 mol·L⁻¹ de NaCl foram adicionadas em solução PBS de pH constante e igual a 7,4.

3.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

As micrografias de MEV foram realizadas utilizando-se o Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 200 da Fei Company. Os eletrodos foram cortados em retângulos de 2 mm por 8 mm e colados de quatro em quatro amostras sobre os *stubs* com fita dupla face. As análises foram realizadas após metalização com Au.

3.4.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão - TEM

As micrografias de TEM foram realizadas utilizando o equipamento CM100, Philips. Grades utilizadas como suporte foram recobertas com parafina e sobrepostas sobre uma gota de solução de nanopartícula de ouro por 5 minutos. Em seguida foi deixada para secar a temperatura ambiente *overnight*.

3.4.4. Microscopia de Força Atômica - AFM

Os experimentos de AFM foram feitos utilizando-se o modelo Nanosurfer. Para minimizar a deformação e evitar remoção do material, os experimentos foram realizados no modo intermitente de não contato, utilizando-se um *cantilever* de silício com constante de mola de 70 Nm⁻¹ com varredura de 1Hz. Todos os experimentos foram realizados a temperatura ambiente.

3.4.5. Análises Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada

Uma série de espectros de UV-vis, usando os eletrodos de ITO modificados com polímeros escova e nanopartículas de ouro como plataforma plasmônica, foi obtida por meio de soluções com pH de 3,0 a pH 7,4 usando um espectrofotômetro Biochrom Libra S11. As medidas espectroscópicas foram feitas em tampão fosfato de sódio de acordo com o esquema da Figura 10. Os espectros foram realizados de 400-600 nm com passo de 1 nm e velocidade de varredura de 500 nm min⁻¹. Um espectro de referência utilizando somente tampão em todos os pHs foi usado antes de cada medida. Para as análises de variação de força iônica, concentrações de 0,001; 0,005; 0,010; 0,050; 0,100; 0,500 e 1,000 mol·L⁻¹ de NaCl foram adicionadas a solução tampão de pH constante e igual a 7,4.

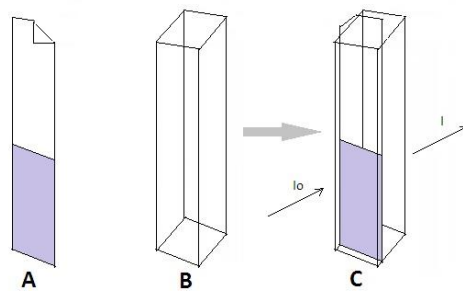


Figura 10. Representação esquemática para os experimentos de espectroscopia no UV-vis. A) Eletrodo ITO modificado com uma dobra indicativa da superfície modificada. B) Cubeta com caminho óptico de 1 cm. C) Eletrodo dentro da cubeta com a face não modificada voltada para a luz incidida e a parte modificada voltada para a solução.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Nanopartículas de Ouro

Dentre os vários procedimentos disponíveis na literatura (GUPTA et al., 2008; PARK; TATON; MIRKIN, 2002; ROITER et al., 2012; WANG; IRUDAYARAJ, 2008), o procedimento utilizado neste trabalho foi escolhido devido sua simplicidade, rapidez e baixo custo. A utilização do boro hidreto de sódio, um reagente comumente utilizado na síntese de nanopartículas, de alto custo e periculosidade, não é empregado na síntese descrita por MCFARLAND et al., 2004.

Neste procedimento, citrato trissódico foi utilizado como agente estabilizante e redutor. Antes da adição do agente redutor, 100% dos íons de ouro estão em solução, imediatamente após a adição do agente redutor, os átomos de ouro começam a ser formados, e a concentração cresce rapidamente até atingir supersaturação. Em seguida, ocorre a agregação, em um processo chamado nucleação. Uma vez iniciada, os átomos de ouro remanescente continuam a se ligar aos sítios de nucleação até que todos os átomos são removidos da solução. Quanto maior o número de sítios de nucleação, menor as partículas produzidas (KIMLING et al., 2006).

4.1.1 Caracterização

Para caracterização das nanopartículas sintetizadas, foram obtidas micrografias utilizando-se microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (Figura 11A). As micrografias mostraram uma distribuição homogênea e pouca agregação.

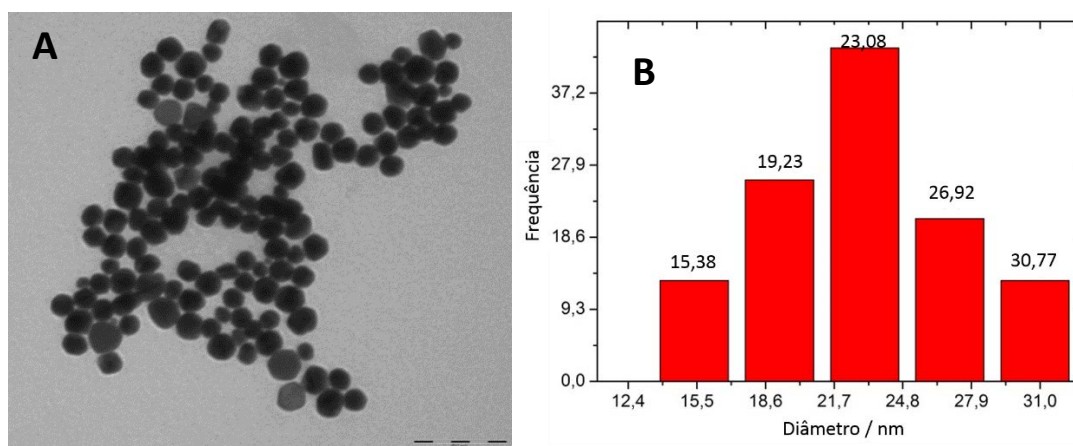


Figura 11. A) Micrografia (TEM) nanopartículas de Au, escala: 0,1 μm . B) Distribuição de tamanho, N=400 (ImageJ).

A análise das micrografias através do software ImageJ mostrou que o diâmetro médio das partículas foi de $23,1 \pm 3,8$ nm, com polidispersividade de 14,3% (Figura 11B), de acordo com o esperado pelo método de síntese utilizado (MCFARLAND et al., 2004).

Medidas de espectroscopia no ultravioleta visível (UV-vis) foram feitas, obtendo-se uma absorção em 530 nm (Figura 12). O resultado está de acordo com o esperado utilizando-se o método descrito na literatura (MCFARLAND et al., 2004).

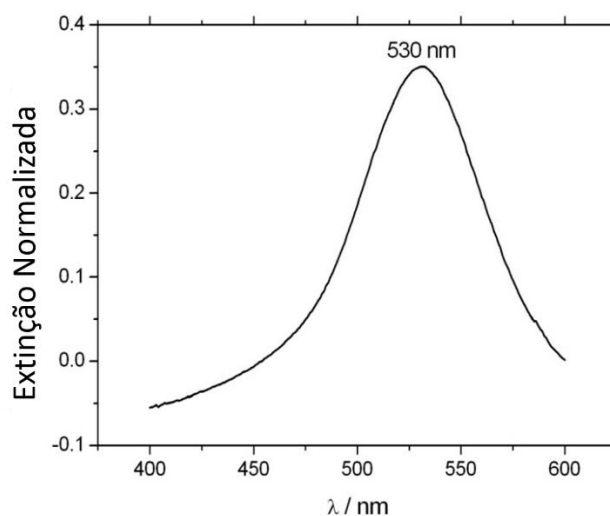


Figura 12. UV-vis Nanopartículas Au, pico de absorção obtido: 530 nm.

O emprego das nanopartículas de Au na composição do filme sobre o eletrodo mostrou-se eficaz, aumentando a intensidade do sinal. O aumento de sinal mostrou-se da ordem de 10x quando comparado com o sistema sem as nanopartículas. Abaixo podemos observar um voltamograma obtido sem a presença das nanopartículas (Azul) comparado com o sistema com as nanopartículas sobre o polímero (Preto). Sem as nanopartículas o valor máximo da corrente de pico é de aproximadamente 0,015 mA e com as nanopartículas, de 0,15 mA conforme a Figura 13.

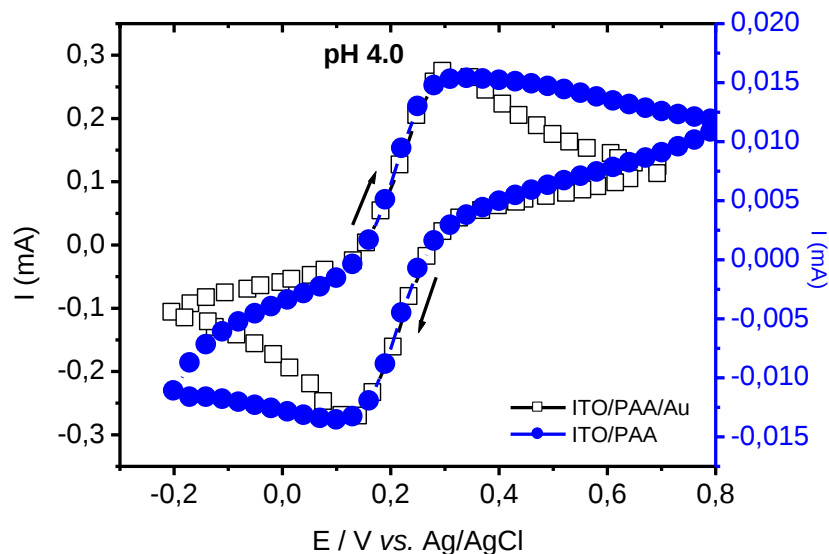


Figura 13. Eletrodo ITO modificado com PAA (curva azul). Eletrodo ITO modificado com PAA/Au (curva preta).

4.1.2 Potenciais aplicações

A síntese de nanopartículas de ouro baseadas no uso de citrato tem como particularidade o fato de que uma camada de ânions citratos se adsorve na superfície de cada nanopartícula provocando repulsão eletrostática que impede a aglomeração das mesmas. Utilizando o método descrito, as nanopartículas absorvem em 530 nm (região do verde) e possuem coloração avermelhada (Figura 14) (MCFARLAND et al., 2004).

Quando um eletrólito forte é adicionado à solução, a alta concentração de íons bloqueia as forças eletrostáticas entre as nanopartículas. Devido à eliminação das forças repulsivas, as nanopartículas se agregam. Conforme o espaço entre as nanopartículas diminui para valores menores que o diâmetro médio, a solução absorve a luz em maiores comprimentos de onda 650 nm, assim, a solução se torna púrpura (Figura 14).

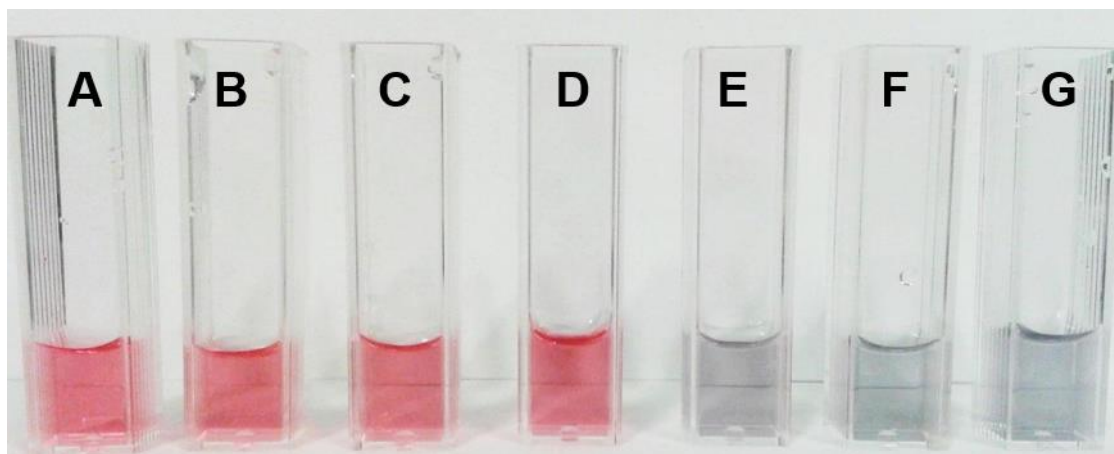


Figura 14. Nanopartículas de ouro com A) 0,001; B) 0,005; C) 0,010; D) 0,050; E) 0,100; F) 0,500 e G) 1,000 mol·L⁻¹ de NaCl, respectivamente.

Se uma quantidade muito alta de eletrólito for adicionada, as nanopartículas se agregam e ocorre precipitação, deixando a solução incolor. Foi observado que depois de 24h as soluções com as nanopartículas em solução de concentrações 0,100; 0,500 e 1,000 mol·L⁻¹ de NaCl também ficaram incolores.

A variação do pH do meio também provoca mudanças na coloração das nanopartículas. Em pH ácido as partículas se agregam e a coloração fica púrpura e em pH básico a coloração é avermelhada. Na Figura 15 encontra-se soluções com variação de pH de 3,00 até 7,40. As duas últimas amostras são referentes ao meio extremamente ácido (púrpura) e extremamente básico (vermelha), respectivamente. Em baixos valores de pH existe uma alta concentração de íons hidrônios (H₃O⁺) que diminuem a força de repulsão entre as partículas, permitindo que as mesmas se agreguem, e em altos valores de pH, há um aumento de íons de carga negativa (hidroxilas, OH⁻) que ajudam a estabilizar as partículas aumentando a força de repulsão entre as mesmas.



Figura 15. Nanopartículas de ouro com pH A) 3,0; B) 4,0; C) 4,35; D) 4,65; E) 5,0; F) 6,0; G) 7,4; 1) 2,0 e 2) 12,0 respectivamente.

Na Figura 16 é ilustrada os efeitos que causam a aproximação e separação das nanopartículas de ouro conforme varia-se a concentração de NaCl e valores de pH.

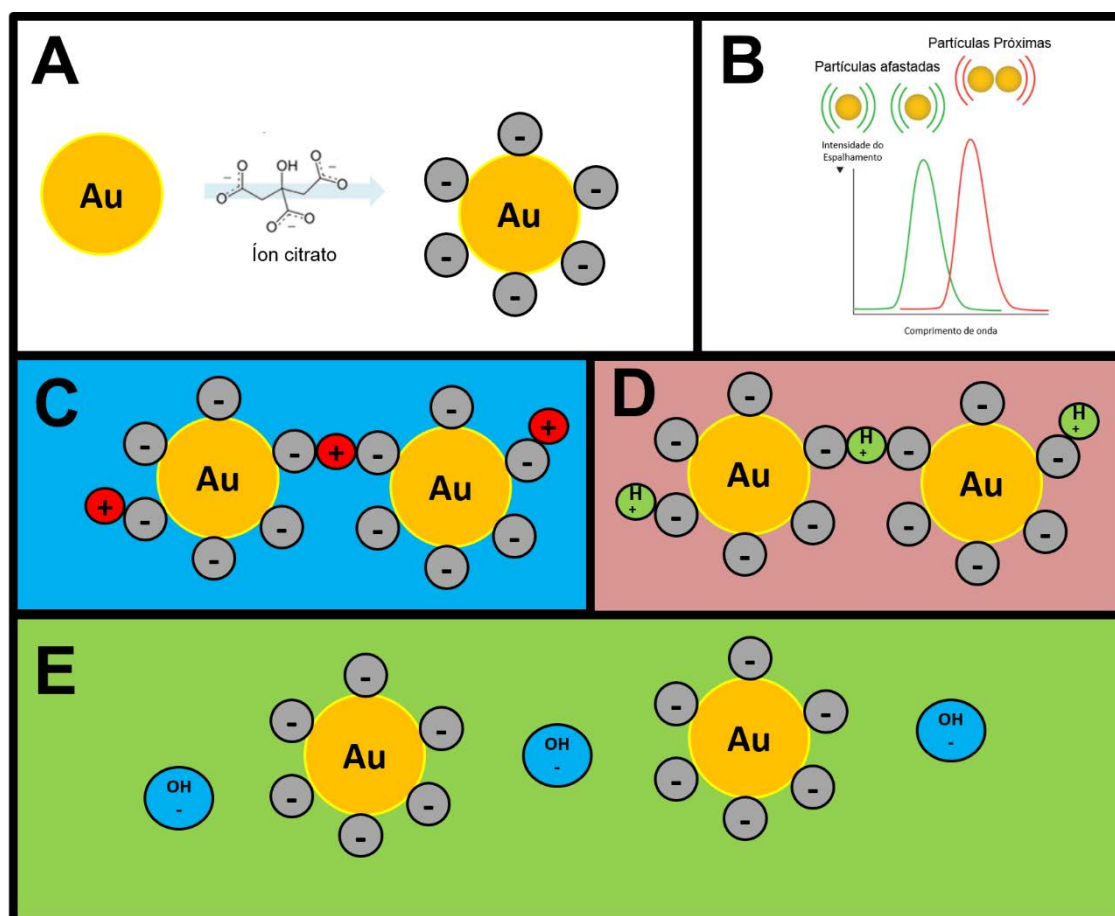


Figura 16. A) Nanopartículas carregadas negativamente devido ao uso de citrato como agente estabilizante. As cargas negativas estabilizam os colóides, prevenindo que se agreguem e precipitem. B) Mudança no espectro para maiores comprimentos de onda quando as nanopartículas de ouro se aproximam e para menores comprimentos de onda quando as nanopartículas se afastam. C) Aproximação das nanopartículas devido ao aumento da concentração de contra-íons. D) Aproximação das nanopartículas devido a diminuição do pH. E) Afastamento das nanopartículas devido ao aumento do pH.

Devido a estas propriedades de mudança de coloração conforme as variações do meio externo, as nanopartículas de ouro apresentam grande potencial de uso como plataforma de sensores; que vão desde sensores com simples *design* como os de pH e força iônica já discutidos, onde não se utiliza de nenhuma modificação química posterior a síntese das mesmas, até os sensores mais elaborados, onde modificações adicionais das nanopartículas com biomoléculas dão origem a diferentes tipos de sensores.

4.2 Poli(ácido acrílico) – PAA

4.2.1 Caracterização

Micrografias por MEV foram feitas antes da modificação do ITO (Figura 17A), depois da adsorção do polímero (Figura 17B) e finalmente após a adsorção das nanopartículas de ouro (Figura 17C). Analisando estas micrografias, podemos notar a homogeneidade do filme polimérico e da cobertura das nanopartículas de Au. Houve um significativo aumento da rugosidade da superfície depois da adição das mesmas.

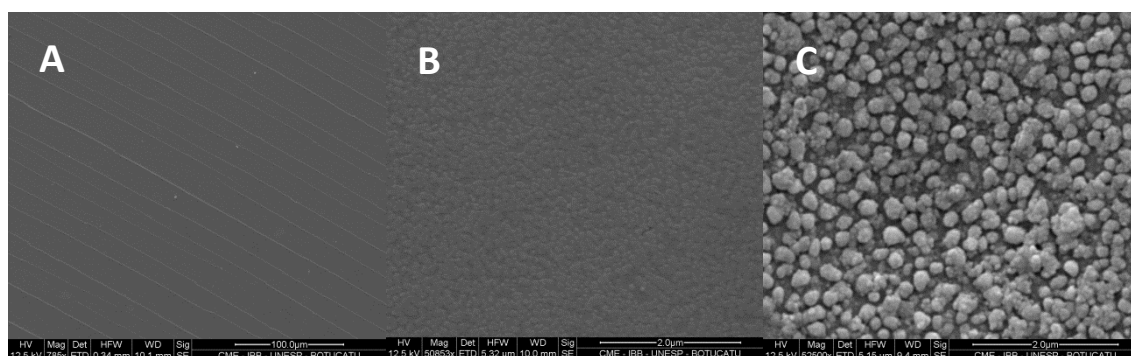


Figura 17. Micrografias MEV A) ITO, barra de escala: 100 μm. B) ITO modificado com o filme de PAA, barra de escala: 2 μm. C) ITO modificado com PAA e nanopartículas de Au, barra de escala: 2 μm.

A composição do filme já recoberto com as nanopartículas de ouro foi analisada por meio da energia dispersiva de raios-X (EDX) (Figura 18). Como esperado, pode-se observar o pico referente ao ouro (Au), referente às nanopartículas (e/ou metalização); ao índio (In) e ao estanho (Sn), que fazem parte da composição do plástico ITO; além de carbono (C) e oxigênio (O) referentes ao PAA.

Estes testes também foram realizados após a utilização do eletrodo em vários ensaios eletroquímicos utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ como *probe* para a reação de oxidação. Conforme análise de EDX aqui mostrada, o Fe não fica adsorvido na superfície do eletrodo.

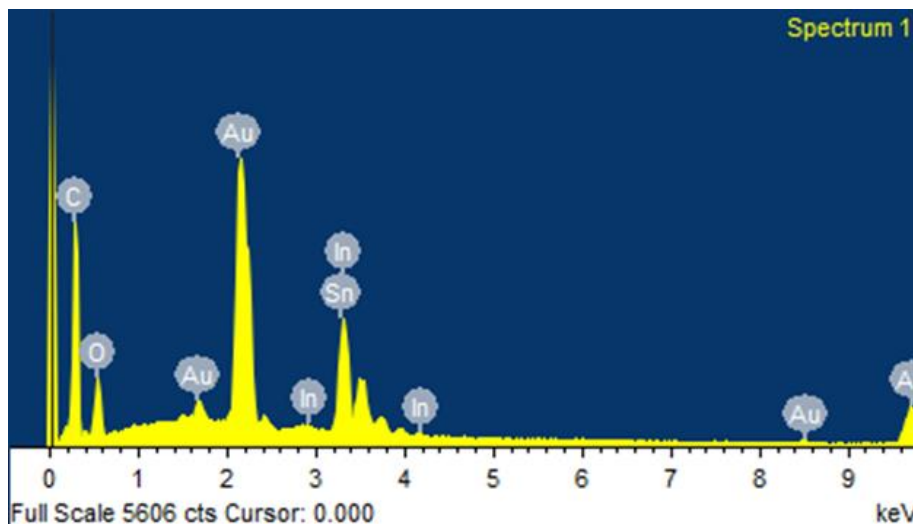


Figura 18. EDX do eletrodo ITO modificado com PAA e nanopartículas de ouro.

A morfologia do eletrodo modificado foi analisada por meio de micrografias de microscopia de força atômica (AFM) (Figura 19A e 19B). Ao analisar as micrografias da Figura 19A, correspondente à modificação até a etapa de recobrimento com PAA, podemos notar que o filme formado é macroscopicamente homogêneo com domínios segregados (clusters com diâmetro médio de $0,13 \pm 0,02 \mu\text{m}$, rugosidade rms de 2,6 nm). A rugosidade aumenta para raiz média quadrática (rms) 28,0 nm quando a superfície é recoberta com nanopartículas de ouro (Figura 19B).

Os domínios segregados observados são forte indicativos das ondulações (micelas) causadas pelo regime escova (WILLIAMS, 1993).

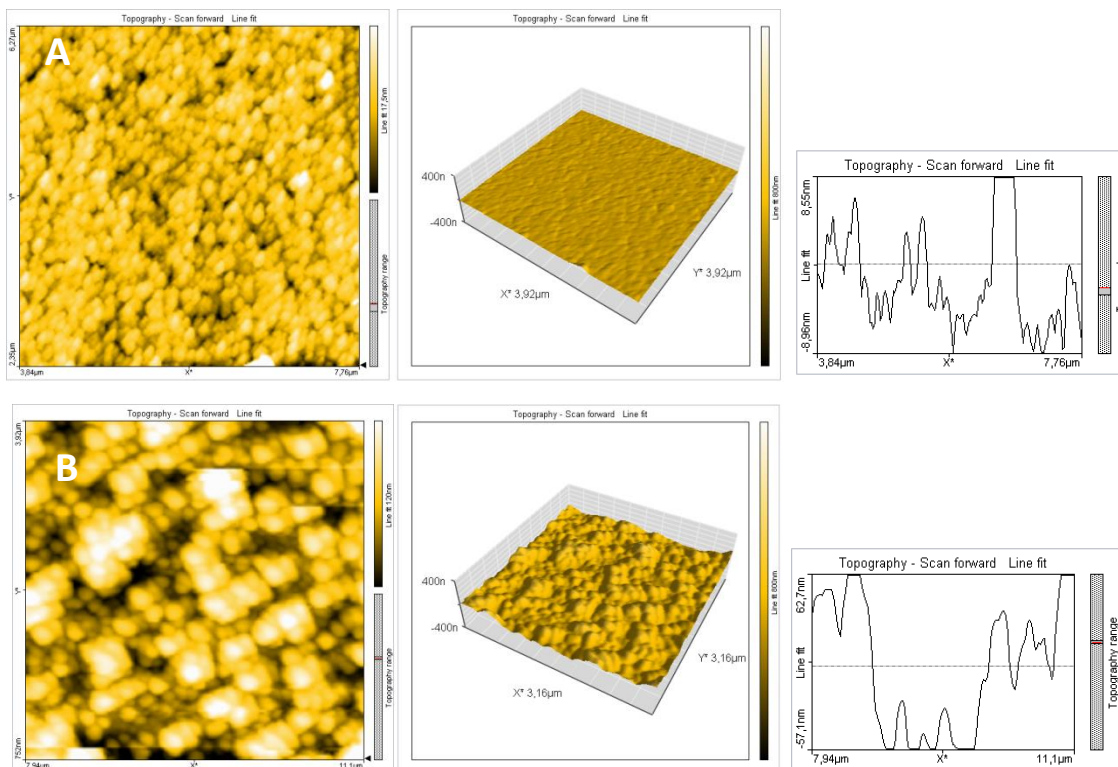


Figura 19. – Micrografias de AFM e *cross-sections* do eletrodo modificado com PAA. A) Eletrodo modificado até a etapa de PAA, rugosidade rms de 2,6 nm. B) Eletrodo ITO modificado até a etapa das nanopartículas de ouro, rugosidade rms de 28,0 nm.

O método empregado para modificação da superfície do eletrodo foi eficaz. A micrografia do PAA mostra a descamação do filme formado, indicando principalmente, a existência de um filme fino. Figura 20.

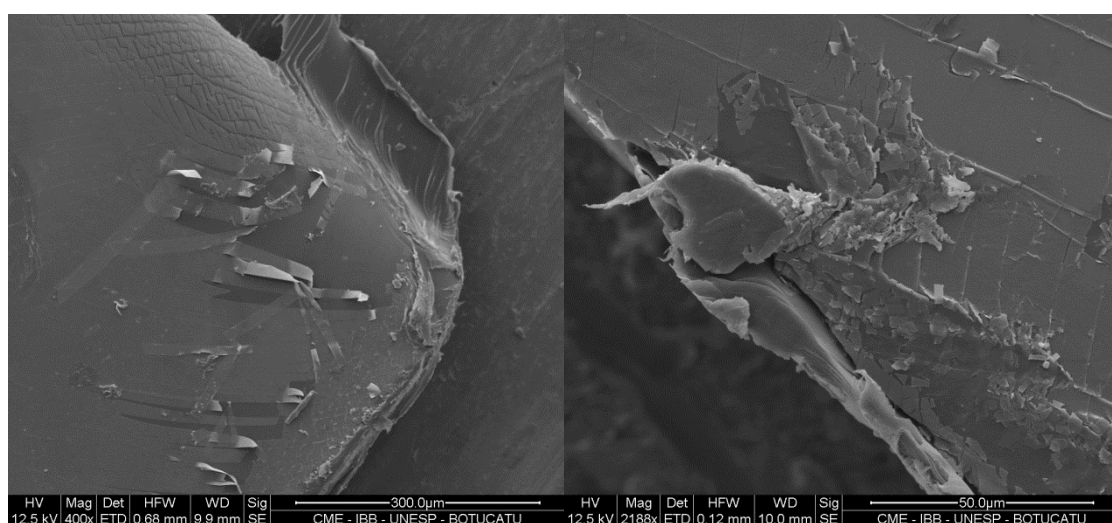


Figura 20. Eletrodo PAA. Micrografias mostrando descamação do filme formado.

4.2.2 Ensaios variando-se o pH

4.2.2.1 Eletroquímica

O PAA é um políácido (grupo carboxílico) fraco com pK_a de 4,7 (TAM et al., 2008), assim, em $pH = 4,7$ suas cadeias poliméricas estão quase neutras e a superfície torna-se hidrofóbica, em $pH > 4,7$, nos quais os grupos carboxílicos (90%) encontram-se desprotonados e carregados negativamente. A configuração das cadeias torna-se então muito sensível à variação de pH . Na Figura 21, podemos observar o esquema ilustrativo da mudança conformacional do polímero escova, quando desprotonado, as cadeias de PAA estão estendidas, longe da superfície, e quando neutras, as cadeias se colapsam, ficando mais próximas à superfície do eletrodo. Estas mudanças conformacionais afetam as propriedades eletroquímicas, para todos os pH s estudados.

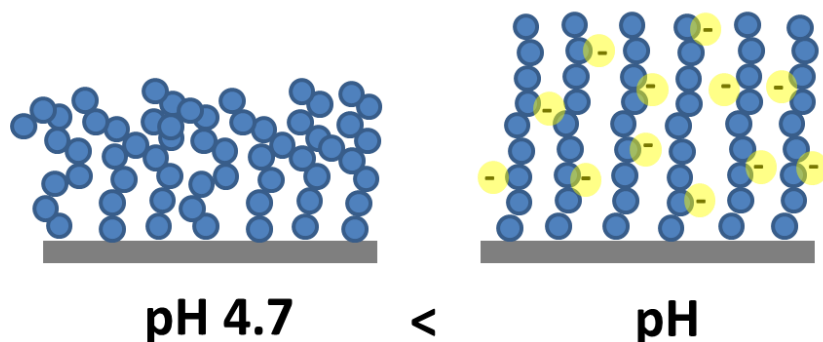


Figura 21. Escovas de PAA. Configurações variam dependendo do pH .

Na Figura 22A são mostradas as voltametrias cíclicas do eletrodo modificado com PAA/Au em uma faixa de pH de 3,00 a 6,00. Podemos observar que o pH ótimo, que fornece maior corrente, é o 3,00, e o pH em que o menor sinal de corrente foi observado foi pH 6,00. A Figura 22B mostra as espectroscopias de impedância eletroquímica para os mesmos valores de pH . Quanto maior o diâmetro semicírculo observado, maior a resistência para ocorrer a troca eletrônica. Assim, o pH ótimo observado foi pH 3,00 e a maior resistência foi obtida para o pH 6,00. Estas medidas confirmam os resultados obtidos por meio da voltametria cíclica.

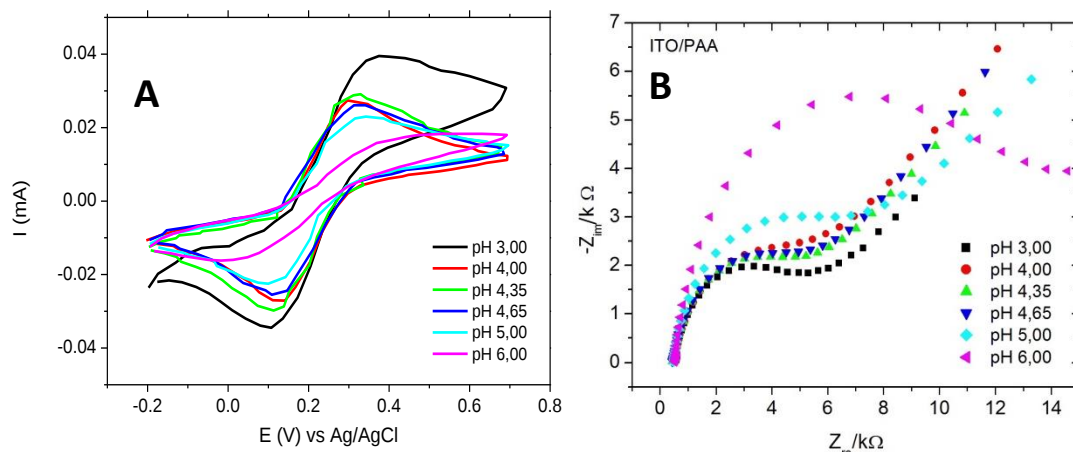


Figura 22. Eletrodo PAA/Au variando-se os valores de pH A) Voltametria cíclica do eletrodo PAA/Au, ferrocianeto de potássio $1,2 \text{ mol L}^{-1}$, tampão fosfato, velocidade de varredura 50 mV s^{-1} ; B) Espectroscopia de Impedância eletroquímica.

As Figura 23A e 23B ilustram o comportamento do eletrodo com a variação do pH. Na Figura 23A podemos observar que a diferença de potencial entre os picos anódicos e catódicos aumentam com o aumento do valor do pH, e a Figura 23B mostra que os valores de corrente diminuem com o aumento de pH. Com o aumento da distância entre os picos anódicos e catódicos, a reação deixa de ter caráter reversível, ou seja, a difusão não é mais o único fator limitante da velocidade da reação.

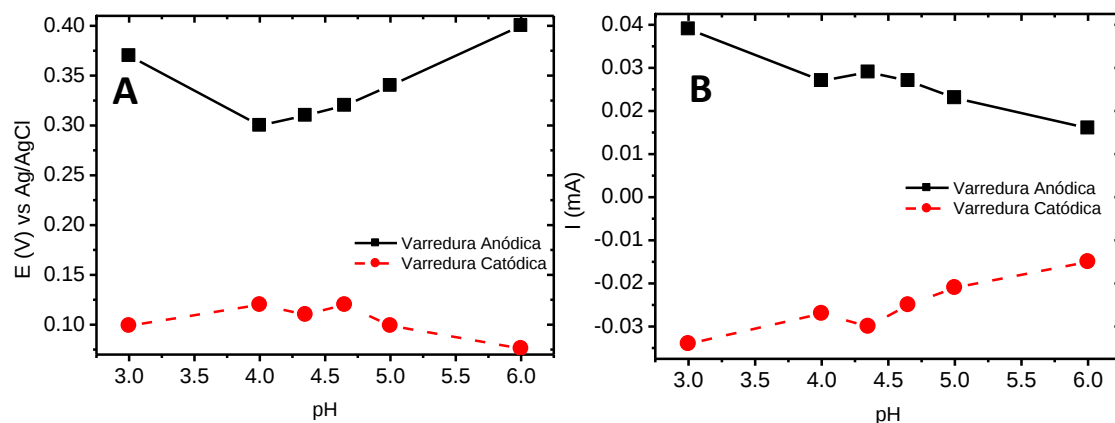


Figura 23. Eletrodo modificado PAA/Au A) Variação de potencial de pico vs pH; B) Variação de corrente de pico vs pH.

Nas Figura 24A e 24B pode-se ver como os valores de R_{ct} e R_s (referentes a resistência relativa à superfície e à solução respectivamente) variam com o pH. A Figura 24A é a que melhor ilustra o comportamento observado: quanto maior o valor do pH, maior a resistência oferecida pela superfície do eletrodo.

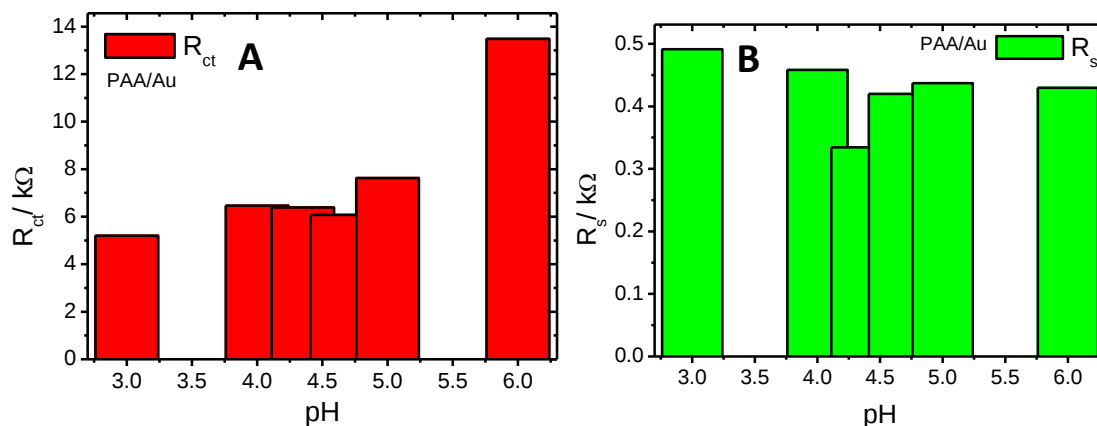


Figura 24. Eletrodo modificado PAA/Au. A) Variação resistência superficial, R_{ct} vs pH. B) Variação resistência solução, R_s vs pH.

Os resultados obtidos com os ensaios eletroquímicos revelaram um comportamento interessante do eletrodo ITO modificado com PAA/Au. Segundo a literatura (TAM et al., 2008), esperava-se que pelo fato das cadeias poliméricas estarem colapsadas em valores de $pH < 4,7$ o sinal, corrente, obtida nos ensaios eletroquímicos deveria ser pequeno, isto devido ao filme hidrofóbico formado na superfície que dificultaria a troca eletrônica entre o *probe* e a superfície do eletrodo. Porém, o que observamos nestes ensaios foi um aumento do sinal eletroquímico quando em valores de $pH < 4,7$. Este fato interessante pode ser explicado devido à presença das nanopartículas de ouro. Nos estudos revisados (TAM et al., 2010a), o eletrodo ITO não possuía nenhum metal recobrindo a superfície. Quando as cadeias se colapsam, o ouro fica mais próximo da superfície do eletrodo aumentando a condutividade do mesmo, facilitando a troca eletrônica entre a superfície e os íons em solução. O esquema da Figura 25 ilustra o comportamento observado.

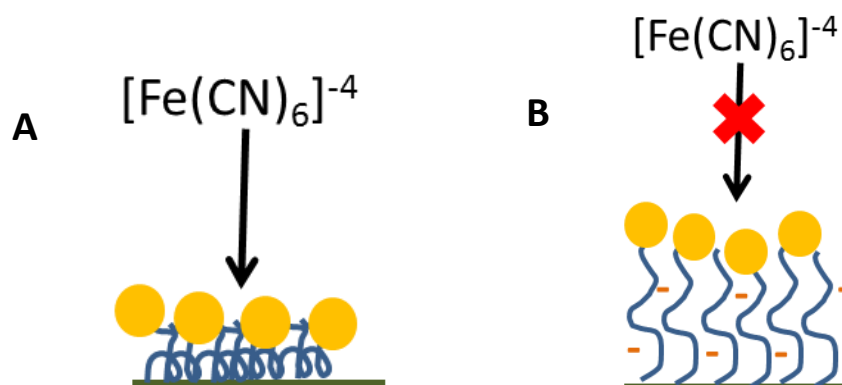


Figura 25. A) PAA/Au em pH<4,7, cadeias colapsadas deixam as nanopartículas mais próximas a superfície. B)PAA/Au em pH>4,7, cadeias estendidas, porém carregadas negativamente, impedem o íon $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ de chegar a superfície do ITO.

Outro fato não intuitivo também observado nas medidas eletroquímicas foi o comportamento do sistema quando as cadeias poliméricas de PAA encontram-se estendidas. Em pH>4,7 as cadeias de PAA estão estendidas e assim sendo, esperava-se um sinal eletroquímico com alto valor de corrente, porém, como já mencionado, o pH 6,00 foi o que forneceu o menor sinal, isto por que o *probe* utilizado neste estudo foi o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, como o íon em solução encontrava-se inicialmente carregado negativamente a troca eletrônica foi dificultada entre o íons e a superfície devido a repulsão eletrostática entre as cadeias negativas do PAA e o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Se um *probe* com cargas positivas fosse utilizado, poderíamos observar o comportamento esperado. Os resultados aqui obtidos estão de acordo com trabalhos publicados previamente (ANTONIO et al., 2013).

4.2.2.2 L-SPR

As mediadas de L-SPR foram realizadas para verificar se as nanopartículas estavam fixadas aos polímeros escova e para estudar o comportamento dos plasmon relacionados às partículas de ouro quando submetidos a variação de pH (ANTONIO et al., 2013).

Na Figura 26A, podemos observar os espectros de absorção medidos utilizando o eletrodo de ITO modificado com PAA/Au. Há um deslocamento dos valores de $\lambda_{\text{máx}}$ conforme se varia o pH, o que indica que as nanopartículas de ouro estavam aderidas a superfície do eletrodo, mais especificamente nas extremidades livres da escova de PAA. Podemos inferir isto pois, se as nanopartículas estivessem aderidas a superfície não seria

possível observar variação do $\lambda_{\text{máx}}$, uma vez que não haveria mobilidade entre as nanopartículas.

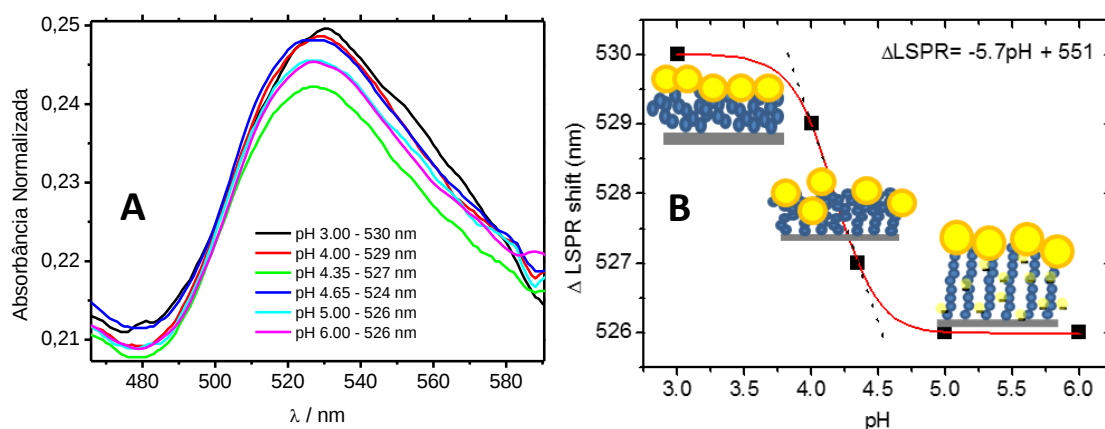


Figura 26. Eletrodo modificado com PAA/Au A) Espectros de L-SPR variando-se o pH de 3,00 a 6,00; B) Curva de titulação.

A variação nos valores $\lambda_{\text{máx}}$ ocorre, pois, com a variação do pH, a configuração das cadeias do PAA muda. Quando em $\text{pH} > 4,7$ as cadeias estão estendidas e as nanopartículas estão mais afastadas e em valores de $\text{pH} < 4,7$ as cadeias estão contraídas e as nanopartículas estão mais próximas. O efeito da força de repulsão eletrostática que impede que as partículas se agreguem também varia; como vimos, quanto menor a distância entre as nanopartículas, maior o comprimento de onda absorvido, assim, uma diminuição do pH faz com que as nanopartículas estejam mais próximas umas das outras, mudando o comprimento de onda absorvido, muda-se a frequência dos plasmon. Caso as partículas estivessem ligadas a superfície do ITO e não às cadeias poliméricas, esta mudança na distância entre as partículas não seria possível e o deslocamento não seria observado. Uma vez aderidas às cadeias poliméricas, o grau de liberdade das nanopartículas é maior, e a variação da distância entre elas é possível (ANTONIO et al., 2013).

A variação dos valores de pH também nos permitiu a construção da curva de titulação do eletrodo modificado (Figura 26B), o pK_a observado foi muito próximo do esperado $\sim 4,3$, o que indica que a presença das nanopartículas no sistema não alterou as propriedades de polímero escova. PAA e que o fenômeno das escovas se sobrepõe ao fenômeno das nanopartículas isoladamente em relação a variação de pH. Com a curva de calibração, foi possível observar a sensibilidade do sistema, ou seja, com a variação de uma unidade de pH, o corre o deslocamento de 5,7 nm. Comparando-se com trabalhos já

publicados, é uma excelente sensibilidade para um sensor plasmônico (ANKER et al., 2008; HOMOLA; YEE; GAUGLITZ, 1999; WILLETS; VAN DUYN, 2007b).

Os resultados dos estudos plasmônicos da variação de pH do eletrodo ITO modificado com PAA/Au concordam com os resultados obtidos utilizando métodos eletroquímicos, mostrando que a L-SPR de nanopartículas de ouro é uma ferramenta alternativa para o estudo conformacional de polímeros escova

4.2.3 Ensaios variando-se a Força Iônica

4.2.3.1 Eletroquímica

Os ensaios eletroquímicos da variação de força iônica, utilizando concentrações de cloreto de sódio, mostraram que além de ser sensível as mudanças de pH, o eletrodo de ITO modificado com PAA/Au também foi sensível as mudanças de força iônica, porém, não foi possível observar uma tendência clara nos resultados como para a variação de pH.

Os valores de força iônica foram calculados de acordo com a equação 2:

$$\mu = \frac{1}{2} (c_1 z_1^2 + c_2 z_2^2 + \dots + c_n z_n^2) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N c_i z_i^2 \quad \text{Equação 2}$$

onde, c é a concentração analítica e z a carga do íon presente. Como NaCl possui íons com cargas unitárias e é completamente dissociado, a força iônica possui o mesmo valor da concentração analítica.

Na Figura 27A é mostrada as voltametrias cíclicas variando-se a força iônica em um intervalo de 0,001 a 1,000 mol·L⁻¹ de NaCl. A força iônica ótima observada foi de 0,001 mol·L⁻¹ e o menor valor de corrente obtido foi com a força iônica de 1,000 mol·L⁻¹. Na Figura 27B podemos ver as análises de espectroscopia de impedância eletroquímica.

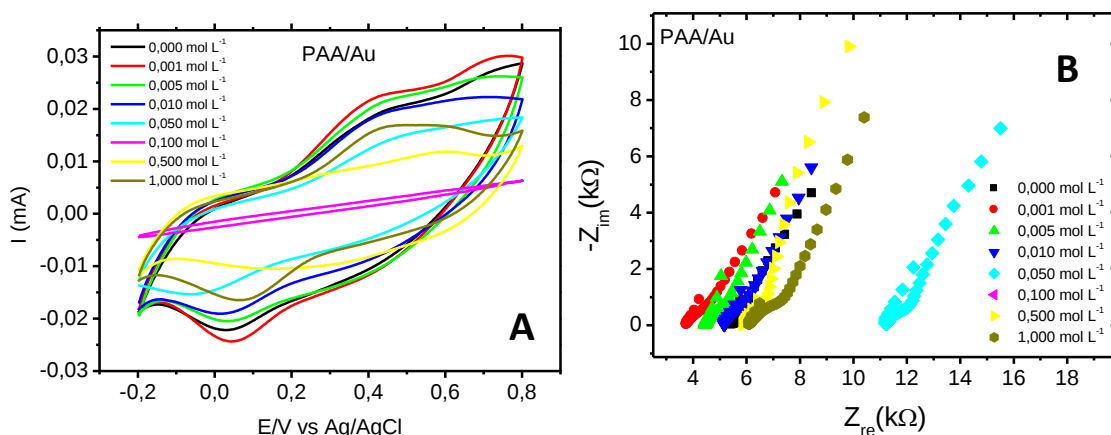


Figura 27. Eletrodo PAA/Au variando-se os valores de força iônica A) Voltametria cíclica, tampão fosfato, ferrocianeto $1,2 \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura 50 mV s^{-1} . B) Espectroscopia de Impedância eletroquímica.

Nas Figura 28A e 28B podemos observar o comportamento do eletrodo variando-se a força iônica. Nota-se um decaimento exponencial no sinal de corrente conforme se aumenta o valor da força iônica (Figura 28B). Já os valores de variação de potencial dos picos anódicos e catódicos aumentam até uma força iônica de $0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e depois ocorre um decaimento, assim, o sistema tende a deixar de ser reversível até força iônica de $0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Depois deste valor, tende a voltar a reversibilidade (Figura 28A).

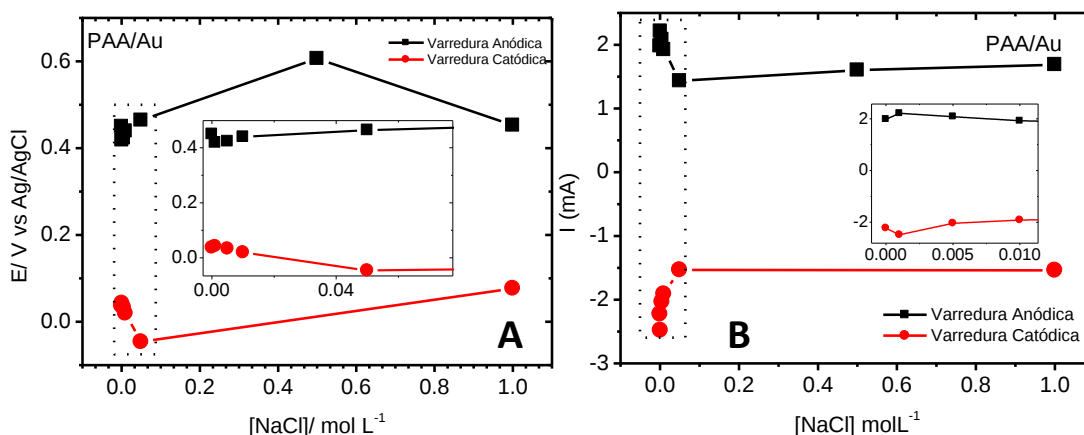


Figura 28. Eletrodo modificado PAA/Au A) Variação de potencial de pico vs $[\text{NaCl}]$ 50 mV s^{-1} ; B) Variação de corrente de pico vs $[\text{NaCl}]$, 50 mV s^{-1} . Os inserts em cada gráfico correspondem a uma ampliação da região selecionada no gráfico

As Figura 29A e 29B indicam grande variação do sinal R_{ct} até $0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de força iônica e depois tem-se uma saturação e o sinal deixa de variar. Os valores de resistência relativa à superfície diminuem, e os da resistência relativa à solução R_s (Figura 29B), aumentam conforme aumenta-se os valores de força iônica até atingir saturação.

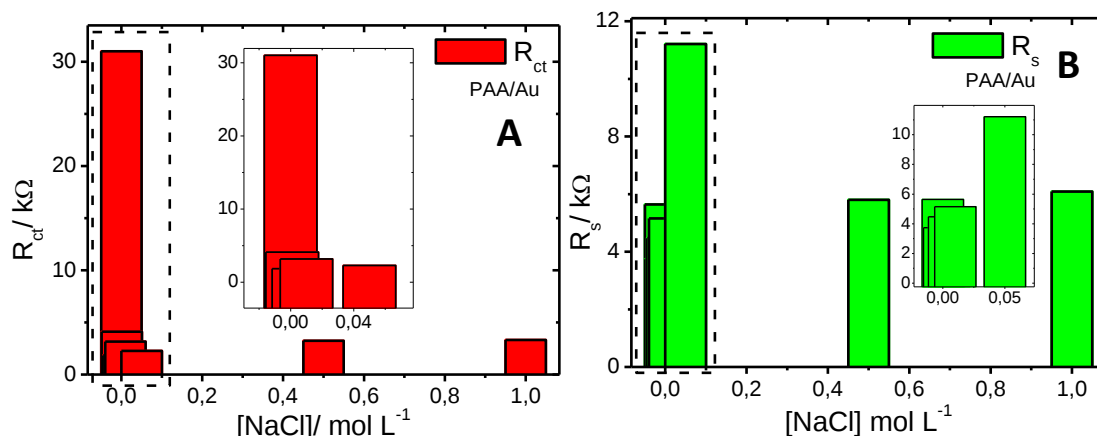


Figura 29. Eletrodo modificado PAA/Au. A) Variação resistência superficial, R_{ct} vs $[NaCl]$. B) Variação resistência solução, R_s vs $[NaCl]$. Os inserts em cada gráfico correspondem a uma ampliação da região selecionada no gráfico

Quando a concentração de íons na solução foi variada, fenômenos mais complexos ocorrem. Esta complexidade se reflete nas formas não definidas das voltametrias e no comportamento da transferência de carga do sistema. Apesar de complexos, os resultados estão de acordo com o entendimento teórico da resposta de um polieletrólito escova fraco frente à variação da concentração de sal (ZHULINA; BIRSHTEN; BORISOV, 1995).

Com estes resultados é possível distinguir dois tipos de regimes osmóticos para escovas de polieletrólitos fracos. O regime osmótico convencional está presente quando usamos pequena concentração de sal. Neste caso, a concentração de sal no *bulk* da solução e nas vizinhanças do eletrodo é menor em relação à concentração de contra íons dentro da escova. Quanto maior a quantidade de contra íons no interior do polímero, menor a intensidade das forças eletrostáticas de repulsão entre as cadeias. O polímero se torna quase neutro e a intensidade de sinal diminui. Além do fato do próprio *probe* ter sua eficiência reduzida devido à camada de solvatação de íons ao seu redor.

Entre o regime osmótico e o salino, temos o chamado regime osmótico não convencional, que é caracterizado quando relativamente alta concentração de sal está presente no sistema, neste caso, os íons carregados positivamente do sal atuam como íons hidrônios (H_3O^+), mudando o grau de ionização do polímero escova, diminuindo a carga líquida dos segmentos de cadeias, o que diminui o sinal eletroquímico, dificultando o transporte do $[Fe(CN)_6]^{4-}$ através do polímero, a mudança do regime convencional para o não convencional pode ser observado nas Figura 28A e 28B, acima do valor de força

iônica $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, a intensidade da corrente, assim como a diferença de potencial entre os picos anódicos e catódicos começam a aumentar.

O esquema da Figura 30 ilustra o fenômeno acima descrito.

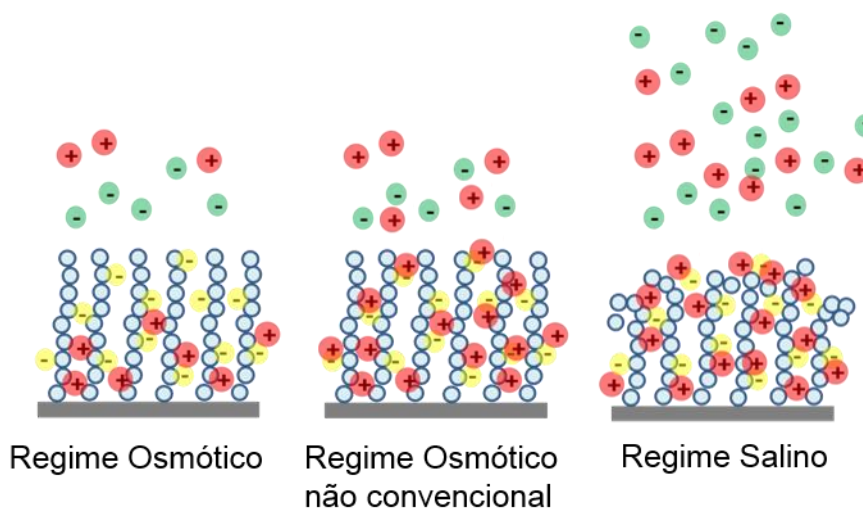


Figura 30. Transição entre regimes osmótico, osmótico não convencional e salino.

Quando um valor muito alto de força iônica é usado, o regime muda de osmótico para salino. No regime salino, os íons do sal dominam em comparação as cargas das cadeias poliméricas dentro da escova, assim, o polímero fica completamente neutralizado pelos contra íons e a intensidade do sinal diminui. As Figura 29A e 29B ilustram bem este tipo de regime, pois a intensidade do sinal torna-se constante, demonstrando que as escovas atingiram a saturação de íons e estão neutras. A saturação ocorre a uma força iônica de $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl.

4.2.3.2 L-SPR

Os espectros obtidos para o eletrodo modificado com PAA/Au variando-se a concentração de NaCl também demonstram que as nanopartículas de ouro estão fixadas na superfície do eletrodo por meio das cadeias poliméricas, pois há liberdade para as nanopartículas se aproximarem conforme a concentração de sal aumenta, causando deslocamento nos valores de $\lambda_{\text{máx}}$ (Figura 31A).

Diferentemente da variação do valor do pH, o comportamento observado para a variação dos valores de força iônica é um decaimento exponencial nos valores de deslocamento plasmônicos.

Na Figura 31B podemos observar um deslocamento para o vermelho nas primeiras concentrações de NaCl, posteriormente rápido decaimento com deslocamento para o azul, comprovando os dados obtidos pelas medidas eletroquímicas relacionados a mudança de regime, de osmótico convencional, para não convencional e finalmente salino.

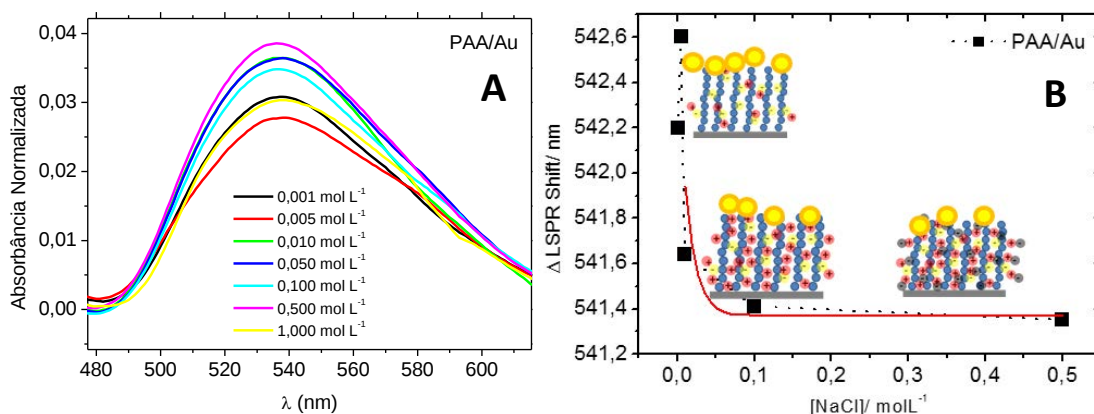


Figura 31. Eletrodo modificado com PAA/Au A) Espectros de L-SPR variando-se o valor da força iônica de 0,001 a 1,000 mol·L⁻¹; B) Curva de titulação.

4.3 Poli(2-vinil piridina) – P2VP

4.3.1 Caracterização

Micrografias de MEV foram feitas após a adsorção das nanopartículas de ouro (Figura 32A, 32B e 32C) na superfície do eletrodo ITO modificado com P2VP. Podemos notar certa heterogeneidade no filme formado. Estruturas relativamente maiores que as nanopartículas foram evidenciadas na análise por MEV, porém, estas estruturas não influenciaram nos resultados obtidos (os resultados obtidos nos ensaios eletroquímicos e plasmônico estão próximos ao esperado) e não acusaram composição diferente do esperado quando analisadas por EDX.

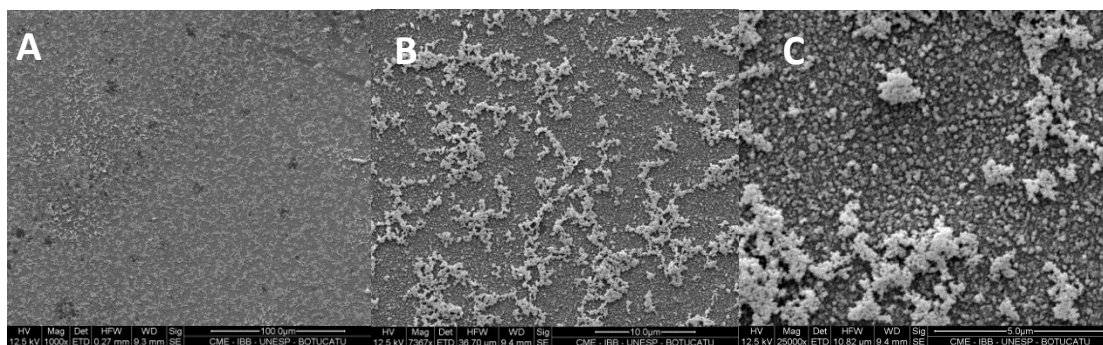


Figura 32. Micrografias obtidas por MEV do eletrodo ITO modificado com P2VP/Au. A) escala: 100 μm ; B) escala: 10 μm ; C) escala: 5 μm .

Na Figura 33 podemos observar a análise de EDX com os picos referentes ao ouro, índio, carbono, oxigênio e nitrogênio, sendo os três últimos derivados da composição do polímero P2VP. Todos os picos presentes na amostra eram esperados. Não foram encontrados átomos estranhos à composição do eletrodo.

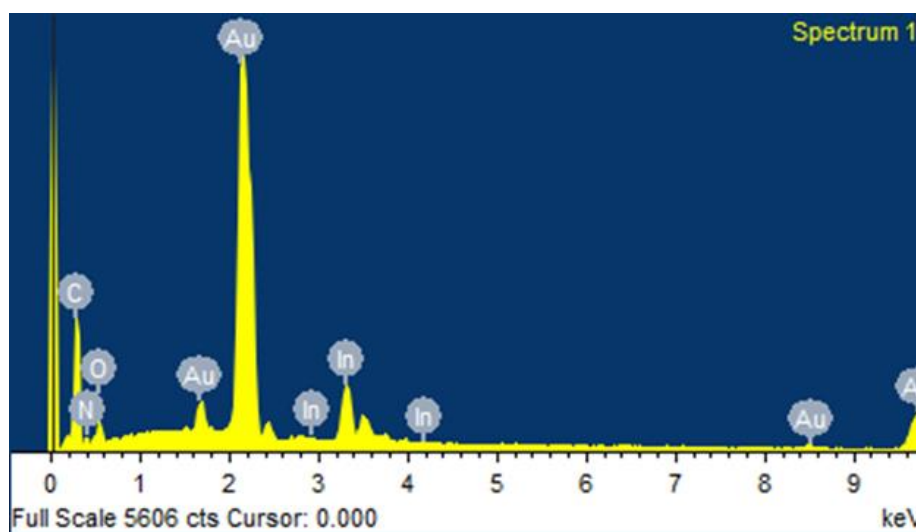


Figura 33. EDX do eletrodo ITO modificado com P2VP e nanopartículas de ouro.

A morfologia do eletrodo modificado foi analisada por meio de micrografias de microscopia de força atômica (AFM) (Figura 34A e 34B). Ao analisar as micrografias da Figura 34B, correspondente à modificação até a etapa de recobrimento com ouro, podemos notar as mesmas estruturas observadas por MEV, e a mesma heterogeneidade. Também foram observados domínios segregados (WILLIAMS, 1993) (rugosidade rms de 7,8 nm) no eletrodo modificado até a etapa de recobrimento com P2VP (Figura 34A). A rugosidade aumenta para rms 123,3 nm quando a superfície é recoberta com

nanopartículas de ouro. Este grande aumento pode estar relacionado às estruturas não identificadas previamente mencionadas. Podemos inferir que seja algum composto presente nas nanopartículas, como por exemplo, o citrato de sódio pode ter aglomerado e ficado aderido a superfície das mesmas, porém, novamente, a presença destas estruturas não afetaram os resultados obtidos nas análises pois os mesmos estão dentro do esperado (TAM et al., 2008).

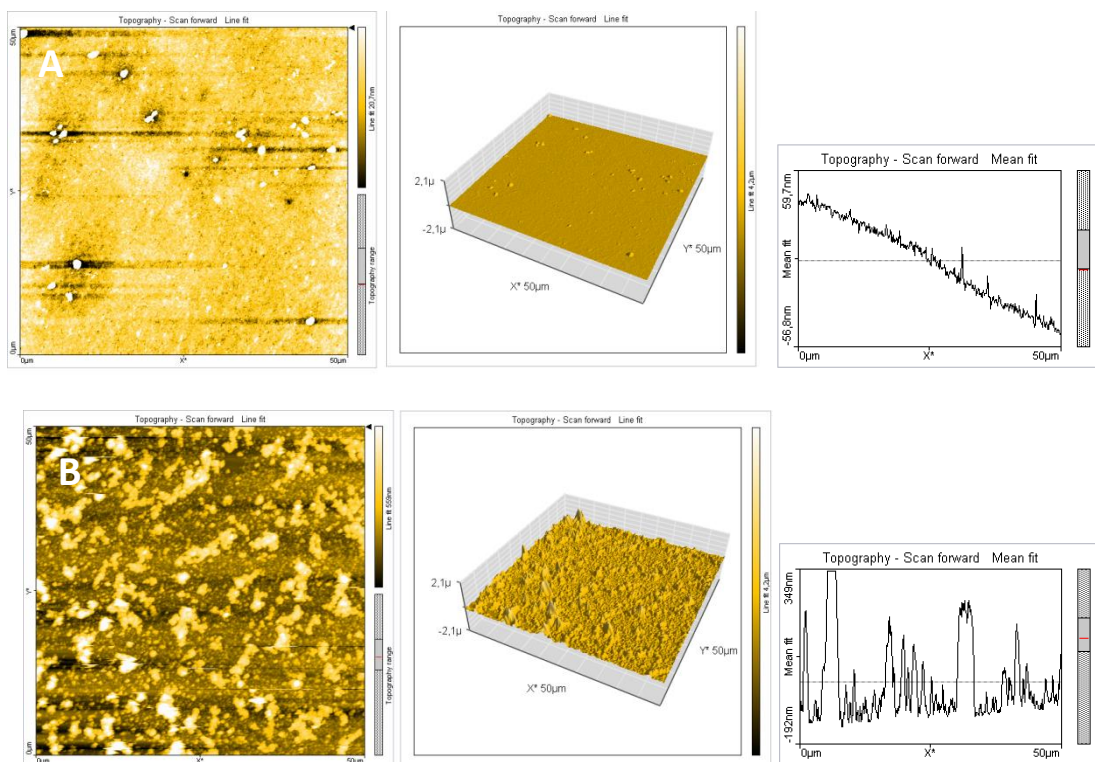


Figura 34. Micrografias de AFM e *cross-sections* do eletrodo modificado com P2VP. A) Eletrodo modificado até a etapa de P2VP, rugosidade rms de 7,8 nm. B) Eletrodo ITO modificado até a etapa das nanopartículas de ouro, rugosidade rms de 123,3 nm.

4.3.2 Ensaios variando-se o pH

4.3.2.1 Eletroquímica

O P2VP é uma polibase (anel piridínico) fraca com pK_a de 5,3 (TAM et al., 2008), assim, em $pH = 5,3$ suas cadeias poliméricas estão “neutras”, colapsam na superfície tornando-a hidrofóbica, em $pH < 5,3$ o nitrogênio encontra-se, em sua maioria, protonado e, portanto, carregado positivamente. Devido à repulsão eletrostática, as cadeias ficam estendidas. A configuração das cadeias é muito sensível a variação de pH.

Na Figura 35, podemos observar que quando protonadas, as cadeias de P2VP estão estendidas, longe da superfície, e quando neutras, as cadeias se colapsam, ficam mais

próximas à superfície do eletrodo. Estas mudanças conformacionais afetam as medidas eletroquímicas, para todos os pH estudado, uma configuração polimérica está presente, gerando sinais diferentes

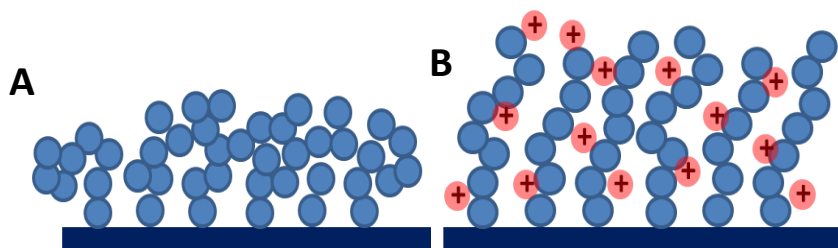


Figura 35. A) P2VP em pH = 5,3, cadeias colapsadas. B) P2VP em pH < 5,3, cadeias estendidas, carregadas positivamente.

Na Figura 36A são mostradas as voltametrias cíclicas do eletrodo modificado com P2VP/Au em uma faixa de pH de 4,00 a 7,40. Podemos observar que o pH ótimo, que fornece maior corrente, é o 4,00, e o pH em que o menor sinal de corrente foi observado foi pH 7,40. A Figura 36B mostra as espectroscopias de impedância eletroquímica para os mesmos valores de pH. O pH ótimo observado foi o pH 4,00 e o maior valor de resistência foi obtido para o pH 7,40. Estas medidas confirmam os resultados obtidos por meio da voltametria cíclica.

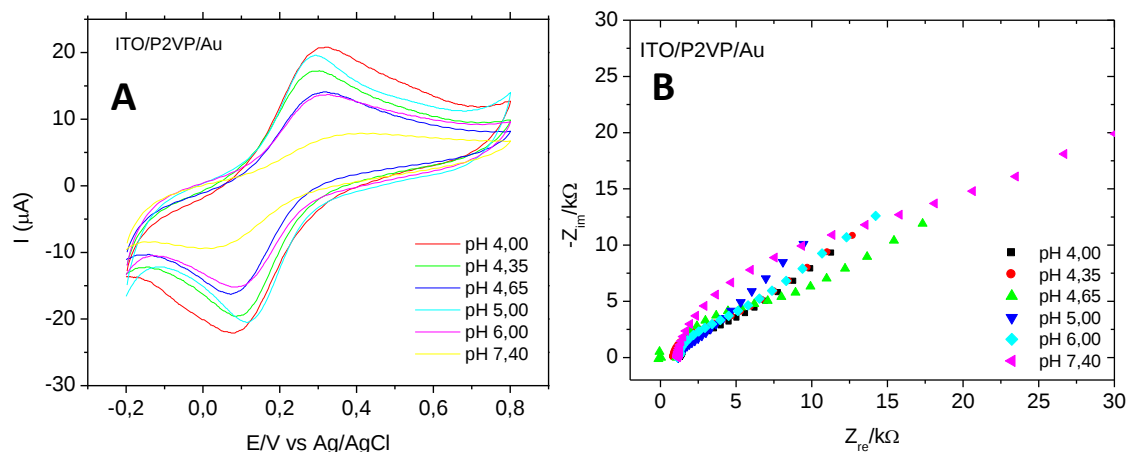


Figura 36. Eletrodo P2VP/Au variando-se os valores de pH A) Voltametria cíclica do eletrodo P2VP/Au, tampão fosfato, ferrocianeto 1,2 mol L⁻¹, velocidade de varredura 50 mV s⁻¹; B) Espectroscopia de Impedância eletroquímica.

As Figura 37A e 37B ilustram o comportamento do eletrodo com a variação do pH, na Figura 37A podemos observar que as diferenças de potenciais entre os picos anódicos e catódicos aumentam com o aumento do valor do pH, e na Figura 37B os

valores de corrente diminuem com o aumento de pH. Assim, como citado anteriormente a reação vai perdendo gradativamente o caráter reversível.

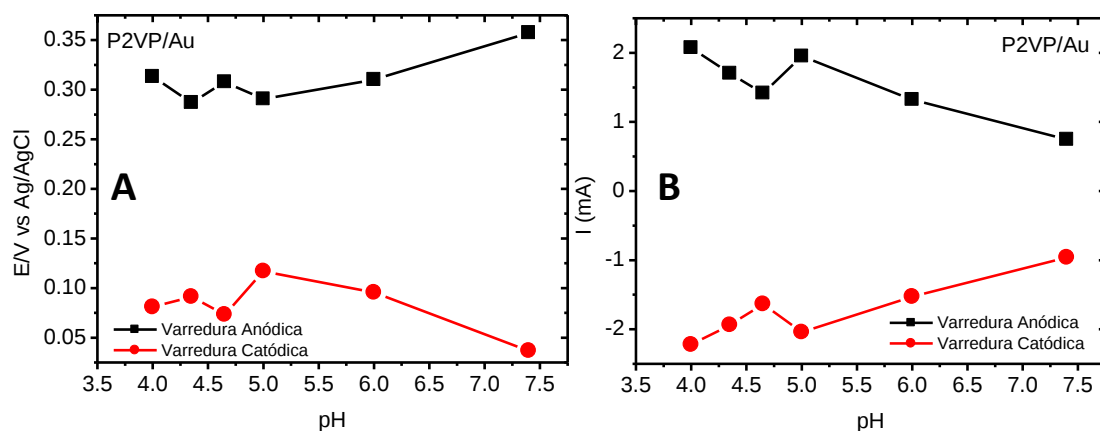


Figura 37. Eletrodo modificado P2VP/Au A) Variação de potencial de pico vs pH; B) Variação de corrente de pico vs pH.

Na Figura 38A e 38B podemos ver como os valores de R_{ct} e R_s variam com o pH. Quanto maior o valor do pH, maior a resistência oferecida pela superfície do eletrodo.

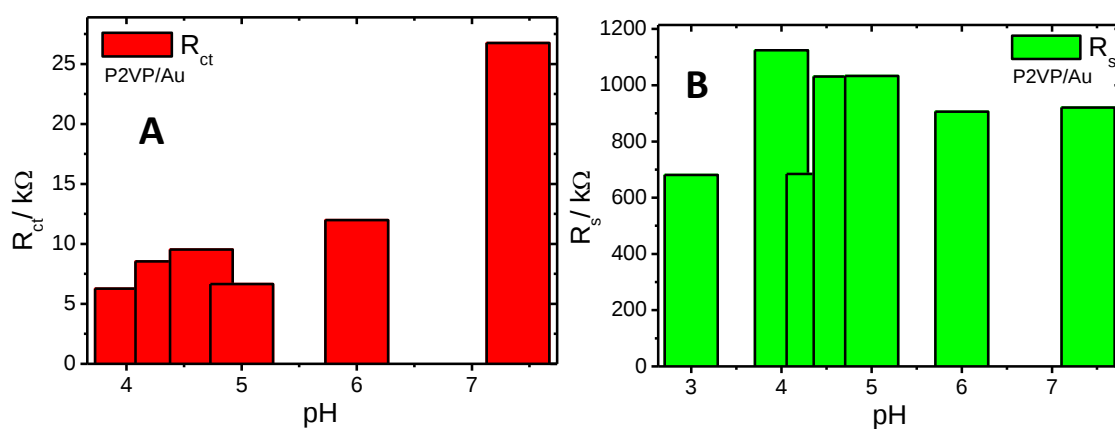


Figura 38. Eletrodo modificado P2VP/Au. A) Variação resistência superficial, R_{ct} vs pH. B) Variação resistência solução, R_s vs pH.

Pelo fato das cadeias poliméricas estarem colapsadas em valores de $pH > 5,3$ o sinal, corrente, obtida nos ensaios eletroquímicos é pequeno, isto devido ao filme hidrofóbico formado na superfície que dificulta a troca eletrônica entre o probe e a superfície do eletrodo. Já em valores de $pH < 5,3$ as cadeias poliméricas encontram-se positivamente carregadas, facilitando o contato entre o probe negativo e a superfície do eletrodo, gerando um sinal intenso de corrente.

Neste caso, mesmo as nanopartículas de ouro estando presentes, quando colapsado, o sinal ainda é menor do que aquele com as cadeias estendidas, isto devido ao fato do P2VP ser uma polibase e se carregar positivamente quando em pH apropriado, facilitando a transferência de carga. O ouro aumenta o sinal obtido quando comparamos com sistemas sem superfície recoberta por metais condutores, porém, não o suficiente para que este valor se sobressaia ao valor de corrente obtido com as cadeias poliméricas estendidas.

O esquema da Figura 39 ilustra o comportamento observado no eletrodo de ITO modificado com P2VP/Au em relação ao *probe*.

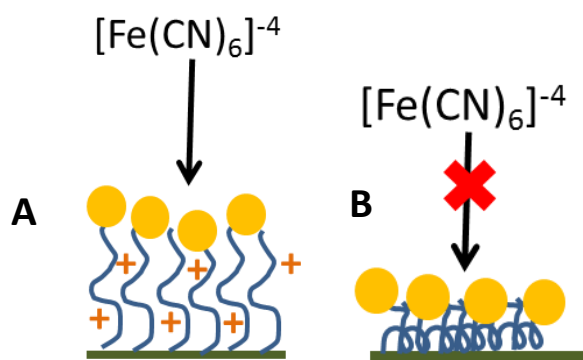


Figura 39. A) P2VP/Au em pH<5,3, cadeias estendidas, carregadas positivamente favorecem que o íon $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ chegue a superfície do eletrodo. B) P2VP/Au em pH<5,3 cadeias colapsadas impedem o íon $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ de chegar a superfície do ITO.

4.3.2.2 L-SPR

As mediadas de L-SPR foram realizadas para verificar se as nanopartículas estavam realmente fixadas às cadeias poliméricas, e para estudar o comportamento dos plasmon relacionados as partículas de ouro quando submetidos a variação de pH (ANTONIO et al., 2013).

Na Figura 40A, podemos observar os espectros de absorção medidos através do eletrodo de ITO modificado com P2VP/Au. Há um deslocamento dos valores de $\lambda_{\text{máx}}$ conforme se varia o pH, o que indica que as nanopartículas de ouro estavam aderidas ao longo das cadeias da escova de P2VP. Podemos inferir este fato considerando-se o mesmo aspecto previamente citado na discussão do tópico 4.2.2.2.

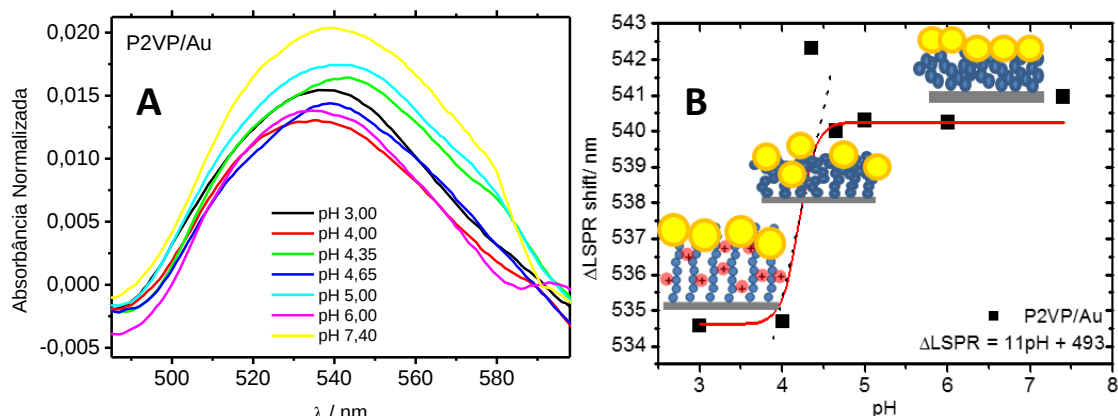


Figura 40. Eletrodo modificado com P2VP/Au A) Espectros de L-SPR variando-se o pH de 3,00 a 7,40, tampão fosfato; B) Curva de titulação.

A variação dos valores de pH também nos permitiu a construção da curva de titulação do eletrodo modificado (Figura 40B), o pK_a observado foi de $\sim 4,2$, relativamente próximo ao esperado de 5,3. Com a curva de calibração, foi possível observar que com a variação de uma unidade de pH, ocorre o deslocamento de 11 nm, excelente resultado para um sensor plasmônico (ANKER et al., 2008; HOMOLA; YEE; GAUGLITZ, 1999; WILLETS; VAN DUYNE, 2007b). É interessante notar que pelo fato do polímero em estudo ser uma polibase, a curva de titulação é inversa a da obtida para o PAA, que é um poliácido, podendo, portanto, ser utilizada para caracterizar, diferenciar polímeros escovas ácidos e básicos.

4.3.3 Ensaios variando-se a Força Iônica

4.3.3.1 Eletroquímica

Os ensaios eletroquímicos da variação de força iônica, utilizando concentrações de cloreto de sódio, mostraram que além de ser sensível as mudanças de pH, o eletrodo de ITO modificado com P2VP/Au também é sensível as mudanças de força iônica.

Na Figura 41A são mostradas as voltametrias cíclicas variando-se a força iônica em um intervalo de 0,001 a 1,000 mol·L⁻¹ de NaCl. A força iônica ótima observada foi de 0,001 mol·L⁻¹, e o menor valor de corrente obtido foi com a força iônica a partir de 0,010 mol·L⁻¹.

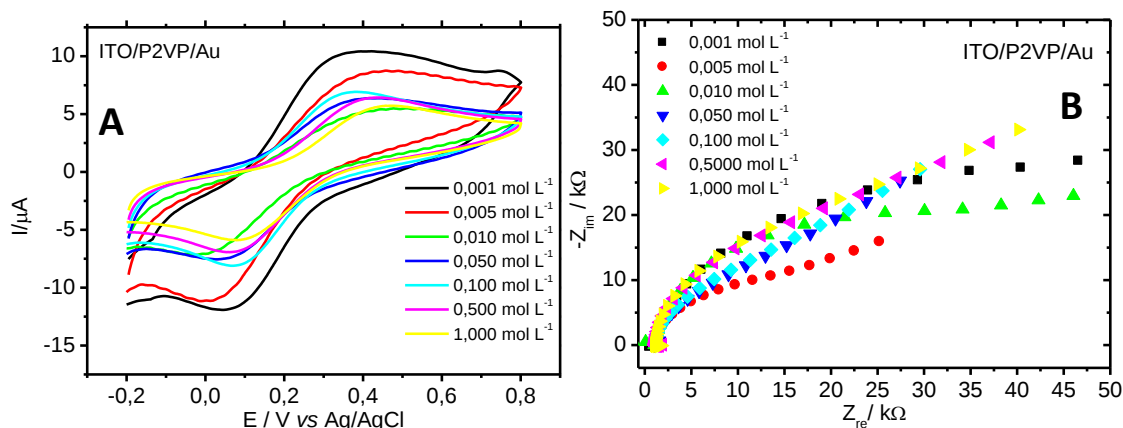


Figura 41. Eletrodo P2VP/Au variando-se os valores de força iônica A) Voltametria cíclica do eletrodo P2VP/Au, tampão fosfato, ferrocianeto de potássio $1,2 \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura 50 mV s^{-1} ; B) Espectroscopia de Impedância eletroquímica.

Nas Figura 42A e 42B podemos observar o comportamento eletroquímico do eletrodo variando-se a força iônica. Nota-se um aumento do valor de separação em potencial entre os picos anódicos e catódicos até força iônica de $0,010 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Em seguida há um decaimento exponencial e posterior estagnação a partir de força iônica de $0,100 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Analisando a Figura 42B, observa-se um decaimento abrupto na corrente medida até força iônica de $0,010 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, este comportamento é devido ao fato das poucas cargas presentes no P2VP em pH 7,4 se neutralizarem por completo, fazendo com que a espessura do filme diminuísse, atenuando o sinal medido devido á dificuldade da espécie redox em se difundir através do polímero. A partir deste valor, é possível notar um crescimento exponencial devido a pressão osmótica exercida pelos íons no interior das escovas e em seguida, a partir da força iônica de $0,100 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ estagnação dos valores medidos devido a saturação do filme com contra íons do sal.

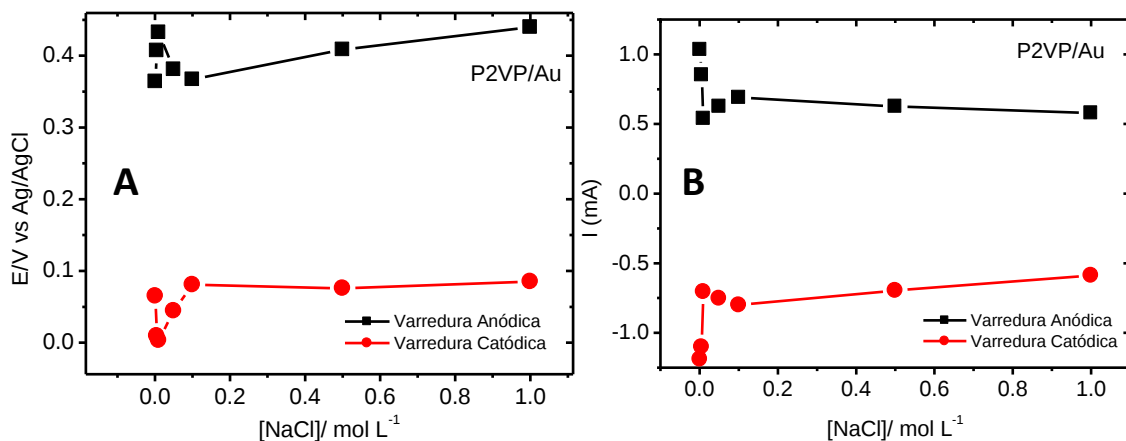


Figura 42. Eletrodo modificado P2VP/Au A) Variação de potencial de pico vs $[\text{NaCl}]$ 50 mV s^{-1} ; B) Variação de corrente de pico vs $[\text{NaCl}]$, 50 mV s^{-1} .

As Figura 43A e 43B, indicam grande variação do sinal R_{ct} até $0,100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de força iônica e depois tem-se uma saturação, o sinal deixa de variar, os valores de resistência relativas a superfície diminuem, e os da resistência relativas à solução R_s (Figura 43B), aumentam conforme aumenta-se os valores de força iônica até atingir saturação.

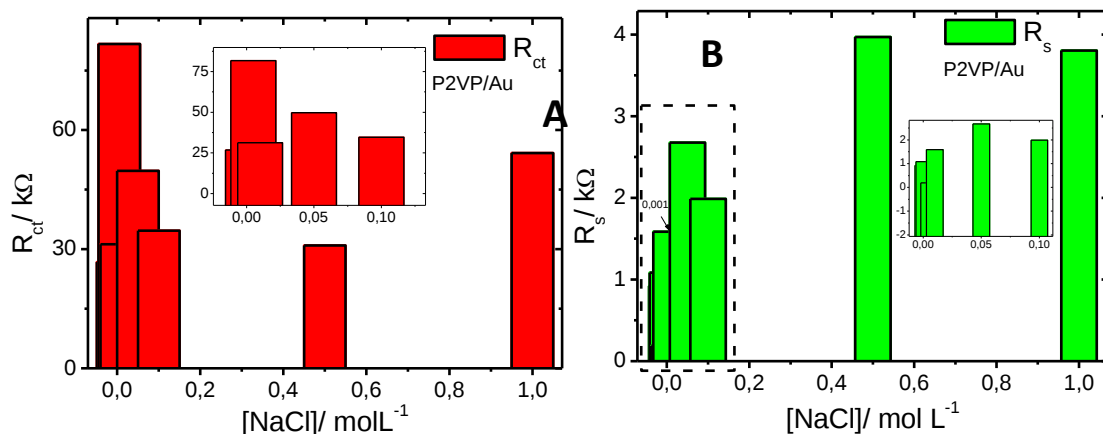


Figura 43. Eletrodo modificado P2VP/Au. A) Variação resistência superficial, R_{ct} vs $[\text{NaCl}]$. B) Variação resistência solução, R_s vs $[\text{NaCl}]$. Os inserts em cada gráfico correspondem a uma ampliação da região selecionada no gráfico.

Para o eletrodo de ITO modificado com P2VP/Au também ocorre as mudanças de regime como citado nas seções 4.2.3. Entre $0,001 - 0,010 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, as escovas encontram-se no regime osmótico; a partir de $0,010 - 0,100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ no regime osmótico não convencional, e de $0,100 - 1,000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ no regime salino. A transição entre um regime e outro no caso das escovas de P2VP é mais evidente considerando-se os resultados das análises eletroquímicas, quando comparado com as escovas de PAA.

O esquema da Figura 44 ilustra as transições de regime osmótico para osmótico não convencional e finalmente salino.

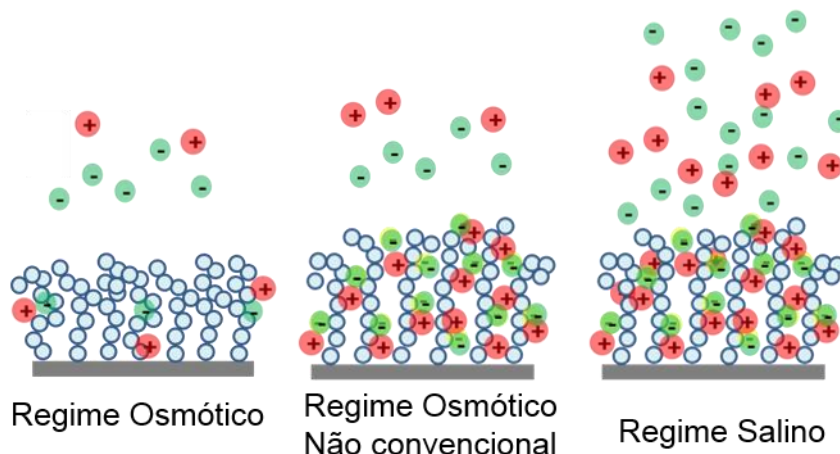


Figura 44. Transição entre regimes osmótico, osmótico não convencional e salino

4.3.3.2 L-SPR

Os espectros obtidos para o eletrodo modificado com P2VP/Au variando-se a concentração de NaCl também demonstram que as nanopartículas de ouro estão fixadas no eletrodo pelas terminações das cadeias poliméricas, pois há liberdade para as nanopartículas se aproximarem conforme a concentração de sal aumenta, causando deslocamento nos valores de $\lambda_{\text{máx}}$ (Figura 45A).

Diferentemente da tendência observada para o PAA (decaimento exponencial) o comportamento observado para a variação dos valores de força iônica do P2VP/Au é um crescimento exponencial dos valores de deslocamento plasmônicos.

Na Figura 45B podemos observar um deslocamento para o vermelho até força iônica de $0,010 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, de $0,010$ a $0,100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ um deslocamento para o azul, e de $0,100$ a $1,000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ estagnação, o que comprova os dados obtidos pelas medidas eletroquímicas relacionados à mudança de regime, de osmótico convencional, para não convencional e finalmente salino (ZHULINA; BIRSHTEN; BORISOV, 1995).

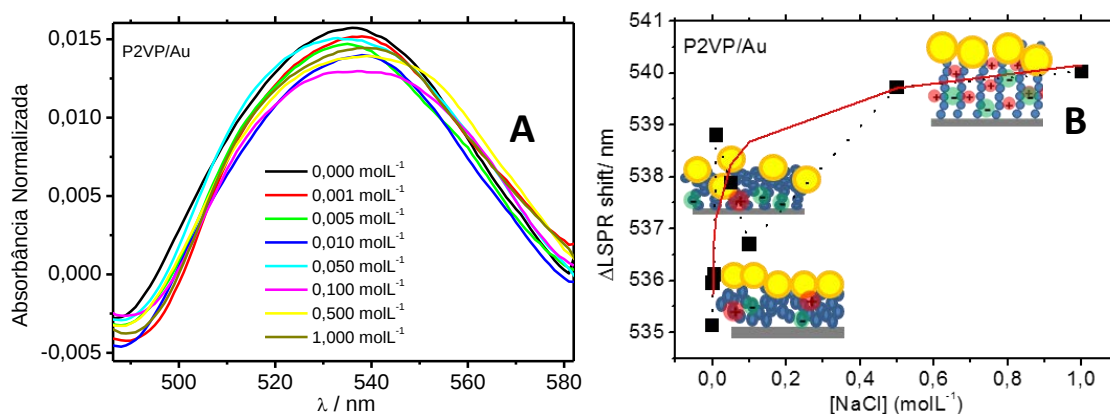


Figura 45. Eletrodo modificado com P2VP/Au A) Espectros de L-SPR variando-se o valor de força iônica de 0,001 a 1,000 mol·L⁻¹; B) Curva de titulação.

4.3.4 Aplicação Proposta

Uma das aplicações proposta para o eletrodo modificado com P2VP/Au é sua utilização como plataforma para biosensores (CRULHAS et al., 2014). No estudo realizado, a enzima glicose oxidase foi utilizada como modelo para a construção de um sensor de glicose.

O método de construção do biosensor foi o mesmo previamente descrito nas seções 3.2 e 3.3, sendo que, após modificação com nanopartículas de ouro, o eletrodo foi modificado com EDC-NHS para posterior imobilização da enzima glicose oxidase. Para isso, o eletrodo foi deixado submerso em uma solução 10 mmol·L⁻¹ de ácido 11-mercaptopundecanóico (MUA), em etanol, *overnight*. Em seguida o eletrodo foi imerso em uma solução de tampão fosfato (10 mmol·L⁻¹ pH 5,5) contendo 0,4 mol·L⁻¹ de EDC e 0,1 mol·L⁻¹ de NHS por duas horas sobre agitação e logo após o eletrodo foi transferido para uma solução de glicose oxidase (10 mg·mL⁻¹ em tampão fosfato 10 mmol·L⁻¹ pH 5,5) e deixado sobre agitação *overnight*. A Figura 46 ilustra o processo de modificação simplificada.

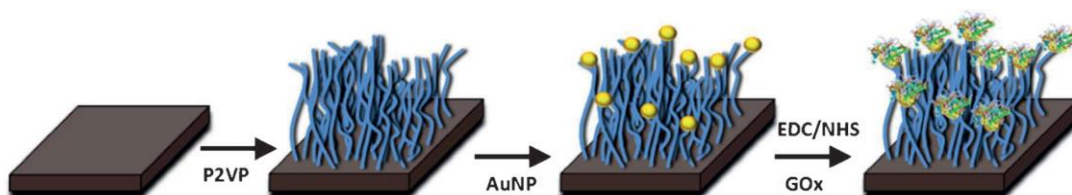


Figura 46. Etapas para a fabricação do biosensor

Cronoamperometria foi utilizada para determinação da sensibilidade do sensor em pH ácido e básico, nas quais as cadeias de P2VP estão no estado “ON” e “OFF” respectivamente. Para isso $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose foram sucessivamente adicionados a uma solução de tampão fosfato $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ contendo $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de FMCA (ácido ferroceno mocarboxílico). Em todos os experimentos o eletrodo foi polarizado utilizando-se $+0,26 \text{ V}$.

A enzima glicose oxidase encontra-se inicialmente em sua forma oxidada; quando em contato com seu substrato (glicose), ela rapidamente o converte em ácido glucônico indo para sua forma reduzida. Uma vez que o eletrodo está polarizado a $+0,26 \text{ V}$, FMCA presente na solução se oxida transferindo elétrons para a enzima, que se regenera para sua forma oxidada (Figura 47), este processo de troca de elétrons é diretamente proporcional a quantidade de glicose adicionada, assim, o sinal eletroquímico medido pode ser correlacionado a concentração de glicose no meio.

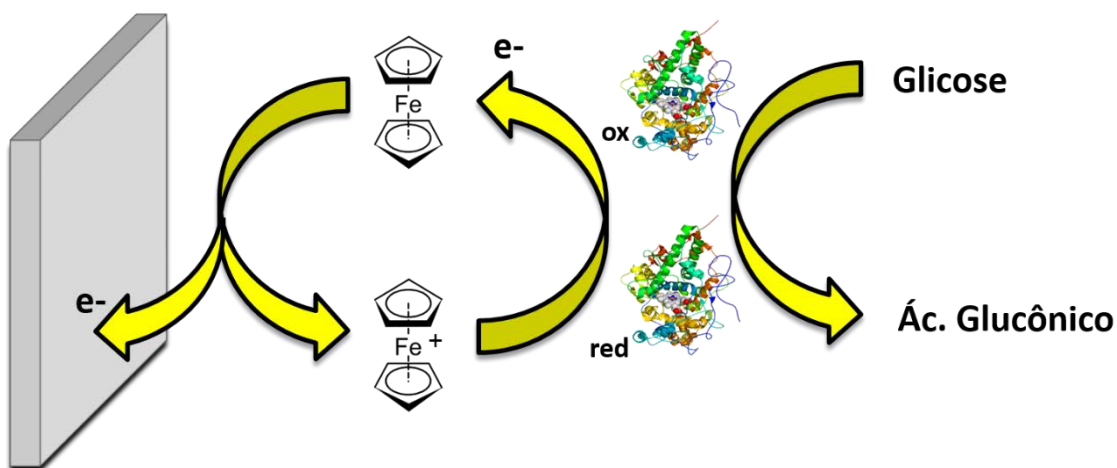


Figura 47. Ilustração esquemática do mecanismo de detecção para o biossensor de glicose.

Como discutido anteriormente, em valores de pH ácido o polímero escova P2VP está protonado e portando em estado “ON”, nestas condições, o biossensor proposto apresentou maior sensibilidade que em pH 7,0 (Figura 48, *insert*).

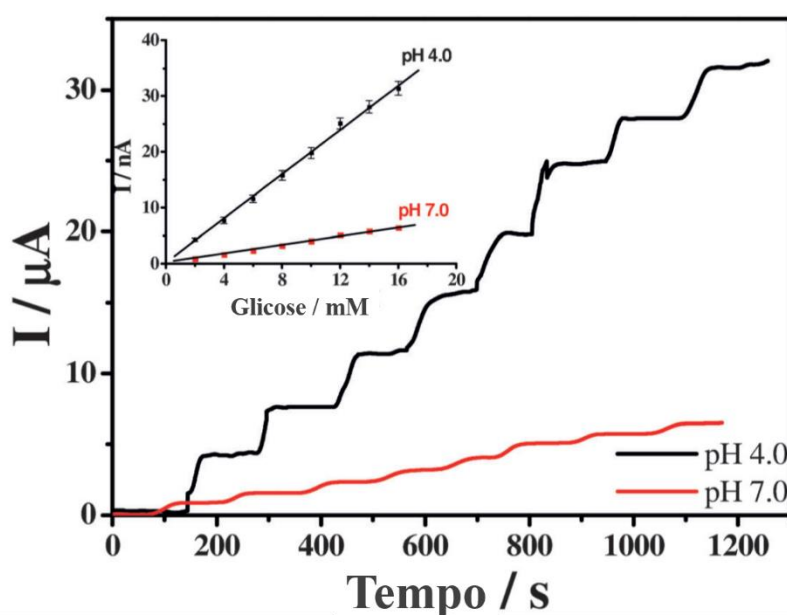


Figura 48. Resposta amperométrica para o biosensor P2VP/Au/Gox a sucessivas adições de glicose em tampão fosfato pH 4,0 e 7,0 a um potencial de +0,26V vs Ag|AgCl. *Insert:* Curva de calibração da resposta amperométrica vs concentração de glicose sensibilidade $1,51 \mu\text{A mM}^{-1}$ e R^2 de 0,998 para pH 4. (Faixa de concentração de 2 a $18 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Em pH 4,0, as escovas de P2VP estão longe da superfície do eletrodo e a reação redox da glicose oxidase ocorre mais facilmente, já em pH 7,0 as escovas de P2VP estão colapsadas sobre a superfície do eletrodo, fazendo com que a corrente medida durante a reação redox da enzima seja menor.

Embora em pH 7,0 o biosensor tenha apresentado menor sensibilidade, sua utilização em amostras reais não fica limitada, os estudos feitos em amostras de sêrum humanos utilizando-se este mesmo sensor mostrou resultados bastantes satisfatórios (CRULHAS et al., 2014).

É importante notar que o sinal de densidade de corrente obtido em pH 4 e pH 7 são devidos a ação ON/OFF das escovas de P2VP, e não a atividade enzimática, que é melhor em pH 7 do que em pH 4.

4.4 Poli(2-dimetil amino etil metacrilato) – PDMAEMA

4.4.1 Caracterização

Micrografias de MEV foram feitas após a adsorção das nanopartículas de ouro (Figura 49A, 46B) na superfície do eletrodo ITO modificado com PDMAEMA. Na Figura 49A é possível observar a homogeneidade do filme formado e na Figura 49B, uma seção de corte em ângulo feito com uma tesoura. Como não houve monitoramento do corte, não foi possível saber a espessura do filme. Na Figura 49B, podemos ver o interior do filme, e os domínios segregados de polímeros ficam evidenciados na micrografia. A superfície lisa observada na parte inferior ao filme corresponde ao plástico ITO, assim o aumento da rugosidade obtida com a modificação fica evidente. Também é possível verificar que as nanopartículas ficam concentradas na superfície dos polímeros e não no interior dos mesmos.

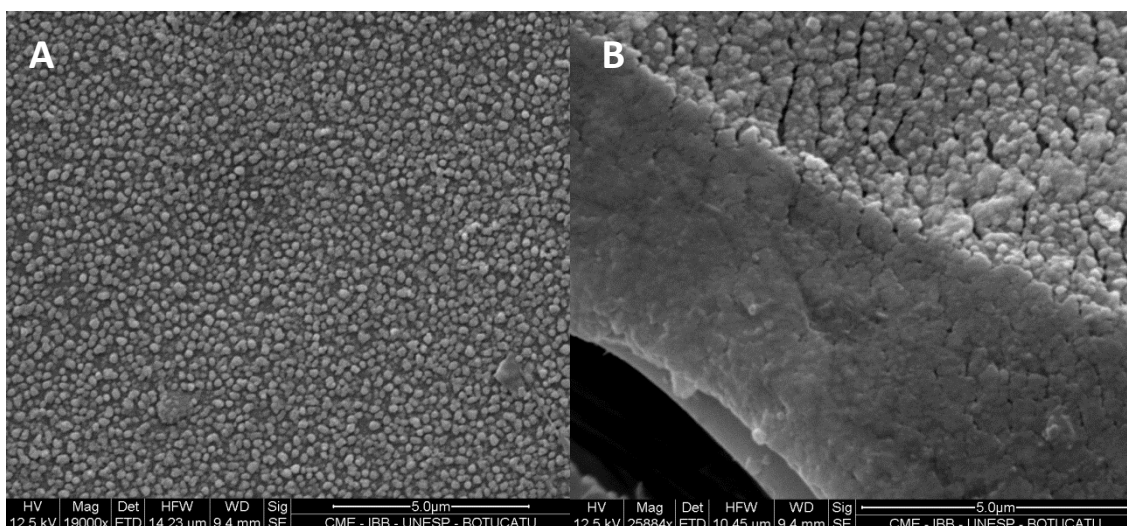


Figura 49. Micrografias obtidas para o eletrodo de ITO modificado com PDMAEMA/Au. A) escala: 5,0 µm; B) Corte em ângulo, escala: 5,0 µm.

Na Figura 50 podemos observar a análise de EDX com os picos referentes ao ouro, índio, carbono, oxigênio e nitrogênio, sendo os três últimos derivados da composição do polímero PDMAEMA. Não foram encontrados átomos estranhos à composição do eletrodo.

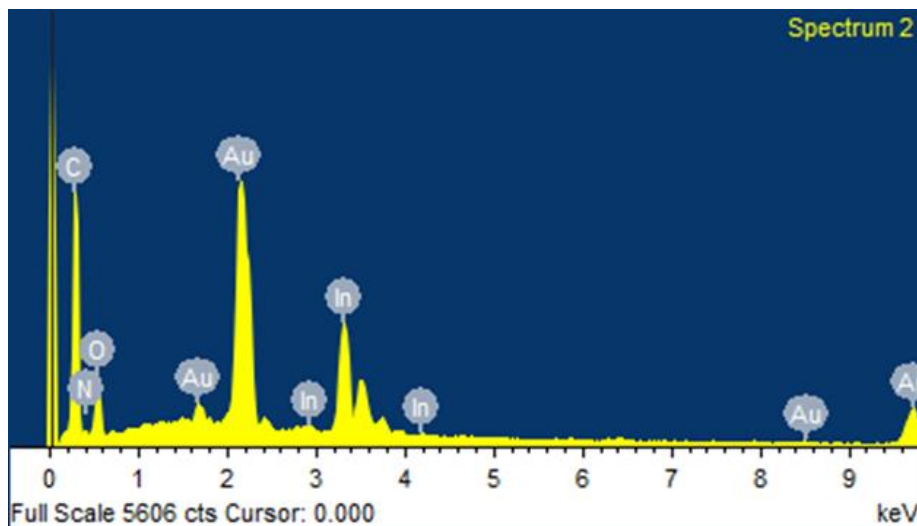


Figura 50. EDX do eletrodo ITO modificado com PDMAEMA e nanopartículas de ouro.

A morfologia do eletrodo modificado foi analisada por meio de micrografias de AFM (Figura 51A e 51B). Foram observados domínios segregados (WILLIAMS, 1993) (rugosidade rms de 6,2 nm) no eletrodo modificado até a etapa de recobrimento com PDMAEMA (Figura 51A). A rugosidade aumenta para rms 119,7 nm quando a superfície é recoberta com nanopartículas de ouro.

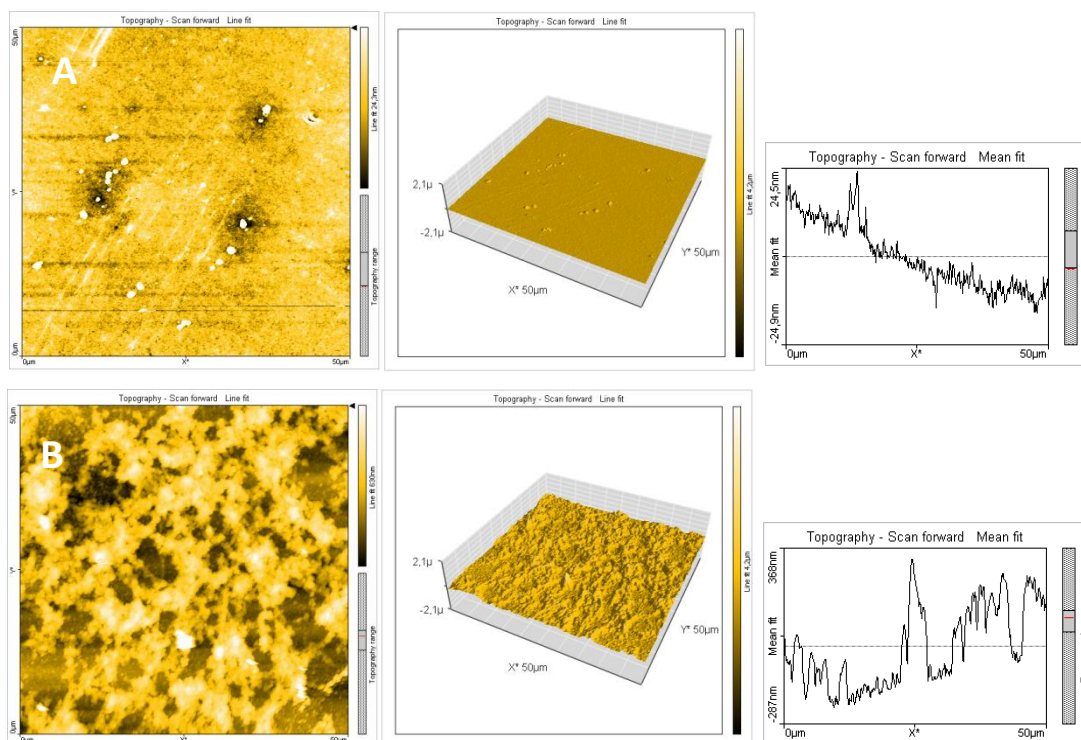


Figura 51. Micrografias de AFM e cross-sections do eletrodo modificado com PDMAEMA. A) Eletrodo modificado até a etapa de PDMAEMA, rugosidade rms de 6,2 nm. B) Eletrodo ITO modificado até a etapa das nanopartículas de ouro, rugosidade rms de 119,7 nm.

4.4.2 Ensaios variando-se o pH

4.4.2.1 Eletroquímica

O PDMAEMA é uma polibase (grupo amina) fraca com pK_a de 7,5 (VAN DE WETERING et al., 1998), sendo assim, seu comportamento é muito similar ao do P2VP. Em $pH = 7,5$ suas cadeias poliméricas estão “neutras”, colapsam na superfície tornando-a hidrofóbica, em $pH < 7,5$ o nitrogênio encontra-se, quase completamente, protonado e, portanto, carregado positivamente; devido a repulsão eletrostática, as cadeias ficam estendidas.

Na Figura 52A são mostradas as voltametrias cíclicas do eletrodo modificado com PDMAEMA/Au em uma faixa de pH de 4,00 a 7,40. Podemos observar que o pH ótimo, que fornece maior corrente, é o 4,00, e o pH em que o menor sinal de corrente foi observado foi pH 7,40, a diferença entre o melhor e o pior sinal é muito mais pronunciada do que no caso das análises referentes ao P2VP. A Figura 52B mostra as espectroscopias de impedância eletroquímica para os mesmos valores de pH. O pH ótimo observado foi o pH 4,00 e o maior valor de resistência foi obtido para o pH 7,40, estas medidas confirmam os resultados obtidos por meio da voltametria cíclica.

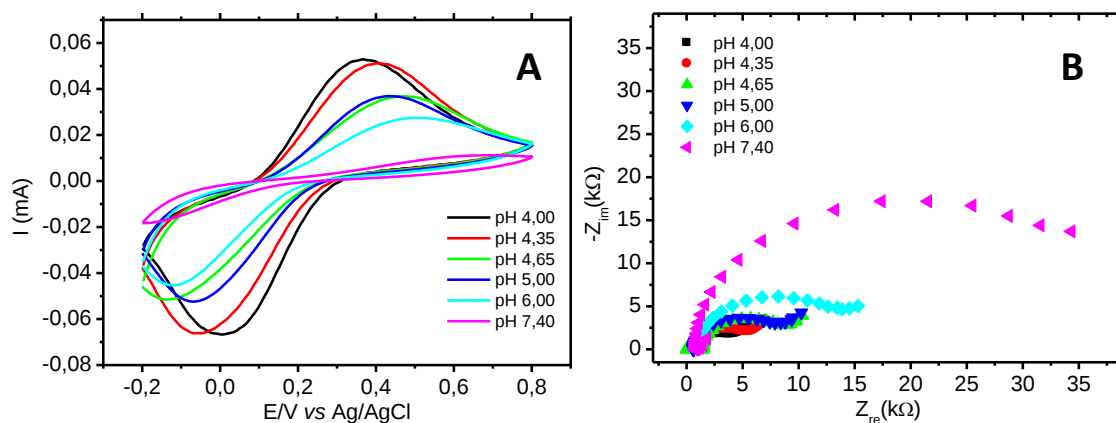


Figura 52. Eletrodo PDMAEMA/Au variando-se os valores de pH A) Voltametria cíclica, tampão fosfato, ferrocianeto $1,2 \text{ molL}^{-1}$, velocidade de varredura 50 mV s^{-1} ; B) Espectroscopia de Impedância eletroquímica.

As Figura 53A e 53B ilustram o comportamento do eletrodo com a variação do pH, na Figura 53A podemos observar que as distâncias entre os picos anódicos e catódicos aumentam com o aumento do valor do pH, e na Figura 53B os valores de corrente diminuem com o aumento de pH, assim como observado para o P2VP.

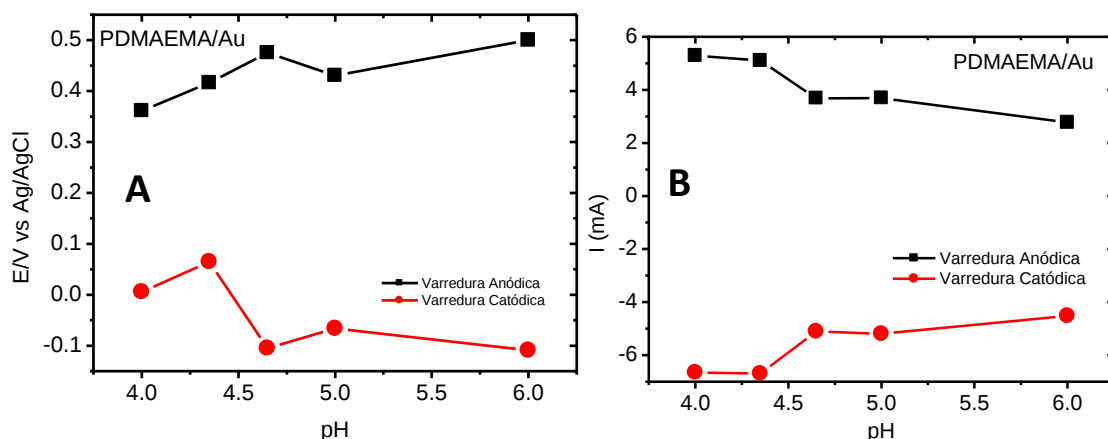


Figura 53. Eletrodo modificado PDMAEMA/Au A) Variação de potencial de pico vs pH; B) Variação de corrente de pico vs pH.

Na Figura 54A e 54B podemos ver como os valores de R_{ct} e R_s variam com o pH. Como esperado, quanto maior o valor do pH, maior a resistência relativa à superfície do eletrodo.

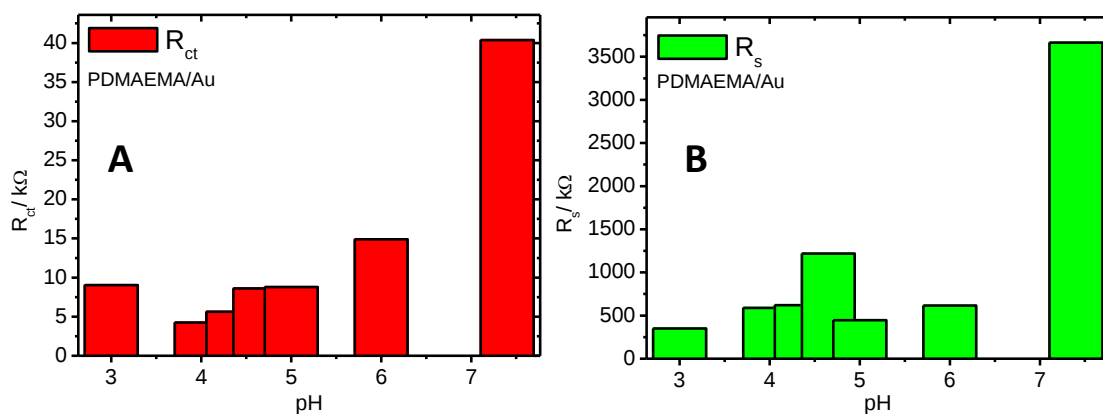


Figura 54. Eletrodo modificado PDMAEMA/Au. A) Variação resistência superficial, R_{ct} vs pH. B) Variação resistência solução, R_s vs pH.

A mesma análise de configuração de cadeia e cargas poliméricas feitas na seção 4.3.2 se aplica ao eletrodo de ITO modificado com PDMAEMA/Au.

4.4.2.2 L-SPR

As mediadas de L-SPR foram realizadas para verificar se as nanopartículas estavam fixadas ao polímero e para estudar o comportamento dos plasmon relacionados às nanopartículas de ouro quando submetidos à variação de pH (TAM et al., 2008).

Na Figura 55A, podemos observar os espectros de absorção medidos através do eletrodo de ITO modificado com PDMAEMA/Au, o deslocamento dos valores de $\lambda_{\text{máx}}$ indica que as nanopartículas de ouro estão aderidas às escovas de PDMAEMA.

Na Figura 55B é possível observar a curva de titulação do eletrodo modificado. O pK_a observado foi de $\sim 4,5$, longe do esperado, isto porque por trabalharmos dentro de uma faixa de pH fisiológico, valores de pH maiores que 7,5 não foram estudados. O pK_a encontrado neste estudo sugere que o PDMAEMA possui configurações intermediárias que variam com o pH, apesar da faixa de pH não compreender os pHs em que as escovas de PDMAEMA estão desprotonadas $\text{pH} > 7,5$, o comportamento observado para este eletrodo é plausível e comparável ao comportamento dos demais.

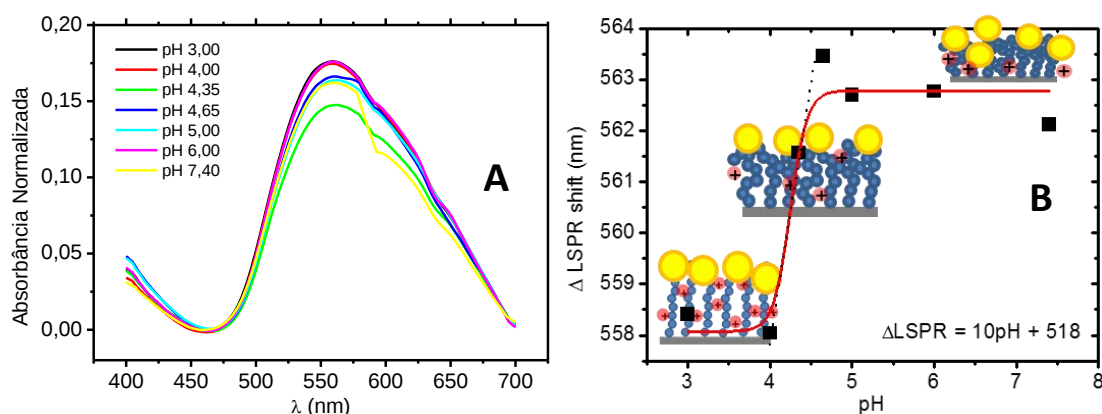


Figura 55. Eletrodo modificado com PDMAEMA/Au A) Espectros de L-SPR variando-se o pH de 3,00 a 7,40; B) Curva de titulação.

A variação de uma unidade de pH, provoca o deslocamento de 10 nm nos valores de $\lambda_{\text{máx}}$. Este fato se deve principalmente aos valores de pH empregados que favorecem a reação redox. Nos valores estudados as cadeias estavam sempre protonadas, porém, com diferentes taxas de protonação, causando a diferença de sinais. Estes resultados são excelentes para um sensor plasmônico (ANKER et al., 2008; HOMOLA; YEE; GAUGLITZ, 1999; WILLETS; VAN DUYN, 2007b).

4.4.3 Ensaios variando-se a Força Iônica

4.4.3.1 Eletroquímica

Os ensaios eletroquímicos com a variação da força iônica, utilizando concentrações de cloreto de sódio, mostraram que além de ser sensível as mudanças de

pH, o eletrodo de ITO modificado com PDMAEMA/Au também é sensível as mudanças de força iônica.

Na Figura 56A são mostradas as voltametrias cíclicas variando-se a força iônica em um intervalo de 0,001 a 1,000 mol·L⁻¹ de NaCl. A força iônica ótima observada foi de 0,001 mol·L⁻¹, e o menor valor de corrente obtido foi com a força iônica a partir de 0,500 mol·L⁻¹.

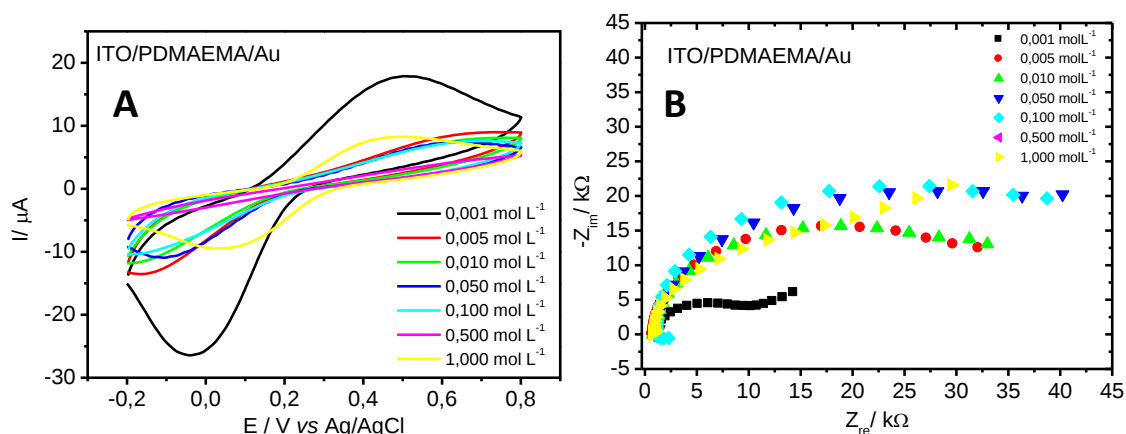


Figura 56. Eletrodo PDMAEMA/Au variando-se os valores de força iônica A) Voltametria cíclica, tampão fosfato, ferrocianeto 1,2 mol L⁻¹, velocidade de varredura 50 mV s⁻¹; B) Espectroscopia de Impedância eletroquímica.

Nas Figura 57A e 57B podemos observar o comportamento quando variamos a força iônica, como os picos obtidos nas voltametrias para diversas concentrações de NaCl não foram definidos e/ou não existiam, poucos valores de potencial e corrente de pico foram possíveis de serem aproveitados para a construção dos gráficos. Apesar dos poucos pontos analisados, podemos notar uma tendência de separação entre os potenciais de picos anódicos e catódicos até força iônica de 0,050 mol·L⁻¹, seguida de uma tendência a aproximação para valores de força iônica acima de 0,050 mol·L⁻¹. Não foi possível observar a estagnação dos resultados devido à qualidade dos voltamogramas, que foram repetidos diversas vezes sem alteração, as condições do sistema não favorece que os picos fiquem definidos.

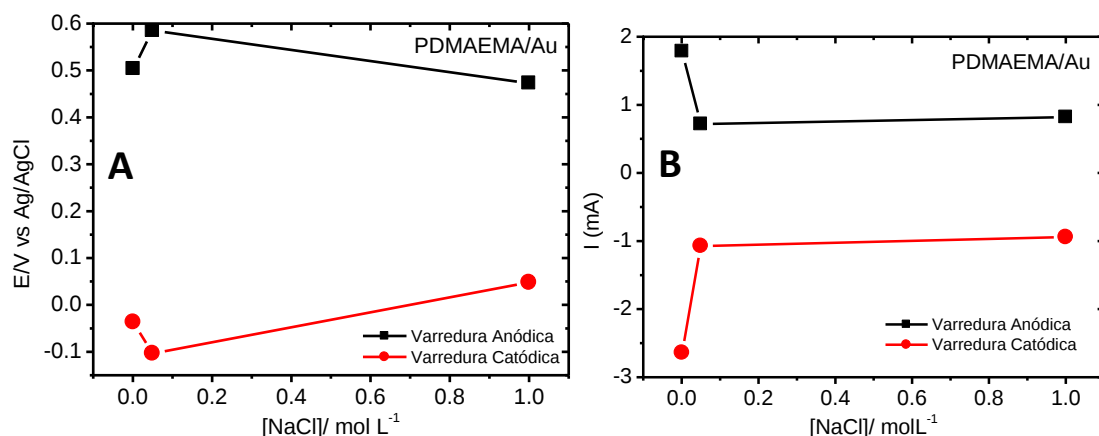


Figura 57. Eletrodo modificado PDMAEMA/Au A) Variação de potencial de pico vs [NaCl] 50 mV s⁻¹ ; B) Variação de corrente de pico vs [NaCl], 50 mV s⁻¹ .

Analisando a Figura 57B, observa-se um decaimento abrupto na corrente medida até força iônica de 0,050 mol·L⁻¹, a partir deste valor, é possível notar estagnação dos valores medidos.

As análises de espectroscopia de impedância eletroquímica mostrada na Figura 56B indicam que em uma força iônica de 0,001 mol·L⁻¹ o sinal obtido é o melhor, com menor resistência superficial, e os valores de força iônica de 0,010 e 0,050 mol·L⁻¹ apresentam as maiores resistências superficiais.

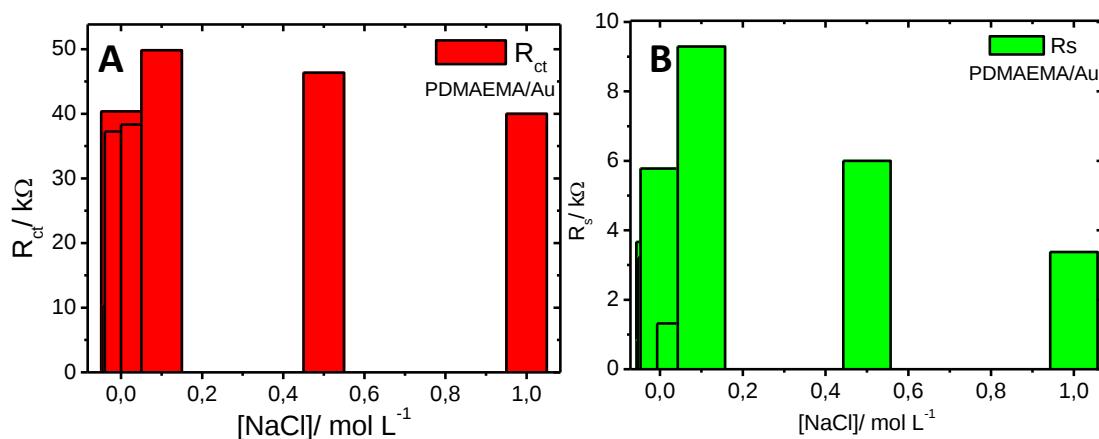


Figura 58. Eletrodo modificado PDMAEMA/Au. A) Variação resistência superficial, R_{ct} vs [NaCl]. B) Variação resistência solução, R_s vs [NaCl].

Apesar da dificuldade em se analisar os dados do eletrodo de ITO modificado com PDMAEMA/Au podemos afirmar que as transições de regime também estão presentes. O intervalo de regime osmótico convencional pode ser definido entre 0,001 – 0,050 mol·L⁻¹, não foi possível observar o decaimento exponencial por meio desta técnica, e, portanto não foi possível determinar o intervalo de regime osmótico não convencional. O

regime salino começa a partir de $0,050 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. A transição entre um regime e outro no caso das escovas de PDMAEMA é de difícil observação, um intervalo menor entre concentrações provavelmente possibilite esta observação.

4.4.3.2 L-SPR

O deslocamento dos valores de $\lambda_{\text{máx}}$ indica que as nanopartículas de ouro estão aderidas as escovas de PDMAEMA.

O comportamento observado para a variação dos valores de força iônica do PDMAEMA/Au é curioso quando comparado com a mesma análise referente ao P2VP. Esperava-se um comportamento similar (crescimento exponencial), porém, foi observado comportamento semelhante ao do políácido PAA um decaimento exponencial dos valores de deslocamento plasmônicos.

Analisando-se a Figura 59B, é possível observar que o comportamento do PDMAEMA/Au quando variado a força iônica do meio é mais complexo comparado ao do P2VP. Inicialmente ocorre um deslocamento para o vermelho em valores de força iônica de 0 até $0,001 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Em seguida, um deslocamento para o azul entre valores de $0,001 - 0,005 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. A partir deste valor ocorre crescimento exponencial até $0,050 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, onde finalmente o decaimento exponencial se inicia até $1,000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Através dos dados de L-SPR os intervalos de transição entre um regime e outro ficam mais bem definidos. Osmótico convencional: $0,001 - 0,005 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, a mudança é bem abrupta, devido a este fato, com o uso técnicas dinâmicas como voltametria cíclica não foi possível tal observação. Osmótico não convencional: $0,005 - 0,050 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Salino: $0,050 - 1,000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

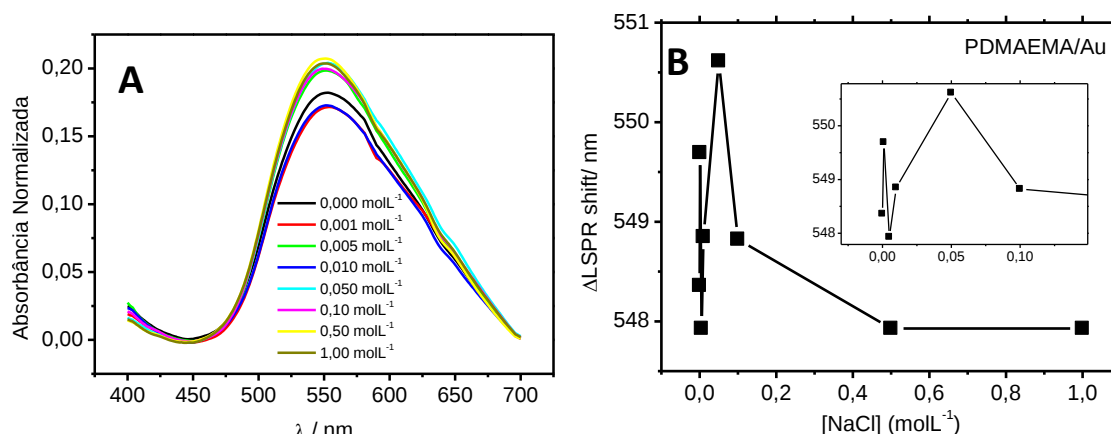


Figura 59. Eletrodo modificado com PDMAEMA/Au A) Espectros de L-SPR variando-se o valor de força iônica de 0,001 a 1,000 mol·L⁻¹; B) Curva de titulação, *insert* corresponde a uma ampliação de uma região selecionada no gráfico.

4.4.4 Aplicação Proposta

Eletrodos modificados com PDMAEMA/Au foram utilizados para a construção de um imunossensor usado na detecção do vírus de cinomose canina em urinas de animais contaminados.

A mesma metodologia descrita nas seções 3.2 e 3.3 foi utilizada na confecção do imunossensor, sendo que etapas adicionais foram realizadas após a modificação do eletrodo com as nanopartículas de ouro.

Após a modificação com nanopartículas de ouro, o eletrodo PDMAEMA/Au foi deixado por três horas em uma solução 10 mmol·L⁻¹ de ácido 11-mercaptopundecanóico (MUA), em etanol. Em seguida o eletrodo foi imerso em uma solução de tampão fosfato (10 mmol·L⁻¹) contendo 0,4 mol·L⁻¹ de EDC e 0,1 mol·L⁻¹ de NHS por uma hora e logo após 100 μL de anticorpo (IgY) foi adicionado gota a gota na superfície do eletrodo (Figura 60).

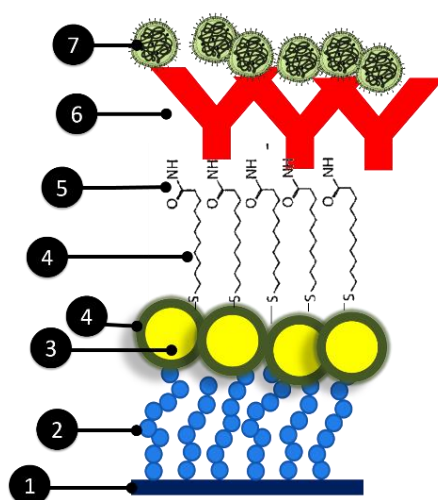


Figura 60. Esquema ilustrativo da confecção e detecção do imunossensor para o vírus CDV. (1) Eletrodo ITO. (2) PDMAEMA. (3) Nanopartículas de ouro. (4) MUA. (5) EDC/NHS. (6) Anticorpo. (7) Vírus CDV (amostra positiva).

Espectroscopias de impedância eletroquímica foram realizadas para a detecção do vírus da cinomose canina - CDV (canine distemper virus) (Figura 61). Previamente a cada análise, 100 μL de urina (positiva ou negativa) foram depositadas sobre a superfície do eletrodo PDMAEMA/Au/IgY e secas a temperatura ambiente. As amostras de urinas reais foram obtidas no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Departamento de Microbiologia e Imunologia no Instituto de Biociência da UNESP em Botucatu.

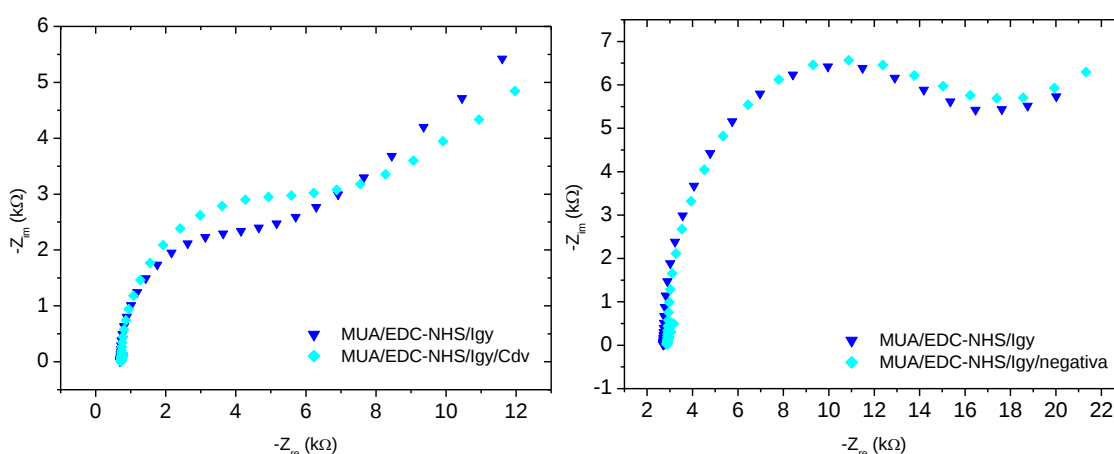


Figura 61. Espectro de impedância eletroquímica 100 kHz – 100 mHz, tampão fosfato 0,01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,4, 1,2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. A) Amostra positiva. B) Amostra negativa.

Devido a ligação específica que ocorre entre o vírus e o anticorpo, a resistência relativa à superfície do imunosensor aumenta quando em contato com amostras de urinas positivas ao vírus (Figura 61A). Em amostras que não contem o vírus, a resistência oferecida pela superfície fica inalterada (Figura 61B). Atualmente testes de sorologia (SANTOS; ALMENDRA; TAVARES, 2009), ensaios indiretos de imunofluorescência (SHIN et al., 1997), histopatologia (HUTTER; FENDLER, 2004) e imunohistoquímica (JÓŻWIK; FRYMUS, 2005) são utilizados para a detecção do vírus da cinomose canina, entretanto, todos eles apresentam limitações, sendo necessário o tratamento prévio da amostra, o que faz com que se consuma bastante tempo tornando-os relativamente de alto custo (BASSO et al., 2015). O imunosensor proposto pode substituir os testes existentes, uma vez que o processo de modificação é de baixo custo e o resultado é obtido rapidamente e altamente confiáveis.

4.5 P2VP/PAA

As características físicas da superfície do eletrodo ITO/P2VP/PAA/Au são bastantes similares as dos seus constituintes separadamente, imagens de AFM revelaram estrutura similar para o ITO/P2VP/PAA as dos eletrodos ITO/P2VP e ITO/PAA (Figura 62). Foram observados domínios segregados (WILLIAMS, 1993) (rugosidade rms de 2,2 nm) no eletrodo modificado até a etapa de recobrimento com os polímeros (Figura 62A), sendo que a rugosidade aumenta para rms 80,2 nm quando a superfície é recoberta com nanopartículas de ouro (Figura 62B).

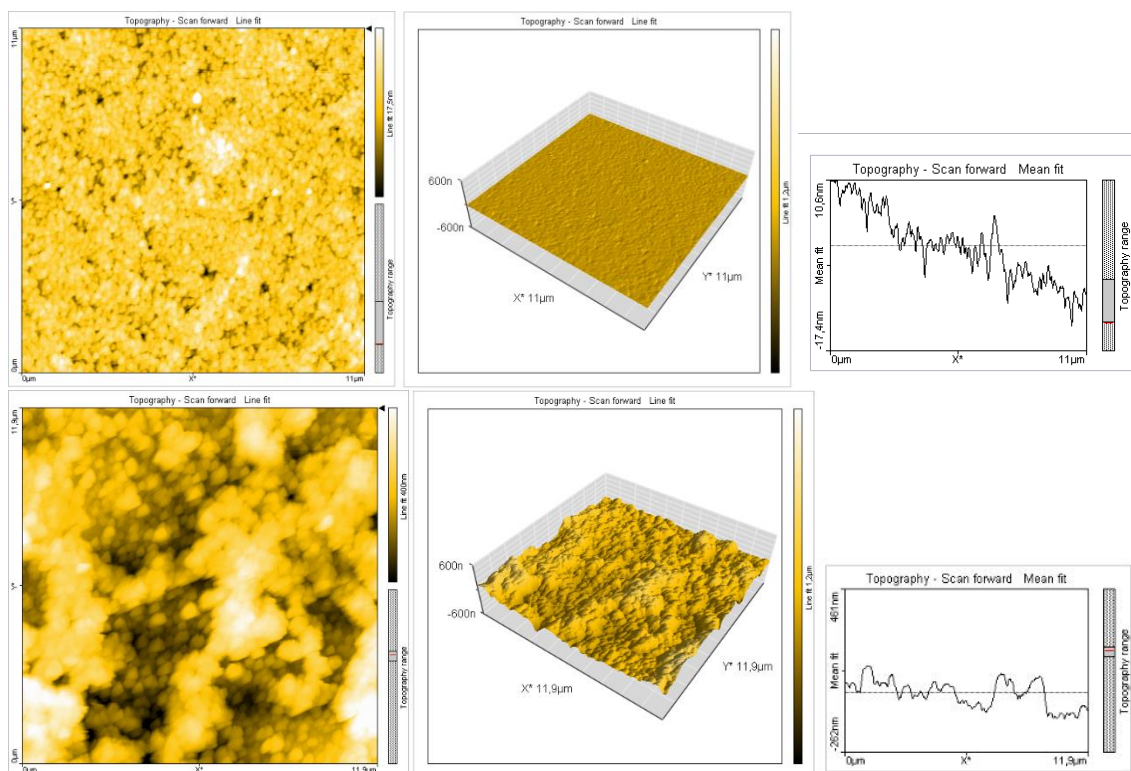


Figura 62. Micrografias de AFM e *cross-sections* do eletrodo modificado com P2VP/PAA. A) Eletrodo modificado até a etapa dos polímeros, rugosidade rms de 2,2 nm. B) Eletrodo ITO modificado até a etapa das nanopartículas de ouro, rugosidade rms de 80,2 nm.

4.5.1 Ensaios variando-se o pH

4.5.1.1 Eletroquímica

Apesar de possuir uma estrutura física similar à de seus constituintes, quando temos uma mistura de polímeros em uma única superfície, as propriedades físico-químicas decorrentes são bastante diferentes.

A mistura de uma polibase com um políácido fraco faz com que diferentes propriedades surjam ao se analisar o eletrodo principalmente no que se refere a variação de pH.

Primeiramente, para entendermos melhor as análises eletroquímicas frente a variação do pH, uma breve explicação da mudança conformacional das cadeias poliméricas da mistura de polímeros escovas será apresentada.

Como discutido nas seções 4.2.2.1 e 4.3.2.1, em valores de pHs > 4,7, as cadeias do PAA estão desprotonadas e negativamente carregadas, enquanto as cadeias do P2VP

estão colapsadas. Por outro lado, em $\text{pH} < 5,3$, as cadeias de P2VP estão protonadas e positivamente carregadas (Figura 63).

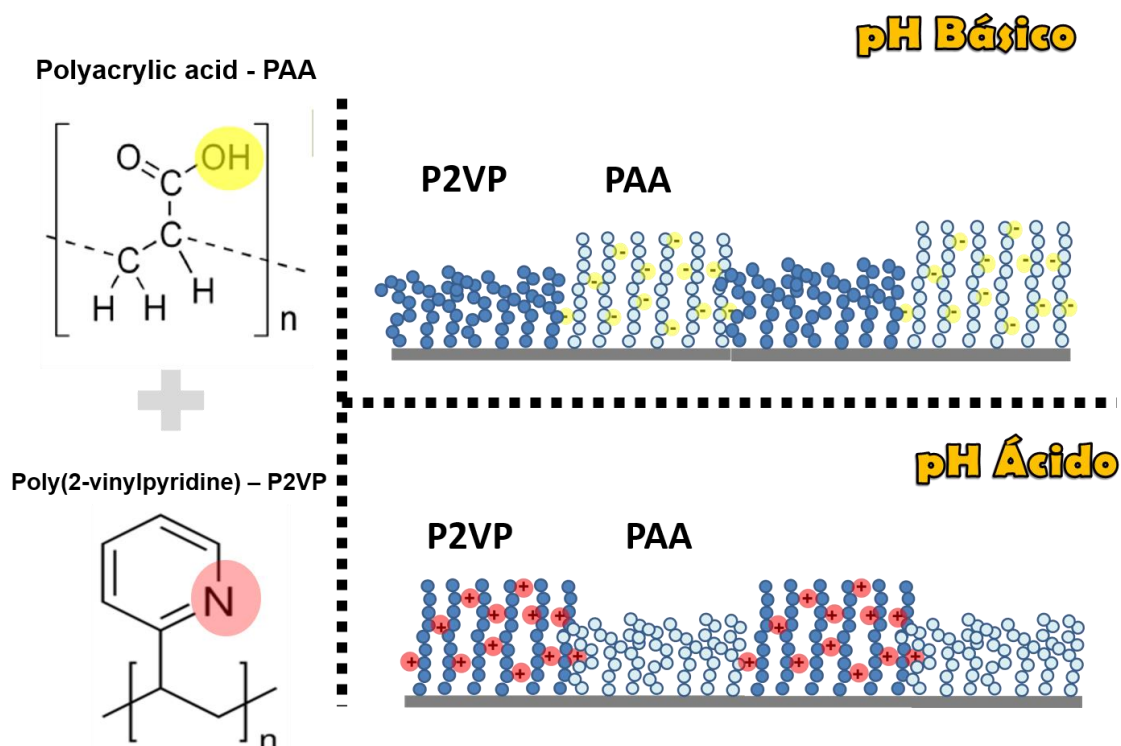


Figura 63. Representação esquemática da mudança conformacional das cadeias poliméricas da mistura de polímeros P2VP/PAA em pH básico e ácido.

Assim como nos eletrodos previamente estudados, quando o eletrodo ITO/P2VP/PAA possui o mesmo número de cargas positivas e negativas, temos o valor do pK_a da mistura de polímeros.

Uma importante observação, decorrente da variação de cargas positivas/negativas no eletrodo, deve ser feita. Nas discussões anteriores, a utilização de um único tipo de *probe* ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$) foi suficiente para se estudar eletroquimicamente os efeitos das variações das propriedades do meio sobre o eletrodo. Para a mistura de polímeros (poli ácido e poli base) se faz necessária a adição de um *probe* positivo. Nos estudos mostrados a seguir, foram utilizados dois *probes*, um positivo e um negativo ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{+3}$ e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$ respectivamente).

A necessidade da utilização dos dois tipos de *probes* pode ser melhor entendida na Figura 64.

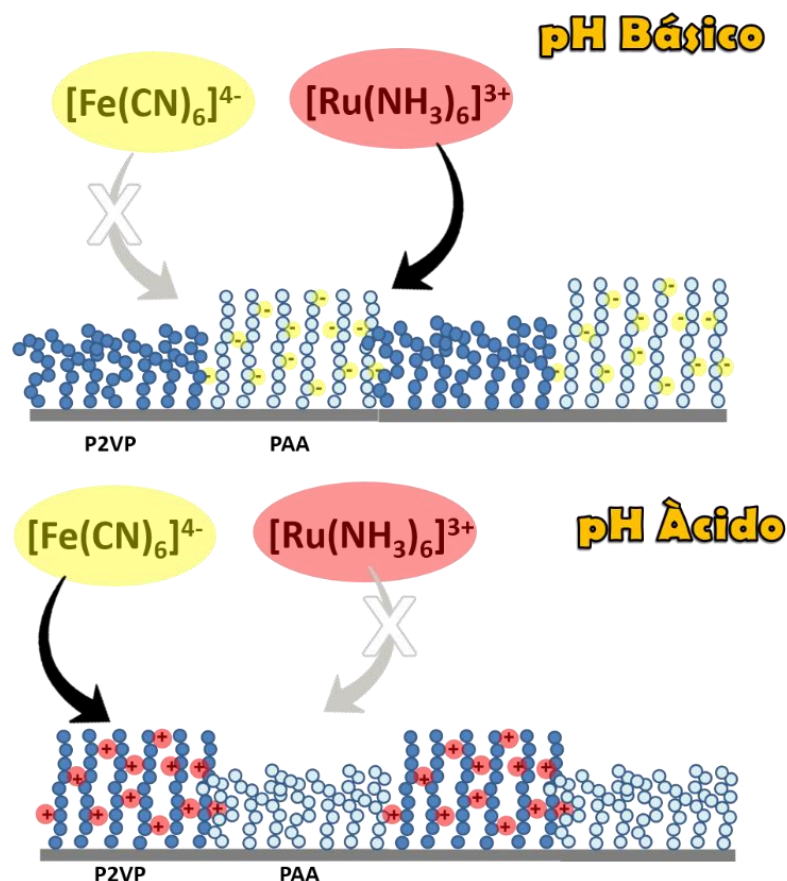


Figura 64. Ilustração esquemática da dependência do sinal obtido através dos probes positivo e negativo com a variação do pH.

Em meio ácido, as escovas de P2VP estão positivamente carregadas e a troca de elétrons entre a superfície do eletrodo e o íon $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{+3}$ é dificultada devido a repulsão eletrônica, já a troca de elétrons entre $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$ e a superfície não é afetada. Análise similar pode ser feita em meio básico; as escovas de PAA estão negativamente carregadas, dificultando a troca eletrônica entre $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$ e a superfície do eletrodo, enquanto a troca eletrônica entre o $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{+3}$ não é afetada.

Na Figura 65 podemos observar as voltametrias cíclicas para o ITO P2VP/PAA/Au em pH ácido (3,5) e básico (6,0).

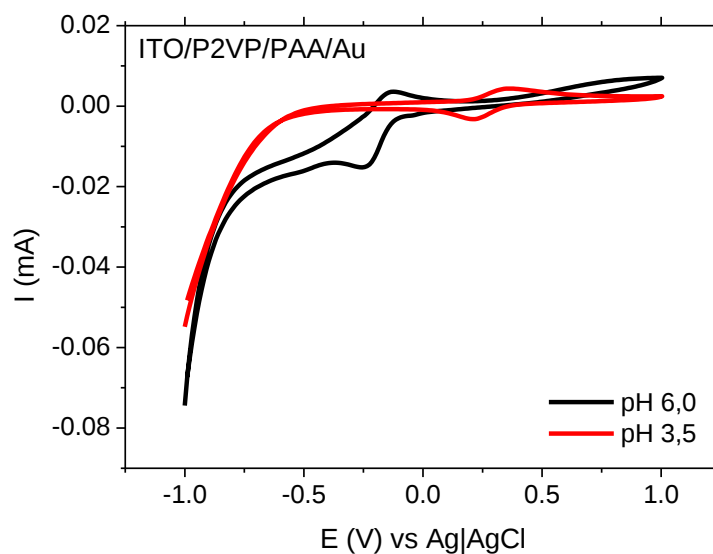


Figura 65. Voltametria cíclica com velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} , eletrodo referência de Ag|AgCl, tampão fosfato $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ contendo $1,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ e $0,6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$.

Em pH 3,5 é possível observar o pico correspondente ao $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ no potencial anódico igual a +0,3V. Em pH 6,0; o pico anódico do $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ é observado em -0.1V. Na Figura 66 são mostradas diversas voltametrias de pulso diferencial em frente a variação de pH.

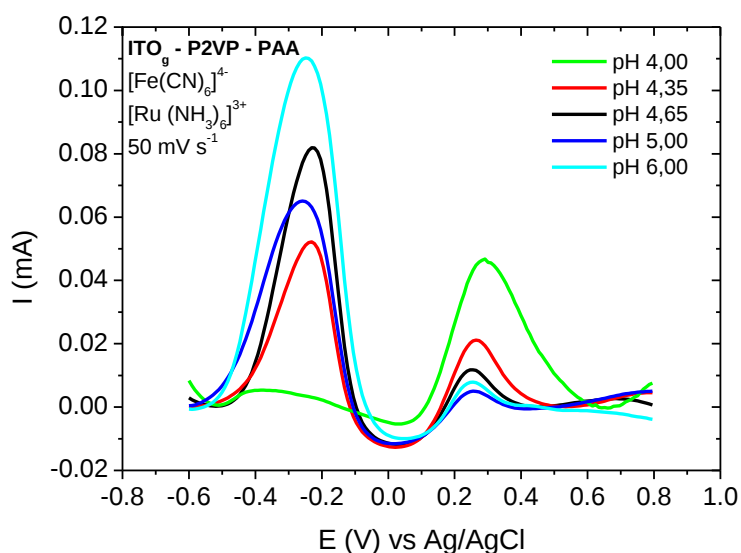


Figura 66. Voltametria de pulso diferencial. Tampão fosfato $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ contendo $0,6 [\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ e $1,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} vs eletrodo referência de Ag|AgCl.

Podemos observar que conforme o pH vai aumentando, a intensidade do pico referente ao $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ diminui e a intensidade de corrente do pico referente ao $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ aumenta. Na Figura 67 a variação da corrente medida é mostrada frente a variação do pH, podemos observar que no pH 4,35 a carga líquida do ITO/P2VP/PAA/Au é zero, sendo assim, o valor do pKa para esta mistura de polímeros é ~ 4.35 . Em valores de $\text{pH} < 4.35$ o eletrodo encontra-se positivamente carregado e em valores de $\text{pH} > 4.35$ o eletrodo encontra-se negativamente carregado. Os dados obtidos estão de acordo com trabalhos reportados na literatura (TAM et al., 2010a).

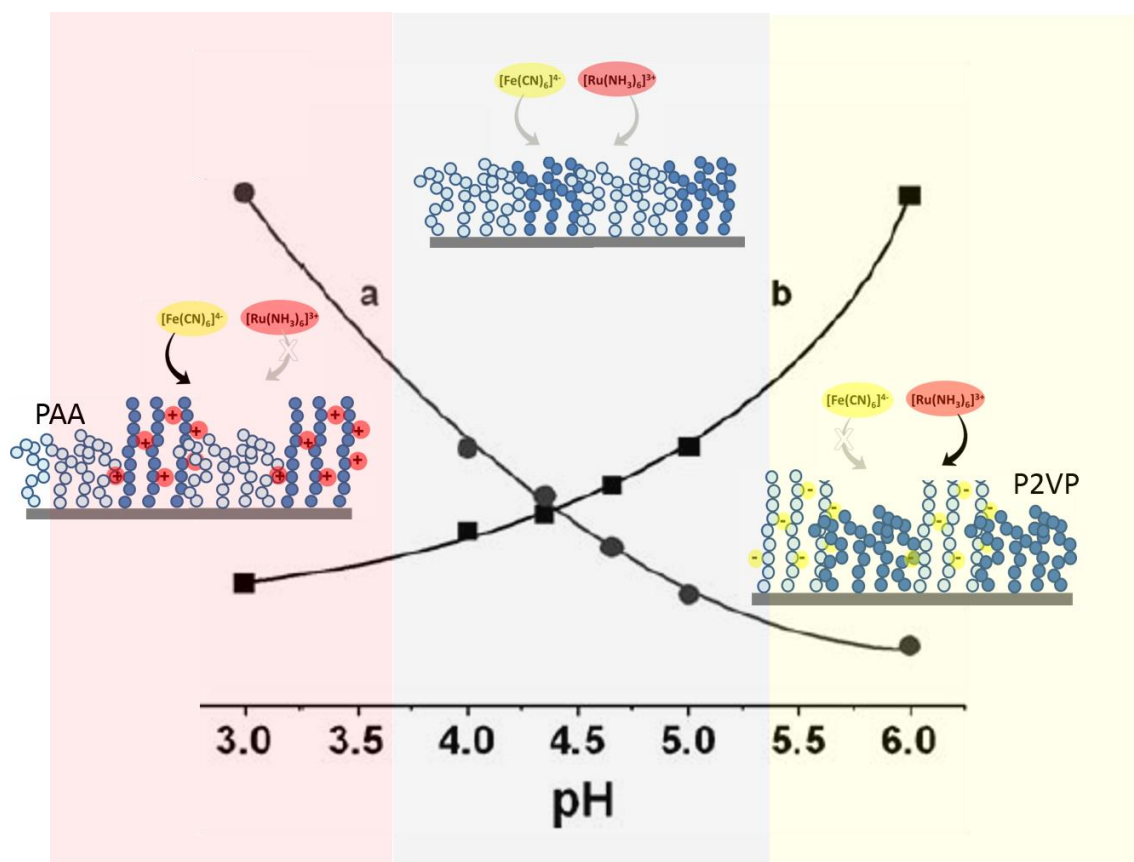


Figura 67. Curva de titulação para ITO/P2VP/PAA/Au.

4.5.1.2 L-SPR

As mediadas de L-SPR foram realizadas para verificar se as nanopartículas estavam fixadas ao polímero e para estudar o comportamento dos plasmon relacionados às nanopartículas de ouro quando submetidos à variação de pH (TAM et al., 2008).

Na Figura 68A, podemos observar os espectros de absorção medidos através do eletrodo de ITO modificado com P2VP/PAA/Au, o deslocamento dos valores de $\lambda_{\text{máx}}$ indica que as nanopartículas de ouro estão aderidas as escovas dos polímeros.

Na Figura 68B é possível observar a curva de titulação do eletrodo modificado; o pK_a observado foi de $\sim 4,65$, próximo ao observado via voltametria cíclica (4,35).

Diferentemente das outras curvas de titulação apresentadas anteriormente, o valor de pK_a para o ITO/P2VP/PAA/Au foi estimado utilizando-se o maior valor de $\lambda_{\text{máx}}$ observado, isto porque, em meio ácido, as escovas de P2VP estão positivamente carregadas e longe da superfície, fazendo com aumente a distância entre as nanopartículas de ouro; ocorrendo, portanto, um deslocamento dos espectros para menores comprimentos de onda. Conforme o meio vai ficando mais básico, as escovas de P2VP vão colapsando até uma configuração em que ambas as escovas estão colapsadas, neste caso, as nanopartículas estão o mais próximo possível, ocorrendo assim um deslocamento para maiores comprimentos de onda. Ao elevarmos ainda mais o valor do pH, as escovas de PAA vão se tornando negativamente carregadas e longe da superfície devido a repulsão eletrostática entre elas, fazendo com que as nanopartículas de ouro voltem a se afastar, deslocando os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ para menores comprimentos de onda novamente. Este fenômeno faz com que a curva de calibração tenha o perfil mostrado na Figura 68B.

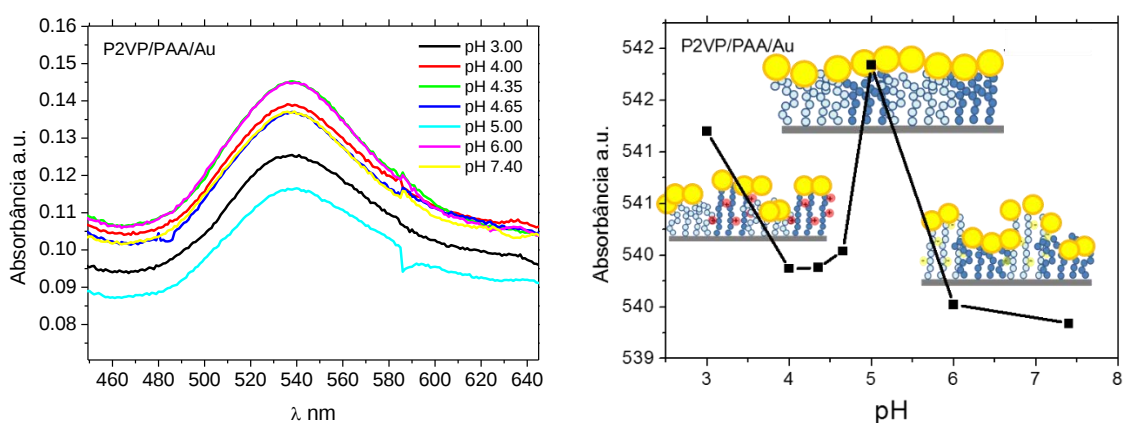


Figura 68. Eletrodo modificado com P2VP/PAA/Au A) Espectros de L-SPR variando-se o pH de 3,00 a 7,40; B) Curva de titulação

4.5.2 Aplicação Proposta

Devido a capacidade dos polímeros “mixed” estarem positivamente ou negativamente carregados dependendo do estímulo do meio, a gama de aplicação aumenta consideravelmente em relação aos eletrodos que são modificados com somente um tipo de polímero, pois estes possuem apenas o estado neutro e carregado positiva ou negativamente. Uma das aplicações promissoras do eletrodo ITO/P2VP/PAA é como plataforma para *drug delivery*, neste caso apresentado, *gene delivery*.

ss-DNA, molécula negativamente carregada independentemente do pH, foi eletrostaticamente aderida à superfície do ITO/P2VP/PAA em pH 3, quando o eletrodo estava positivamente carregado. O pH da superfície do eletrodo foi elevado para valores mais básicos via eletrólise, fazendo com que as cadeias de PAA ficassem negativamente carregadas, liberando assim o DNA para o meio devido a repulsão eletrostática (Figura 69).

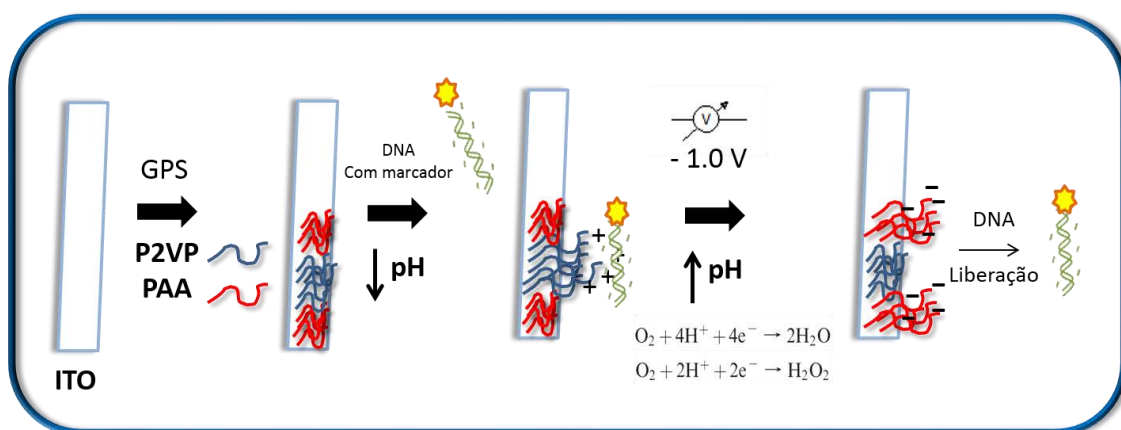
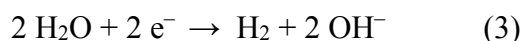
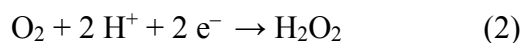
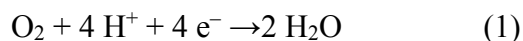


Figura 69. Ilustração representativa da liberação de DNA via eletroquímica.

Neste trabalho, a mudança do pH ocorreu apenas localmente. Ao se aplicar uma diferença de potencial de -1V no eletrodo por um período de tempo, ocorre a redução do oxigênio que consome prótons, e deixa a região imediata a reação com deficiência de íons de hidrogênio. Além da redução do oxigênio, em potenciais suficientemente negativos, ocorre também a redução da água, que também consome prótons levando a um aumento ainda maior do pH local:



A redução do oxigênio pode levar a formação de água (1) ou peróxido de oxigênio (2) enquanto a redução da água leva a formação de gás hidrogênio e íons hidroxilas (3).

Na Figura 70 podemos observar a corrente de redução referente ao oxigênio e água. A corrente de redução do oxigênio começa no potencial igual a -0,56V sendo 75% maior do que a corrente obtida na ausência do oxigênio.

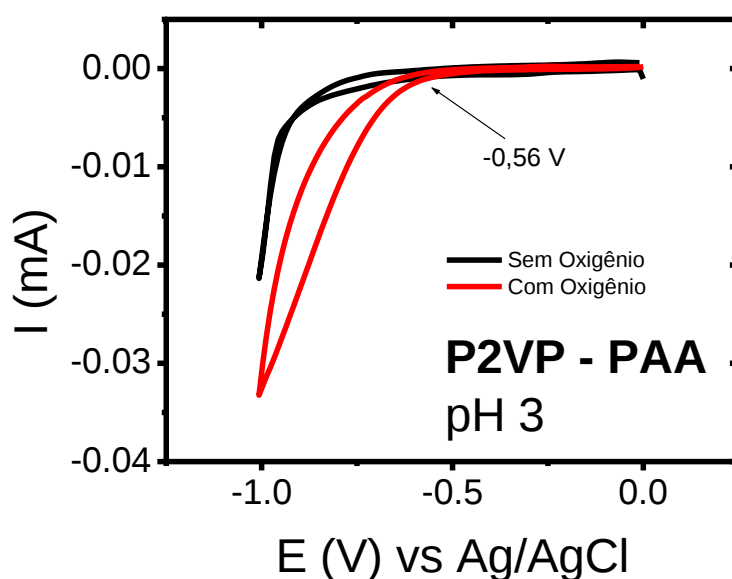


Figura 70. Voltametria cíclica a 50 mVs^{-1} de uma solução tampão fosfato pH 3,0 na ausência e na presença de oxigênio vs Ag|AgCl. Para a retirada de oxigênio, Ar foi borbulhado por 30 min.

A mudança de pH local é facilmente observada quando uma solução do indicador fenolfitalcina está presente na solução eletrolítica (Figura 71). A mudança de coloração na superfície do eletrodo indica mudança para pH superior a 7.

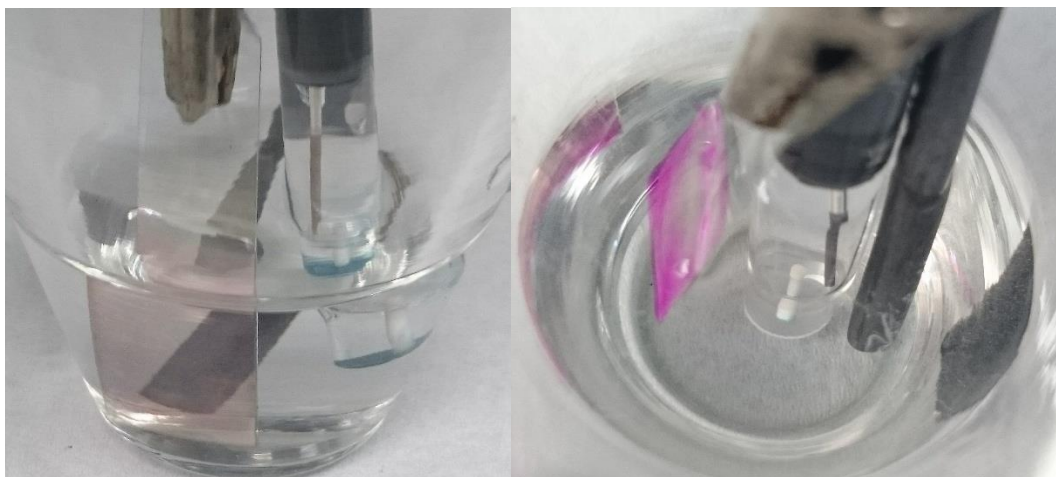


Figura 71. Tampão fosfato pH 3,0 0,01 mol·L⁻¹ na presença de 0,1 mol·L⁻¹ de fenolftaleína. A) -1V aplicado por 5 min. B) -1,0V aplicado por 20 min.

Na Figura 72 voltametrias de pulso diferencial são mostradas antes e após a polarização do eletrodo ITO/P2VP/PAA a -1,0V por 30 minutos em pH 3. Podemos observar um aumento referente ao pico do $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{+3}$ e diminuição no pico do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$, devido a mudança de conformação dos polímeros P2VP, inicialmente positivamente carregado muda para neutro à pH básico e do PAA inicialmente neutro em pH 3 muda para negativamente carregado após aplicação do potencial e aumento do pH local.

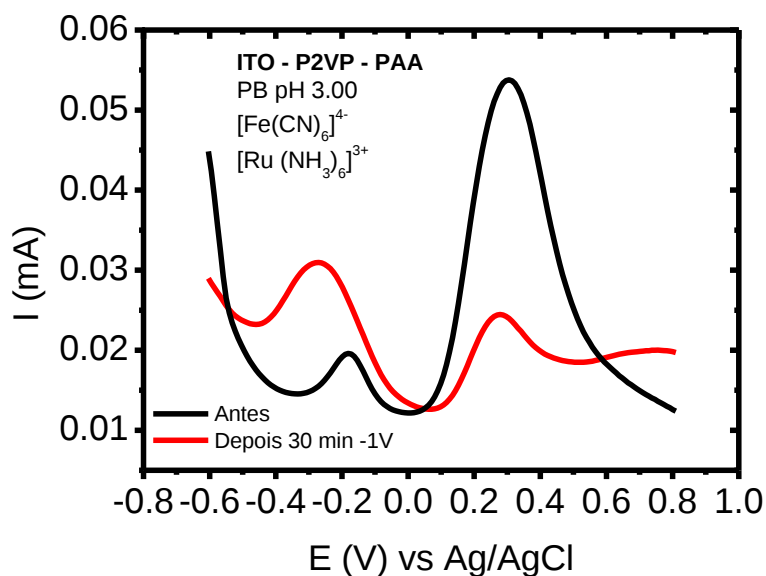


Figura 72. Voltametria de pulso diferencial em tampão fosfato pH 3 contendo 0,6mmol·L⁻¹ $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{+3}$ e 1,2 mmol·L⁻¹ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$. A diferença de potencial de -1,0V foi aplicado durante 30 minutos.

A confirmação da liberação do DNA carregado na superfície ao se aplicar voltagem negativa no eletrodo foi verificada através do uso de DNA marcado com molécula fluorescente. Na Figura 73, podemos verificar o espectro de fluorescência do meio contendo o ITO/P2VP/PAA/DNA antes da aplicação de -1,0V e depois de 30 min aplicando-se -1,0V.

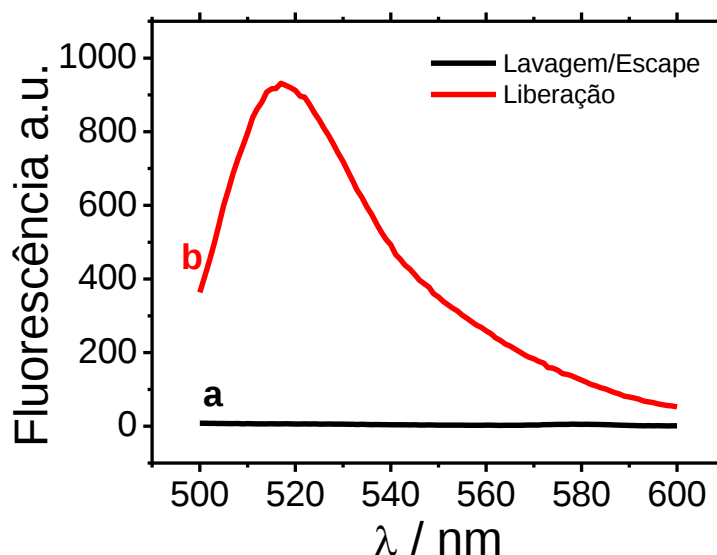


Figura 73. Espectros de fluorescência obtidos após o eletrodo ITO/P2VP/PAA/DNA ser deixado em repouso na solução tampão fosfato pH 3 por 2 horas (a) e após a aplicação de -1,0V por 30 min (b).

Micrografias da superfície do eletrodo antes e após a aplicação de potencial negativo obtidas por meio de um microscópio confocal confirmam a diminuição na intensidade da fluorescência devido a liberação das moléculas de DNA marcadas para o meio (Figura 74).

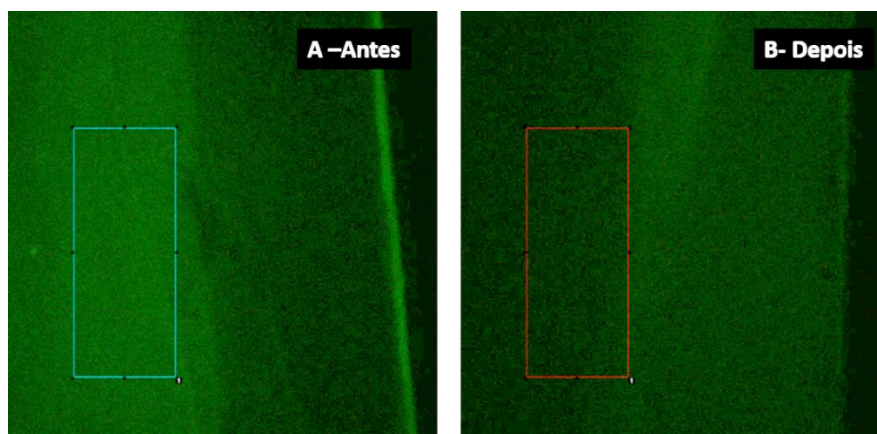


Figura 74. Micrografias da superfície do eletrodo ITO/P2VP/PAA/DNA obtidas a partir de microscópio confocal. Aumento de 100x.

5. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos é possível construir importantes conclusões:

- 1- O método empregado para síntese das nanopartículas se mostrou satisfatório, levando a partículas de tamanho e formas homogêneas;
- 2- O emprego das nanopartículas de Au na composição do filme sobre o eletrodo mostrou-se eficaz, aumentando em 10x a intensidade do sinal sem provocar mudanças nas características escova dos polímeros;
- 3- O método empregado para modificação da superfície do eletrodo e obtenção dos filmes em escova se mostrou eficaz;
- 4- A utilização das técnicas eletroquímicas e plasmônicas mostraram-se eficientes para a caracterização físico química do eletrodo modificado, no quadro abaixo os principais resultados obtidos acerca dos eletrodos modificados com diversos polímeros podem ser observados.

Quadro 2. Resumo dos principais dados obtidos para os eletrodos PAA/Au, P2VP/Au e PDMAEMA/Au, variando-se os valores de pH e força iônica.

Polímero	pKa observado (L-SPR)	pKa esperado	pH e IS (mol·L ⁻¹) Ótimo (ON)	pH e IS (mol·L ⁻¹) Menor sinal (OFF)	Regime Osmótico (mol·L ⁻¹)	Regime Osmótico não Convencional (mol·L ⁻¹)	Regime Salino (mol·L ⁻¹)	ΔLSPR/Unidade de pH	Comportamento Força Iônica - LSPR
PAA	4,3	4,7	3,0 0,001	6,0 1,000	0,001- 0,005	0,005- 0,050	0,050- 1,000	-5,7	Decaimento Exponencial
P2VP	4,2	5,3	4,0 0,001	7,4 0,010	0,001- 0,010	0,010- 0,100	0,100- 1,000	11	Crescimento Exponencial
PDMAEMA	4,5	7,5	4,0 0,001	7,4 0,500	0,001- 0,005	0,005- 0,050	0,050- 1,000	10	Decaimento Exponencial
P2VP/PAA	4,65	4,35	3,0	6,0	-	-	-	-	Pico

- 5- Os eletrodos estudados neste trabalho podem ser aplicados em canais de estado sólido podendo levar a criação de sensores robustos e sensíveis a mudanças do meio externo, alternando sua configuração de “OFF” para “ON”, os chamados sensores comutativos, que são ativados por um tipo de sinal, gatilho, muito utilizados como transdutores eletrônicos e eletroquímicos.

PROPOSTAS DE CONTINUAÇÃO DO ESTUDO:

- Novos métodos de mudança de parâmetros relacionados ao meio, como a mudança local de pH via eletroquímica, abrem um grande leque de oportunidades para futuros estudos das propriedades responsivas dos polímeros escova. Assim como mudança de pH via reação enzimática, onde o produto da reação é um composto ácido ou básico. Neste tipo de sistema assim como o anterior, somente o pH local é alterado.
- O eletrodo PDMAEMA/PAA, também constituído por um polieletrólito básico e um ácido, é propício a aplicações semelhantes ao P2VP/PAA, com a diferença de que com o PDMAEMA/PAA é possível trabalhar com pHs mais próximos ao fisiológico, uma vez que o PDMAEMA possui maior valor de pKa que o P2VP. Em valores de $7,4 > \text{pH} > 4,7$ a superfície PDMAEMA/PAA encontra-se positivamente carregada e em valores de $\text{pH} > 7,4$ negativamente carregada, com isso, proteínas com valores de pKa $7,4 > \text{pH} > 4,7$ podem ser carregadas na superfície do eletrodo e posteriormente liberadas para o meio após eletrolise a -1 V.
- O desenvolvimento de superfícies inteligentes baseadas em polímeros escovas é um campo promissor e multidisciplinar, tendo grande visibilidade na área de saúde e ambiental. Este trabalho abre diversas caminhos para um estudo mais aprofundado sobre o tema.

6. REFERENCIAS

- AHN, S. J. et al. Surface-Initiated Polymerization on Nanopatterns Fabricated by Electron-Beam Lithography. **Advanced Materials**, v. 16, n. 23-24, p. 2141–2145, 17 dez. 2004.
- ANKER, J. N. et al. Biosensing with plasmonic nanosensors. **Nature materials**, v. 7, n. 6, p. 442–53, jun. 2008.
- ANTONIO, T.; BASSO, C. Electrochemical Studies Based on Local Interfacial pH Changes of Gold Nanoparticles Immobilized on Polystyrene Brushes. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, p. 4150–4159, 2013.
- ANTONIO, T. R. T. A. et al. Toward pH-controllable bioelectrocatalysis for hydrogen peroxide based on polymer brushes. **Electrochemistry Communications**, v. 29, p. 41–44, abr. 2013.
- BASSO, C. R. et al. A fast and highly sensitive method for the detection of canine distemper virus by the naked eye. **Analalytical Methods**, v. 7, n. 6, p. 2264–2267, 12 mar. 2015.
- BHAGAWATI, M.; YOU, C.; PIEHLER, J. Quantitative real-time imaging of protein-protein interactions by LSPR detection with micropatterned gold nanoparticles. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 20, p. 9564–71, 15 out. 2013.
- CRULHAS, B. P. et al. Stimuli-Responsive Biointerface Based on Polymer Brushes for Glucose Detection. **Electroanalysis**, v. 26, n. 4, p. 815–822, 26 abr. 2014.
- DRAPER, J. et al. Mixed Polymer Brushes by Sequential Polymer Addition : Anchoring Layer Effect. **Langmuir**, n. 12, p. 4064–4075, 2004.
- G.C. SCHATZ AND R.P. VAN DUYNE, IN J. M. C. AND P. R. G. (EDS). **Handbook of Vibrational Spectroscopy**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2002.
- GUPTA, S. et al. Gold Nanoparticles Immobilized on Stimuli Responsive Polymer Brushes as Nanosensors. **Macromolecules**, v. 41, n. 21, p. 8152–8158, 11 nov. 2008.
- HAES, A. J.; VAN DUYNE, R. P. A unified view of propagating and localized surface plasmon resonance biosensors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 379, n. 7–8, p. 920–30, ago. 2004.
- HAYNES, C. L.; VAN DUYNE, R. P. Nanosphere Lithography: A Versatile Nanofabrication Tool for Studies of Size-Dependent Nanoparticle Optics. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 24, p. 5599–5611, jun. 2001.
- HOMOLA, J.; YEE, S. S.; GAUGLITZ, G. Surface plasmon resonance sensors: review. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 54, n. 1-2, p. 3–15, 25 jan. 1999.

HUTTER, E.; FENDLER, J. H. Exploitation of Localized Surface Plasmon Resonance. **Advanced Materials**, v. 16, n. 19, p. 1685–1706, 4 out. 2004.

IONOV, L. et al. Reversible chemical patterning on stimuli-responsive polymer film: environment-responsive lithography. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 27, p. 8302–6, 9 jul. 2003.

IONOV, L. et al. Gradient Mixed Brushes: “Grafting To” Approach. **Macromolecules**, v. 37, n. 19, p. 7421–7423, set. 2004a.

IONOV, L. et al. Inverse and reversible switching gradient surfaces from mixed polyelectrolyte brushes. **Langmuir**, v. 20, n. 23, p. 9916–9, 9 nov. 2004b.

IONOV, L. et al. Smart Microfluidic Channels. **Advanced Functional Materials**, v. 16, n. 9, p. 1153–1160, 6 jun. 2006.

IONOV, L. et al. Stimuli-responsive command polymer surface for generation of protein gradients. **Biointerphases**, v. 4, n. 2, p. FA45–9, jun. 2009.

IONOV, L. Actively-moving materials based on stimuli-responsive polymers. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 17, p. 3382, 2010.

JENSEN, T. R. et al. Nanosphere Lithography: Tunable Localized Surface Plasmon Resonance Spectra of Silver Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 45, p. 10549–10556, nov. 2000.

JÓZWIK, A.; FRYMUS, T. Comparison of the Immunofluorescence Assay with RT-PCR and Nested PCR in the Diagnosis of Canine Distemper. **Veterinary Research Communications**, v. 29, n. 4, p. 347–359, jun. 2005.

KIMLING, J. et al. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. **The journal of Physical Chemistry. B**, v. 110, n. 32, p. 15700–7, 17 ago. 2006.

LEE, H.-S. et al. Symmetric pH-dependent swelling and antibacterial properties of chitosan brushes. **Langmuir**, v. 27, n. 20, p. 12458–65, 18 out. 2011.

MATSUSHITA, S.; KYOTANI, M.; AKAGI, K. Hierarchically controlled helical graphite films prepared from iodine-doped helical polyacetylene films using morphology-retaining carbonization. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 44, p. 17977–92, 9 nov. 2011.

MCFARLAND, A. D. et al. Color My Nanoworld. **Journal of Chemical Education**, v. 81, n. 4, p. 544A, 1 abr. 2004.

MINKO, S. et al. Two-level structured self-adaptive surfaces with reversibly tunable properties. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 13, p. 3896–900, 2 abr. 2003.

MINKO, S. Responsive Polymer Brushes. **Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews**, v. 46, n. 4, p. 397–420, dez. 2006.

MOCK, J. J. et al. Probing dynamically tunable localized surface plasmon resonances of film-coupled nanoparticles by evanescent wave excitation. **Nano Letters**, v. 12, n. 4, p. 1757–64, 11 abr. 2012.

MOTORNOV, M. et al. Chemical gating with nanostructured responsive polymer brushes: mixed brush versus homopolymer brush. **ACS nano**, v. 2, n. 1, p. 41–52, jan. 2008.

MOTORNOV, M. et al. Switchable selectivity for gating ion transport with mixed polyelectrolyte brushes: approaching “smart” drug delivery systems. **Nanotechnology**, v. 20, n. 43, p. 434006, 28 out. 2009.

MUCIC, R. C. et al. DNA-Directed Synthesis of Binary Nanoparticle Network Materials. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 48, p. 12674–12675, dez. 1998.

PARK, S.-J.; TATON, T. A.; MIRKIN, C. A. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes. **Science**, v. 295, n. 5559, p. 1503–6, 22 fev. 2002.

RETSOS, H. et al. Adhesion between chemically heterogeneous switchable polymeric brushes and an elastomeric adhesive. **Langmuir**, v. 21, n. 17, p. 7722–5, 16 ago. 2005.

ROITER, Y. et al. Mechanism of nanoparticle actuation by responsive polymer brushes: from reconfigurable composite surfaces to plasmonic effects. **Nanoscale**, v. 4, n. 1, p. 284–92, 7 jan. 2012.

SANNOMIYA, T. et al. Electrochemistry on a localized surface plasmon resonance sensor. **Langmuir**, v. 26, n. 10, p. 7619–26, 18 maio 2010.

SANTOS, N.; ALMENDRA, C.; TAVARES, L. Serologic survey for canine distemper virus and canine parvovirus in free-ranging wild carnivores from Portugal. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, n. 1, p. 221–226, 2009.

SCHÜWER, N. B. Synthesis of Responsive Polymer Brushes for Sensing Applications. [s.l.] ÉCOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE LAUSANNE, 2011.

SHIN, Y. S. et al. Expression of the nucleocapsid protein gene of the canine distemper virus. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 59, n. 1, p. 51–3, jan. 1997.

SIDORENKO, A. et al. Switching of Polymer Brushes. **Langmuir**, v. 15, n. 24, p. 8349–8355, nov. 1999.

STORHOFF, J. J. et al. What Controls the Optical Properties of DNA-Linked Gold Nanoparticle Assemblies? **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 19, p. 4640–4650, maio 2000.

SUN, T. et al. Reversible Switching between Superhydrophilicity and Superhydrophobicity. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, n. 3, p. 357–360, 5 jan. 2004.

SZUNERITS, S.; BOUKHERROUB, R. Sensing using localised surface plasmon resonance sensors. **Chemical communications**, v. 48, n. 72, p. 8999–9010, 18 set. 2012.

TAM, T. K. et al. Polymer Brush-Modified Electrode with Switchable and Tunable Redox Activity for Bioelectronic Applications. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 22, p. 8438–8445, jun. 2008.

TAM, T. K. et al. Modified Electrodes with Switchable Selectivity for Cationic and Anionic Redox Species. **Electroanalysis**, v. 22, n. 1, p. 35–40, 14 jan. 2010a.

TAM, T. K. et al. Electrochemical nanotransistor from mixed-polymer brushes. **Advanced materials**, v. 22, n. 16, p. 1863–6, 22 abr. 2010b.

TAM, T. K. et al. Electrochemical nanotransistor from mixed-polymer brushes. **Advanced materials**, v. 22, n. 16, p. 1863–6, 22 abr. 2010c.

TOKAREV, I.; MOTORNOV, M.; MINKO, S. Molecular-engineered stimuli-responsive thin polymer film: a platform for the development of integrated multifunctional intelligent materials. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 38, p. 6932, 22 set. 2009.

TOKAREV, I.; TOKAREVA, I.; MINKO, S. Gold-Nanoparticle-Enhanced Plasmonic Effects in a Responsive Polymer Gel. **Advanced Materials**, v. 20, n. 14, p. 2730–2734, 17 jul. 2008.

TOKAREVA, I. et al. Nanosensors based on responsive polymer brushes and gold nanoparticle enhanced transmission surface plasmon resonance spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 49, p. 15950–1, 15 dez. 2004.

UHLMANN, P. et al. In-Situ Investigation of the Adsorption of Globular Model Proteins on Stimuli-Responsive Binary Polyelectrolyte Brushes. **Langmuir**, n. 12, p. 229–236, 2007.

VAN DE WETERING, P. et al. A Mechanistic Study of the Hydrolytic Stability of Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate). **Macromolecules**, v. 31, n. 23, p. 8063–8068, nov. 1998.

WAN, F. et al. Grafting polymer brushes on biomimetic structural surfaces for anti-algae fouling and foul release. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 4, n. 9, p. 4557–65, 26 set. 2012.

WANG, C.; IRUDAYARAJ, J. Gold nanorod probes for the detection of multiple pathogens. **Small**, v. 4, n. 12, p. 2204–8, dez. 2008.

WEIR, M. P.; PARNELL, A. J. Water Soluble Responsive Polymer Brushes. **Polymers**, v. 3, n. 4, p. 2107–2132, 7 dez. 2011.

WILLETS, K. A.; VAN DUYNE, R. P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 58, p. 267–97, jan. 2007a.

WILLETS, K. A.; VAN DUYNE, R. P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 58, p. 267–97, 12 jan. 2007b.

WILLIAMS, D. R. M. Grafted polymers in bad solvents: octopus surface micelles. **Journal de Physique II**, v. 3, n. 9, p. 1313–1318, 1 set. 1993.

WILLOTT, J.; MURDOCH, T.; HUMPHREYS, B. Critical salt effects in the swelling behavior of a weak polybasic brush. **Langmuir**, 2014.

WITTEMANN, A. et al. High elongation of polyelectrolyte chains in the osmotic limit of spherical polyelectrolyte brushes: a study by cryogenic transmission electron microscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 27, p. 9688–9, 13 jul. 2005.

YAO, H.; HU, N. pH-switchable bioelectrocatalysis of hydrogen peroxide on layer-by-layer films assembled by concanavalin A and horseradish peroxidase with electroactive mediator in solution. **The journal of physical chemistry. B**, v. 114, n. 9, p. 3380–6, 11 mar. 2010a.

YAO, H.; HU, N. pH-Controllable on-off bioelectrocatalysis of bienzyme layer-by-layer films assembled by concanavalin A and glucoenzymes with an electroactive mediator. **The journal of physical chemistry. B**, v. 114, n. 30, p. 9926–33, 5 ago. 2010b.

YGUERABIDE, J.; YGUERABIDE, E. E. Light-Scattering Submicroscopic Particles as Highly Fluorescent Analogs and Their Use as Tracer Labels in Clinical and Biological Applications. **Analytical Biochemistry**, v. 262, n. 2, p. 137–156, set. 1998.

ZHAO, B.; BRITTAIN, W. . Polymer brushes: surface-immobilized macromolecules. **Progress in Polymer Science**, v. 25, n. 5, p. 677–710, jun. 2000.

ZHOU, J. et al. Temperature, ionic strength and pH induced electrochemical switching of smart polymer interfaces. **Chemical Communications**, n. 46, p. 4820, 2006.

ZHULINA, E.; BIRSHTEIN, T.; BORISOV, O. Theory of ionizable polymer brushes. **Macromolecules**, p. 1491–1499, 1995.

7. TRABALHOS CIENTÍFICOS

1- Título/Ano: Polymer Brush Modified Electrode with Switchable Selectivity Triggered by pH Changes Enhanced by Gold Nanoparticles (2013)

Revista: Journal of the Brazilian Chemical Society, 25(3), 453–459

Resumo: Neste trabalho foi desenvolvido um sensor com propriedades inteligentes, baseado em polímeros escova (poli-ácido acrílico) modificado com nanopartículas de ouro. Este novo material demonstrou propriedades comutáveis que podem discriminar diferentes pHs. O eletrodo foi caracterizado por voltametria cíclica (CV), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR).

Abstract: In this work, a sensor was built up with smart material based on polymer brush and gold nanoparticles. The modified electrode functionalized with polyacrylic acid (PAA) tethered to indium tin oxide (ITO) and covered with gold nanoparticle (ITO/PAA/Au) demonstrated switchable interfacial properties discriminating different pHs. The switchable electrochemical and plasmonic process was characterized by cyclic voltammetry (CV), electrochemistry impedance spectroscopy (EIS), and localized surface plasmon resonance (LSPR).

2- Título/Ano: Stimuli-Responsive Biointerface Based on Polymer Brushes for Glucose Detection (2014)

Revista: Electroanalysis, 26(4), 815–822

Resumo: A construção e caracterização de um biosensor baseado em polímero escova são apresentadas. O uso de polímeros escova combinados com nanopartículas foi estudado para demonstrar sua aplicação como plataforma para biosensor – utilizando glicose oxidase como enzima modelo. O biosensor demonstrou sensibilidade a variação de pH, e foi utilizado posteriormente para controlar e/ou modular as respostas eletroquímicas da reação da glicose. Em termos de comportamento cinético, nós fomos capazes de mostrar a mudança nos parâmetros cinéticos da glicose oxidase operando na configuração “ON” e “OFF” do polímero escova. A performance do bioeletrodo foi estudada por técnicas de cronoamperometria, impedância eletroquímica e voltametria cíclica. Em condições experimentais otimizadas, o range de concentração dinâmica foi de 2 a 16 mmol·L⁻¹ com limite de detecção de 5,6x10⁻⁶. A repetibilidade para diversas injeções de glicose a 5 mmol·L⁻¹ foi de 5,3 % (n=10). O biosensor resultante parece fornecer a enzima um nanoambiente biocompatível uma vez que a atividade da enzima é melhorada por um longo período de tempo, promovendo boa transferência de elétrons através do polímero até a superfície do eletrodo.

Abstract: The construction and characterization of a biosensor based on polymer brushes is reported. The use of polymer brushes combined with nanoparticles was applied to show its suitability as a biosensor platform – with glucose oxidase as an enzyme probe. The biosensor demonstrated a pH-sensitive on-off property, and it was further used to control or modulate the electrochemical responses. In terms of the kinetic behavior, we were able to show the changing in the kinetic parameters of glucose oxidase operating in “on” and “off” state of the polymer brushes. The performance of the bioelectrode was investigated by chronoamperometry, impedance electrochemistry and cyclic voltammetric techniques. At optimized experimental conditions the dynamic concentration range was 2.0 to 16.0 mmolL⁻¹ with a detection limit of 5.6x10⁻⁶ molL⁻¹. The repeatability of current responses for injections of 5.0 mmolL⁻¹ glucose was evaluated to be 5.3% (n=10). The resulting biosensor seemed to provide the enzymes with a biocompatible nanoenvironment as it

sustained the enhanced enzyme activity for an extended time and promoted possible good electron transfer through the polymer brushes to the electrode.

3- Título/Ano: Electrochemically Stimulated DNA Release from a Polymer-Brush Modified Electrode (2015)

Revista: Electroanalysis, 27. DOI: 10.1002/elan.201500252 (in press)

Resumo: Moléculas de ss-DNA foram depositadas nas escovas de poly(2-vinylpyridine) (P2VP) / polyacrylic acid (PAA) covalentemente ligadas na superfície do eletrodo de óxido de índio (ITO). A deposição de DNA foi feita em pH 3 quando a superfície do eletrodo está positivamente protonada devido a protonação do grupo piridina no P2VP, resultando assim, na interação eletrostática do DNA carregado negativamente e a superfície do polímero. Aplicando-se eletrólise a -1V (vs. Referência Ag|AgCl) a redução do oxigênio resulta no consumo de íons hidrogênio causando aumento de pH nas proximidades da superfície do eletrodo. O processo resultou no pH local de 7,5 (calculado), o qual levou a mistura de polímero a seu estado negativamente carregado devido a dissociação dos grupos carboxílicos do PAA. Isto resultou na repulsão eletrostática e liberação do DNA. O processo desenvolvido permite a deposição e liberação cíclica das moléculas de DNA com significativo aumento na quantidade de DNA liberado em comparação com sistemas previamente reportados. Opções de melhoramento do sistema são discutidas.

Abstract: Single-stranded DNA molecules were loaded on the mixed poly(2-vinylpyridine) (P2VP) / polyacrylic acid (PAA) brush covalently attached to an indium tin oxide (ITO) electrode. The DNA deposition was performed at pH 3.0 when the polymer brush is positively charged due to protonation of pyridine groups in P2VP, thus resulting in electrostatic binding of the negatively charged DNA. By applying electrolysis at -1.0 V (vs. Ag/AgCl reference) oxygen reduction resulted in the consumption of hydrogen ions and local pH increase in the vicinity of the electrode surface. The process resulted in the local pH ca. 7.5 which yielded the negative state of the mixed polymer-brush due to dissociation of carboxylic groups of PAA. This resulted in the electrostatic repulsion and release of the loaded DNA. The developed approach allows cyclic load-release of the DNA with the significantly increased amount of the released DNA comparing with previously reported systems. Further options for the improvements of the system are discussed.

4- Título/Ano: Effects of Protein A in Detection of Canine Distemper Virus through immunosensor construction (2015)

Revista: IEEE Sensors Journal, DOI: 10.1109/JSEN.2015.2426421 (in press)

Resumo: Nós desenvolvemos um sistema de detecção para o vírus da cinomose canina (CDV) empregando ressonância plasmônica de superfície (SPR) e comparando-se os efeitos da imobilização orientada e randômica. Vários parâmetros tais como concentração superficial dos anticorpos imobilizados foram otimizados. A capacidade máxima de antígeno ligado foi obtida por meio do sensor SPR via proteína A, a leva a uma orientação “end-on”. Concentração de CDV a 0,1ng/mL pode ser detectada utilizando-se proteína A. A análise de urinas mostrou que todas as amostras continham níveis de CDV detectáveis, mas os resultados revelaram uma melhora na sensibilidade dos ensaios quando especificamente orientados. O método descrito é simples, rápido, seletivo e sensível para o a biodetecção do elemento. Os resultados enfatizam o quão importante é a fixação de proteínas nas superfícies de tal modo que seus sítios ligantes estão orientados para a fase da solução.

Abstract: We have developed a detection system to Canine Distemper Virus (CDV) by employing surface plasmon resonance (SPR) and compared the effect of oriented and random immobilization. Several parameters such as the surface concentration of immobilized antibodies, antigen binding capacity and the maximum surface concentration of immobilized antibody were optimized. The maximal antigen binding capacity was obtained by means of a SPR-sensor immobilized via protein A, which leads to an end-on orientation. CDV at 0.1 ng/mL can be detected using protein A. Urine analysis showed that all samples contained detectable levels of CDV, but the results revealed an improvement in sensitivity of the assay when it is specifically oriented. The described method is simple, fast, selective and sensitive to the biorecognition element. The results emphasize how important it is to attach proteins on surfaces in such a way that their binding sites are oriented toward the solution phase.