

UNESP- Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Pós-graduação em Ciências e Tecnologia de Materiais – POSMAT

LEONARDO NEGRI FURINI

**FABRICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE FILMES**

***LAYER-BY-LAYER* DE DODAB/FTALOCIANINA DE NÍQUEL**

PRESIDENTE PRUDENTE

2012

LEONARDO NEGRI FURINI

**FABRICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE FILMES  
*LAYER-BY-LAYER* DE DODAB/FTALOCIANINA DE NÍQUEL**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Materiais ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, sob orientação do Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino e co-orientação do Prof. Dr. Eloi Feitosa.

PRESIDENTE PRUDENTE

2012

Furini, Leonardo Negri.

Fabricação e caracterização morfológica de filmes  
layer-by-layer de DODAB/ftalocianina de níquel /  
Leonardo Negri Furini, 2012  
89 f.

Orientador: Carlos José Leopoldo Constantino  
Coorientador: Eloi Feitosa

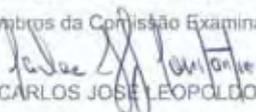
Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual  
Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia,  
Presidente Prudente, 2012

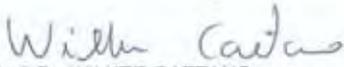
1. Filmes LbL. 2. DODAB. 3. NiTsPc. 4.  
Morfologia. I. Universidade Estadual Paulista.  
Faculdade de Ciências e Tecnologia. II. Título.

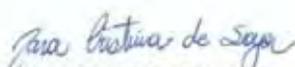
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LEONARDO NEGRI FURINI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DO(A) FACULDADE DE CIÊNCIAS DE BAURU.

Aos 13 dias do mês de agosto do ano de 2012, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro II da FCT/Unesp, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO do(a) Departamento de Física, Química e Biologia / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, Prof. Dr. WILKER CAETANO do(a) Centro de Ciências Exatas / Universidade Estadual de Maringá, Profa. Dra. NARA CRISTINA DE SOUZA do(a) Instituto de Ciências e Letras do Médio Araguaia / Universidade Federal do Mato Grosso, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de LEONARDO NEGRI FURINI, intitulado "Fabricação e Caracterização Morfológica de Filmes Layer-by-Layer de DODAB/Ftalocianina de Níquel". Após a exposição, o discente foi arguido 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. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO

  
Prof. Dr. WILKER CAETANO

  
Profa. Dra. NARA CRISTINA DE SOUZA

*Dedico este trabalho aos meus avós: vô Nico e vô Cida.*

*Desde o início não mediram esforços por mim.*

## *Agradecimentos*

---

*À minha família, meus pais Rose e Carlos, e ao meu irmão Murilo, que independente das minhas decisões estão sempre ao meu lado quando preciso. Obrigado de coração... aos meus avós, vô Nico e vó Cida, que me apóiam desde lá na graduação e não tenho dúvidas que sem vocês não estaria aqui hoje...*

*Ao meu orientador prof. Casé que depositou confiança em meu trabalho, ensinou-me muito mais do que poderia estar escrito neste trabalho, pela paciência e pela amizade sincera ao longo desses dois anos. Obrigado Casezão!!!*

*Ao prof. Eloi que gentilmente aceitou o convite para a co-orientação, disponibilizou o seu laboratório para meu trabalho e que muito contribui.*

*Aos meus amigos do grupo “NOIX”, em especial, Diogão, Pedrera e a Priscila que me ajudaram no “B a Bá” de um laboratório de filmes finos, Alvarito, João, Magno, Gabriel, Aislan, Rafael, Vini Lopes, Andressa, Vinicius. Com este grupo pude dividir bons momentos em churrascos, cafés, futebol, convivência diária....*

*Aos professores Milton H., Clarissa, Neri, Carlos Tello, Moacir que sempre tive uma boa relação...*

*Aos meus amigos do DFQB, Edilene com quem tenho uma amizade desde os bons velhos tempos de UFMS..., e aos novos Malu, Lao, Gustavo (pingado), Rafael (catarro), Sabrina, Eliara, Tamiris, Ana (tem me ajudado nos PCAs da vida)..... entre outros igualmente importantes que estamos todos os dias juntos...*

*Aos meus tios: tia Vera e tio Lu, que me acolheram durante os tempos de estudos na UFMS...*

*À pessoa que faz a minha vida mais feliz: Fer. “Ainda que eu falasse a língua dos anjos sem o seu amor eu nada seria...”*

*À CAPES, CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro.*

*"Se fiz descobertas de grande valor,  
foi mais por ter paciência do  
que qualquer outro talento."*

*Isaac Newton*

## *Resumo*

---

Filmes *Layer-by-Layer* (LbL) têm sido empregados como elementos transdutores em unidades sensoriais ou como matriz para imobilização de biomoléculas em biossensores. Neste trabalho de mestrado, filmes nanoestruturados de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) e ftalocianina tetrassulfonada de níquel (NiTsPc) foram fabricados via técnica LbL com o objetivo de obter um efeito sinérgico entre as distintas propriedades de ambos os materiais. O DODAB é um lipídio catiônico sintético e quando disperso em água, sob certas condições, forma estruturas de bicamadas (vesículas) e pode ser usado como modelo simples para mimetizar membranas celulares. A NiTsPc é um semiconductor orgânico, aniônico e solúvel em água. Inicialmente foi investigada por calorimetria exploratória diferencial (DSC) a estabilidade das vesículas de DODAB em meio aquoso (dispersão) na presença e na ausência de NiTsPc, constatando que concentrações superiores a 0,2 mmol/L de NiTsPc é capaz de impedir a formação de vesículas. Visando a fabricação dos filmes LbL, o tempo de imersão de um substrato sólido para a adsorção da primeira camada de DODAB foi determinado, assim como o efeito da limpeza do substrato foi investigado. O crescimento dos filmes LbL foi monitorado via espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis) e revelou um crescimento linear. A morfologia foi estudada via micro-Raman e microscopia de força atômica (AFM), mostrando a presença ou não de vesículas de DODAB dependendo da concentração da solução de NiTsPc utilizada no crescimento do filme LbL, em acordo com os resultados de DSC. Uma interação eletrostática entre os grupos polares do DODAB e da NiTsPc foi identificada via espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), sendo a principal força responsável pelo crescimento dos filmes. Como prova de princípio, uma língua eletrônica composta por cinco unidades sensoriais foi testada na detecção de dopamina em soluções aquosas de até  $10^{-6}$  mol/L via espectroscopia de impedância. As unidades sensoriais foram compostas por eletrodos interdigitados de platina recobertos com filmes LbL. As distintas arquiteturas permitiram inferir sobre o papel desempenhado pelo DODAB e pela concentração de NiTsPc na detecção da dopamina. Esta avaliação foi feita considerando análise de componentes principais (PCA) e circuito elétrico equivalente.

**Palavras-chave:** filmes LbL. DODAB. NiTsPc. Morfologia.

## *Abstract*

---

Layer-by-Layer (LbL) films have been applied as transducer or as matrix to immobilize biomolecules in sensors and biosensors, respectively. Here, nanostructured films of dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) and nickel tetrasulfonated phthalocyanine (NiTsPc) were layer-by-layer assembled aiming to achieve a synergistic effect considering the distinct properties of both materials. DODAB is a cationic synthetic lipid, which assembles in water as bilayer structures (vesicles) and can be used as models to mimic cell membranes. NiTsPc is an anionic organic and water soluble semiconductor. Prior to LbL growth, the structure of DODAB vesicles in the absence and presence of NiTsPc aqueous solution was investigated by differential scanning calorimetric (DSC), whereas concentrations greater than 0.2 mmol/L NiTsPc is able to avoid the formation of vesicles. The immersed time necessary to form the first layer of DODAB onto a solid substrate and the effect of cleaning the substrate were investigated. The LbL film growth was monitored using ultraviolet-visible (UV-Vis) absorption spectroscopy, revealing a linear growth. The morphology was studied at via micro-Raman and atomic force microscopy (AFM), revealing the presence of DODAB vesicles depending on the NiTsPc concentration, which is in agreement with DSC data. An electrostatic interaction between the polar groups of DODAB and NiTsPc was identified via Fourier transform infrared absorption spectroscopy (FTIR), being the main driving force responsible for the LbL growth. As proof-of-principle, an electronic tongue composed by five sensing units was tested toward dopamine detection down to  $10^{-6}$  mol/L by impedance spectroscopy. The sensing units were composed by platinum interdigitated electrodes coated with LbL films in five different architectures, which allowed one to infer about the role played by DODAB and NiTsPc concentration in the dopamine detection performance. This evaluation was carried out considering Principal Component Analysis (PCA) and equivalent electric circuit.

**Keywords:** LbL films. DODAB. NiTsPc. Morphology.

## *Lista de siglas*

---

*ac* - corrente alternada

AFM - microscopia de força atômica

CuTsPc - ftalocianina tetrassulfonada de cobre

DDAB - brometo de didodecildimetilamônio

DNA - ácido desoxirribonucléico

DODAB - brometo de dioctadecildimetilamônio

DODAC - cloreto de dioctadecildimetilamônio

DPPG - dipalmitoilfosfatidilglicerol

DSC - calorimetria exploratória diferencial

FeTsPc - ftalocianina tetrassulfonada de ferro

FTIR - infravermelho por transformada de Fourier

ITO - óxido de índio-estanho

LB - *Langmuir-Blodgett*

LbL - *Layer-by-Layer*

MPc - ftalocianina metálica

NiTsPc - ftalocianina tetrassulfonada de níquel

PAH - poli(alilamina hidroclorada)

PAMAN - poliamidoamina

PANI - polianilina

PCA - análise de componentes principais

PDAD - poli(dialildimetilamônio)

POMA - poli(o-metoxianilina)

PSS - poli(estirenosulfonatado)

PTAA - poli(tiofeno-3-ácido acético)

PVD - deposição por vaporização física

PVS - poli(sulfonato de vinil)

RMS - raiz quadrática média

RRS - espalhamento Raman ressonante

UV-Vis - ultravioleta-visível

<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>13</b>
<b>CONCEITOS TEÓRICOS .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 FTALOCIANINA TETRASSULFONADA DE NÍQUEL .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 BROMETO DE DIOCTADECILDIMETILAMÔNIO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 FILMES <i>LAYER-BY-LAYER</i> .....</b>	<b>17</b>
<b>1.4 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL .....</b>	<b>19</b>
<b>1.5 ESPECTROSCOPIA ÓPTICA DE ABSORÇÃO ELETRÔNICA .....</b>	<b>20</b>
<b>1.6 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL: ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO .....</b>	<b>22</b>
<b>1.7 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL: ESPALHAMENTO RAMAN .....</b>	<b>24</b>
<b>1.8 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....</b>	<b>26</b>
<b>1.9 MEDIDAS ELÉTRICAS.....</b>	<b>27</b>
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>30</b>
<b>PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1 PREPARO DAS DISPERSÕES DE DODAB E SOLUÇÕES DE NiTsPC .....</b>	<b>30</b>
<b>2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS DISPERSÕES DE DODAB .....</b>	<b>30</b>
<b>2.3 LIMPEZA DOS SUBSTRATOS.....</b>	<b>31</b>
<b>2.4 PREPARAÇÃO DOS FILMES LbL DE DODAB/NiTsPC.....</b>	<b>31</b>
<b>2.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES LbL DE DODAB/NiTsPC .....</b>	<b>34</b>
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>37</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 FORMAÇÃO DE VESÍCULAS DE DODAB NA PRESENÇA DE NiTsPC.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2 ADSORÇÃO DA PRIMEIRA CAMADA DE DODAB .....</b>	<b>44</b>
<b>3.3 EFEITO DA LIMPEZA DO SUBSTRATO.....</b>	<b>47</b>
<b>3.4 CRESCIMENTO DO FILME LbL DE DODAB/NiTsPC .....</b>	<b>49</b>
<b>3.5 MORFOLOGIA DO FILME LbL DE DODAB/NiTsPC .....</b>	<b>52</b>
<b>3.6 INTERAÇÃO MOLECULAR DODAB/NiTsPC .....</b>	<b>58</b>
<b>3.7 APLICAÇÃO SENSORIAL .....</b>	<b>62</b>
<b>3.7.1 Eletrodos interdigitados sem recobrimento de PAH/PSS .....</b>	<b>63</b>
<b>3.7.2 Eletrodos interdigitados com prévio recobrimento de PAH/PSS .....</b>	<b>67</b>
<b>3.7.3 Língua eletrônica .....</b>	<b>70</b>
<b>CAPÍTULO IV .....</b>	<b>79</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>79</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>82</b>

## *Apresentação*

---

A procura por materiais com propriedades distintas tem levado à pesquisa de compostos orgânicos aplicados em dispositivos ópticos e eletrônicos, como diodos, transistores, células solares, sensores, entre outros, cujos elementos transdutores são processados na forma de filmes finos. Dentre as técnicas que possibilitam o crescimento de filmes finos destaca-se a técnica *Layer-by-Layer* (LbL), a qual permite o controle da espessura do filme e sua arquitetura molecular, além de ser uma técnica simples e eficiente, permitindo a utilização de uma grande variedade de materiais, com destaque para os orgânicos. Desse modo, foram escolhidos dois materiais, um semicondutor orgânico, ftalocianina de níquel (NiTsPc), e um lipídio, brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB), para o desenvolvimento deste trabalho em nível de mestrado. O objetivo principal foi investigar a possibilidade de crescimento de filmes LbL visando a aplicação futura como elemento transdutor em unidades sensoriais e/ou como matriz para a imobilização de biomoléculas em biossensores, procurando assim combinar as distintas propriedades destes materiais.

As ftalocianinas metálicas são aplicadas em sensores diversos, principalmente eletroquímicos por suas propriedades de oxi-redução e transporte de carga, e ópticos por possuírem forte absorção na região do espectro visível. Já os lipídios são aplicados como sistemas simples para mimetizar a parede da membrana celular a partir da formação de mono ou bicamadas, permitindo-se assim investigar a interação destas camadas com moléculas diversas. Visando a aplicação sensorial, esta afinidade com determinadas moléculas é um fator que contribui para a detecção. Além disso, os lipídios têm se mostrado um meio mais adequado para a imobilização de biomoléculas (enzimas, proteínas, DNA, etc) em aplicações envolvendo biossensores.

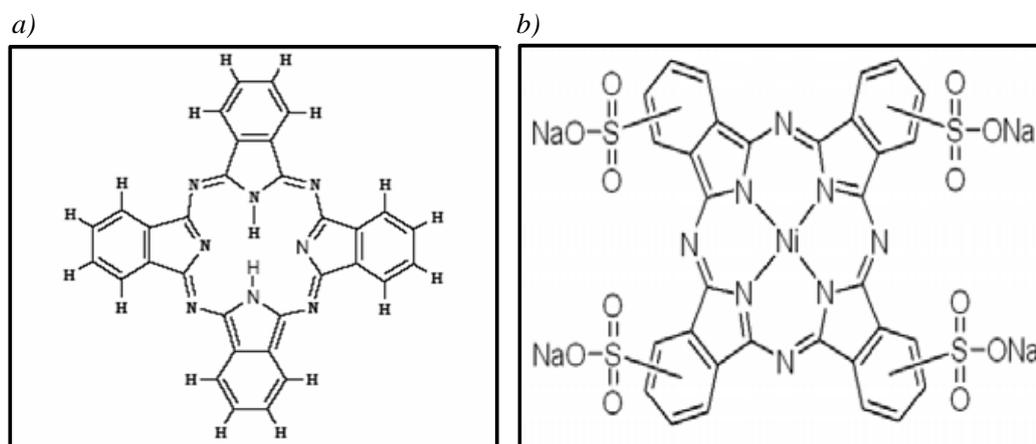
Neste trabalho, inicialmente foi realizado um estudo via calorimetria exploratória diferencial (DSC) para avaliar a interação entre a DODAB e a NiTsPc dispersos em água a fim de estudar o comportamento do DODAB na presença da NiTsPc e assim determinar quais as concentrações a serem utilizadas no crescimento dos filmes LbL de DODAB/NiTsPc. Desse estudo foram definidas duas concentrações de NiTsPc (0,05 e 0,5 mmol/L) que juntamente com uma concentração de DODAB (1,0 mmol/L) foram utilizadas para crescer os filmes LbL de DODAB/NiTsPc. Os filmes LbL foram caracterizados por diferentes técnicas tais como: espectroscopia eletrônica com absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis); espectroscopia vibracional por espalhamento micro-Raman e absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR); microscopias óptica e de força atômica (AFM).

Finalmente, visando contribuir para a área de sensores e biossensores, foi utilizada uma língua eletrônica composta por cinco unidades sensoriais para investigar via espectroscopia de impedância a relevância do sistema DODAB/NiTsPc em comparação com sistemas contendo poli(alilamina hidrocloreada) (PAH) e ftalocianina tetrassulfonada de cobre (CuTsPc). Para isto, como analito foi utilizada dopamina em soluções aquosas com diferentes concentrações, principalmente pela disponibilidade de vasta informação na literatura, o que facilita estabelecer comparações. Os resultados de impedância foram analisados por técnicas diversas, como análise da componente principal (PCA), técnicas de projeção e circuito elétrico equivalente.

A dissertação está dividida em 4 capítulos, sendo o capítulo I uma breve introdução da motivação do trabalho e os conceitos teóricos das técnicas de fabricação e caracterização dos filmes LbL. O capítulo II traz o procedimento experimental enquanto o capítulo III mostra os resultados e discussões. A conclusão está no capítulo IV, o qual contém ainda as perspectivas futuras deste trabalho.

### 1.1 Ftalocianina tetrassulfonada de níquel

As ftalocianinas são compostos macrocíclicos altamente conjugados, constituídos por quatro unidades isoindol ligadas por nitrogênios em aza como mostra a figura 1a. Têm como características gerais uma estrutura molecular plana, centrossimétrica, fórmula geral  $C_{32}H_{16}N_8$  e são polimórficas [KEMPA, 1988]. A descoberta das ftalocianinas ocorreu acidentalmente em 1907 por Braun e Tcherniac, sendo um subproduto da síntese da *o*-cianobenzamida [BRAUN, 1907]. A palavra ftalocianina (do grego ftalo = óleo de rocha, cianina = azul) foi utilizada pela primeira vez por Linstead e colaboradores em 1933 para descrever uma nova classe de compostos orgânicos. Na década de 30, Linstead e Robterson determinaram as estruturas das ftalocianinas (Pc) de base livre (figura 1a) [LINSTEAD, 1936].



**Figura 1:** a) ftalocianina de base livre; b) ftalocianina tetrassulfonada de níquel.

A substituição dos átomos centrais de hidrogênio da ftalocianina por um átomo metálico leva às chamadas ftalocianinas metálicas (MPc). Existe uma grande variedade de ftalocianinas metálicas [GUILLAUD, 1998]. As MPcs destacam-se por diversas propriedades tecnologicamente atraentes, tais como elevada estabilidade térmica e química [LEZNOFF, 1989], fotocondutividade [TKACHENKO, 2010], semicondutividade [CAI, 2009], atividade

fotoquímica [KE, 2009], luminescência [PELTEKIS, 2008], óptica não-linear [DE BONI, 2008]. As pesquisas visando à utilização de ftalocianinas em aplicações tecnológicas na forma de filmes finos representam uma parcela importante na área dos semicondutores orgânicos, já que uma gama importante das aplicações envolvendo dispositivos orgânicos utiliza o elemento transdutor na forma de filmes finos. Tais aplicações envolvem dispositivos como diodos emissores de luz [CHENG, 2009], transistores [YE, 2009], células solares [BENTEN, 2009], cristais líquidos [ATILLA, 2009], células combustíveis [FENG, 2008], sensores [SIZUN, 2011] [BOHRER, 2009] [AOKI, 2009] e terapia fotodinâmica [ROMERO, 2011].

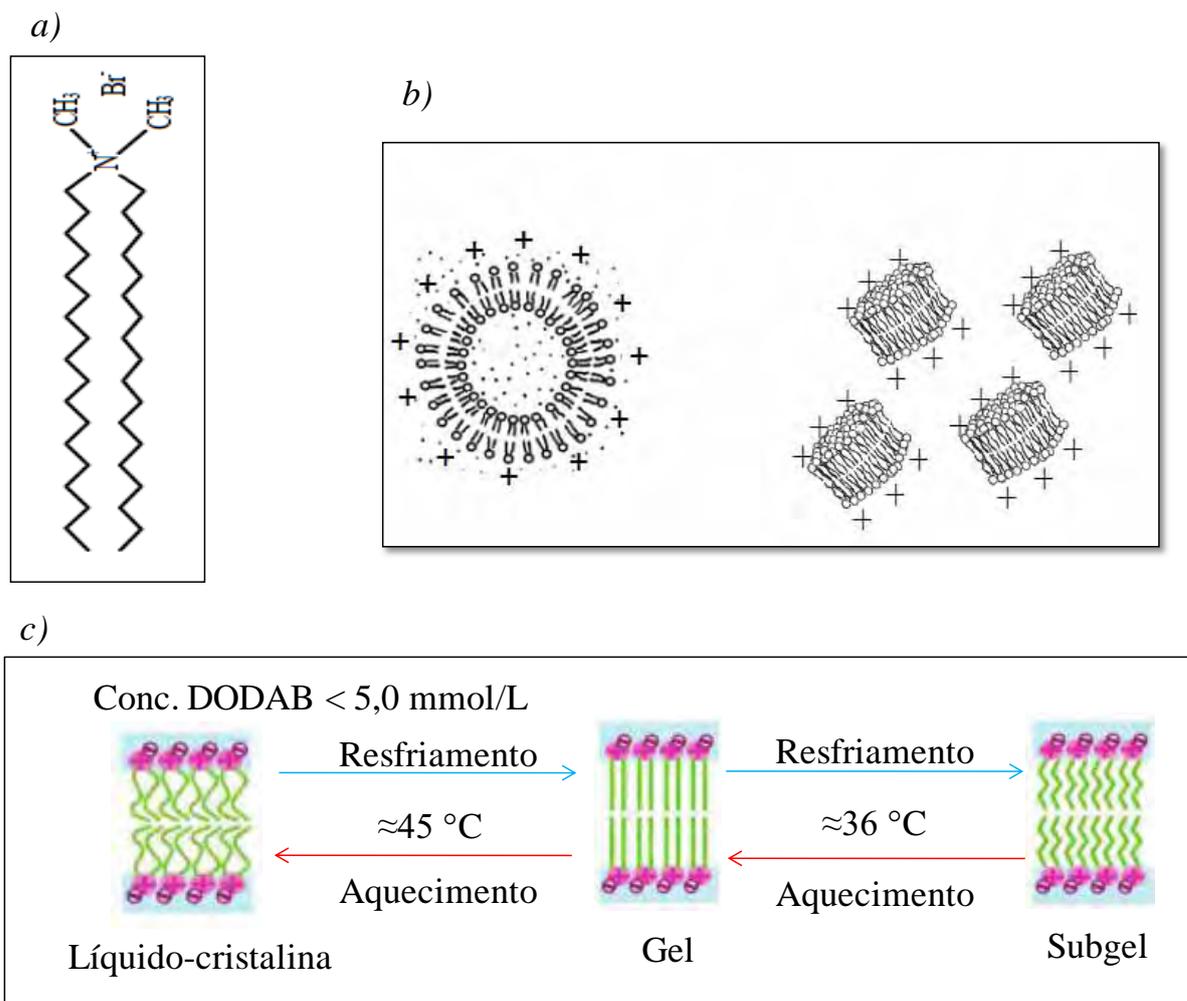
De modo geral, as ftalocianinas são de difícil solubilidade em solventes orgânicos convencionais. Porém, esta propriedade pode ser melhorada com a introdução, durante a síntese, de grupos ligantes nos anéis periféricos da molécula [EBERHARDT, 1997], por exemplo, neste trabalho foi utilizada ftalocianina com quatro grupos sulfônicos ligados aos anéis externos da molécula figura 1b [LEZNOFF, 1989]. Além da possibilidade das ftalocianinas serem quimicamente modificadas, outra vantagem deve-se também a sua capacidade de formar filmes finos por diferentes técnicas como LbL [ZUCOLOTTO, 2006], Langmuir-Blodgett (LB) [GAFFO, 2004], deposição por vaporização física (PVD) [GOBERNADOMITRE, 1995], *spin-coating* [SHEN, 2010] ou eletrodeposição [MARTÍN, 2010]. Além de suas já bem estabelecidas aplicações comerciais como pigmentos para a indústria têxtil, de plásticos, couros e tintas esferográficas.

A ftalocianina tetrassulfonada de níquel (NiTsPc), em particular, tem sido usada no crescimento de filmes LbL pela sua densidade de carga negativa juntamente com outros materiais, como polianilina [ZUCOLOTTO, 2006], nanotubos de carbono [SIQUEIRA, 2008], poli(alilamina hidrocloreada) e nanopartículas de Au [ALENCAR, 2009]. Estes filmes formam camadas ativas sobre eletrodos empregados na detecção de substâncias específicas. Em especial, destaca-se o trabalho reportado por Siqueira *et al.* [SIQUEIRA, 2007] sobre o

crescimento de filmes LbL contendo NiTsPc e um dendrímero (poliamidoamina) contendo nanopartículas de platina (PAMAN-Pt) como espécies ativas na detecção de dopamina via eletroquímica. Mais recentemente, o trabalho de Zampa *et al.* [ZAMPA, 2009] mostrou filmes LbL crescidos com NiTsPc e um peptídeo antimicrobial, este último como camada ativa usada para detecção de células de um protozoário (leishmania) via eletroquímica.

## 1.2 Brometo de dioctadecildimetilamônio

O DODAB (brometo de dioctadecildimetilamônio) é um lípido catiônico derivado da amônia quaternária, praticamente insolúvel em água à temperatura ambiente. Sua estrutura molecular pode ser dividida em duas partes: uma cabeça polar composta pelo grupo  $N(CH_3)_2^+$  e duas cadeias apolares composta de hidrocarbonetos [WU, 2009], conforme mostrado na figura 2a. Por sua característica anfifílica, quando disperso em água, o DODAB organiza-se em micelas, vesículas ou disco (figura 2b). Quando puro tem sido estudado em vários aspectos como métodos de preparação de vesículas, seja por sonificação [BRITO, 2005], extrusão [FEITOSA, 2000] ou simples diluição de DODAB em água, mediante aquecimento [FEITOSA, 2006], comportamento termotrópico (movimentação ou curvatura involuntária causada pela temperatura) das cadeias [SAVEYN, 2009] [FEITOSA, 2010] e caracterização das vesículas (uni ou multilamelares, multiestruturais) [BENATTI, 2001], [JUNG, 2000]. Além da conformação estrutural adquirida ao ser disperso em água (micelas, vesículas ou disco), o estado das cadeias também tem sido amplamente estudado frente à variação de temperatura e concentração, sendo observadas diferentes estados como subgel, gel e líquido-cristalina (figura 2c) [JUNG, 2000]. Estes estados caracterizam-se basicamente pela rigidez das cadeias apolares e cabeça polar do DODAB, sendo susceptíveis à variação de temperatura, concentração e hidratação das lamelas.



**Figura 2:** a) estrutura molecular do DODAB; b) estruturação do DODAB em bicamadas fechadas (à esquerda) e bicamadas abertas (à direita) [ISRAELACHVILI, 1992]; c) diagrama esquemático dos estados físicos de DODAB, adaptado de [WU, 2011].

O estudo da estruturação do DODAB e os estados do DODAB também foram feitos quando este é misturado a outras moléculas. Essas moléculas podem ser lipídios homólogos (mesma fórmula, porém com diferente número de  $\text{CH}_2$  na cadeia alifática), como o DDAB (brometo de didodecildimetilamônio) [FEITOSA, 2006], que possui cadeia hidrofóbica menor que o DODAB com 12 carbonos, ou apenas mudar de contração como o DODAC (cloreto de dioctadecildimetilamônio) [FEITOSA, 2008], [FEITOSA 2009], cuja única diferença em relação ao DODAB é a substituição do átomo de bromo pelo de cloro. Os estudos das misturas também são feitos com fosfolipídios [SOBRAL, 2008], outros surfactantes

[COPPOCK, 2009], colesterol [BENATTI, 2007], DNA [KIKUCHI, 2000], proteínas [CARVALHO, 1998], polieletrólitos [MELO, 2010], partículas poliméricas e látex [CORREIA, 2004].

Lipídios de forma geral têm sido empregados como modelos miméticos de biomembranas em diversos estudos via monocamadas de Langmuir [PEREZ-LOPEZ, 2009] [CASELI, 2008], filmes Langmuir-Blodgett (LB) [CASELI, 2008] [AOKI, 2008] e filmes LbL [MORAES, 2008] [AOKI, 2010 (b)]. Desta forma, podem-se incorporar substâncias de interesse, cuja interação com a membrana celular faz-se necessária conhecer, simulando de maneira aproximada os sistemas simples da membrana biológica. Devido à sua estruturação na forma de vesículas com bicamadas, o DODAB também pode ser utilizado como sistema modelo de biomembranas [LASIC, 1998] [CARMONA-RIBEIRO, 1992] em estudos da interação com moléculas de atividade biológica, como proteínas, DNA, enzimas ou fármacos, além de servir como carregadores de drogas e vacinas [KUO, 2011] [BARBASSA, 2011].

### **1.3 Filmes *Layer-by-Layer***

Filmes finos a partir de camadas alternadas de distintos materiais foram propostos inicialmente por R. Iler em 1966 que trabalhou com partículas coloidais carregadas positiva e negativamente [ILER, 1966]. Posteriormente, L. Netzer e J. Sagiv, trabalhando com surfactantes funcionalizados, desenvolveram uma metodologia baseada na adsorção de uma camada, que através de uma ativação química permite a adsorção de uma nova camada, possibilitando a fabricação de filmes finos multicamadas por meio de interações químicas, geralmente ligações covalentes [NETZER, 1983] [NETZER, 1983]. Na década de 1990, G. Decher *et al.* estenderam a fabricação de filmes finos com multicamadas a partir de polieletrólitos em que a adsorção ocorre via interações eletrostáticas de polieletrólitos catiônicos e aniônicos depositados de forma alternada sobre um substrato sólido com

superfície modificada via tratamento químico [DECHER, 1992]. Esta metodologia foi estendida pelo grupo de pesquisa do professor M. Rubner por M. Ferreira para polímeros conjugados [FERREIRA, 1994] e por J. Cheung para polímeros condutores [CHEUNG, 1994].

O método para crescer filmes finos com multicamadas a partir da deposição alternada de monocamadas é comumente denominado LbL, ou automontagem ou *self-assembly*. Esta técnica apresenta vantagens consideráveis relacionadas a custos operacionais, tempo e eficiência, além de oferecer também grande controle na arquitetura molecular dos filmes fabricados. Há diversos mecanismos de adsorção responsáveis pelo crescimento dos filmes LbL, entre eles podemos citar a força iônica, ligação de hidrogênio, ~~força de~~ interações de Van der Waals, entres outras [OLIVEIRA, 2002]. Dessas, a mais comum é a força iônica originada por interações eletrostáticas [RAPOSO, 1998] [DECHER, 1992]. Geralmente, os filmes são crescidos na forma de bicamadas a partir da imersão do substrato em soluções aquosas de dois materiais distintos [PATERNO, 2001], geralmente carregados com cargas opostas que propiciam o crescimento do filme LbL por interações eletrostáticas em meio aquoso [YANG, 2009]. Pode-se destacar também o crescimento de filmes LbL em meio não-aquoso, com FePc dissolvida em clorofórmio e PAH em água ultrapura [ALESSIO, 2010].

Um procedimento alternativo para o crescimento de filmes LbL de poli(dialildimetilamônio), PDAD, com poli(estirenosulfonatado), PSS, com a utilização de um borrifador, na qual os materiais são pulverizados, é proposto por Schlenoff *et al.* [SCHLENOFF, 2000] em 2000. Esta técnica tem sido denominada *spray-LbL* [KROGMAN, 2007] [FUKAO, 2011] e consiste em pulverizar, de forma alternada, os materiais (geralmente polieletrólitos) na superfície de um substrato promovendo o crescimento de filmes LbL. Izquierdo *et al.* [IZQUIERDO, 2005] compararam o crescimento de filmes via *spray-LbL* e LbL convencional de PSS/PAH concluindo que a deposição via

*spray*-LbL é fácil e confiável, além de ser mais rápida. Os primeiros experimentos foram realizados com polieletrólitos e recentemente estendido a outras classes de materiais como mencionado por Aoki *et al.* [AOKI, 2012]. No caso específico deste trabalho de Aoki *et al.* [AOKI, 2012] foi comparada a morfologia de filmes LbL PAH/DPPG (dipalmitoilfosfatidilglicerol) fabricados por duas técnicas: LbL convencional e *spray*-LbL e conclui-se que a morfologia e espessura do filme é dependente da técnica utilizada.

#### 1.4 Calorimetria exploratória diferencial

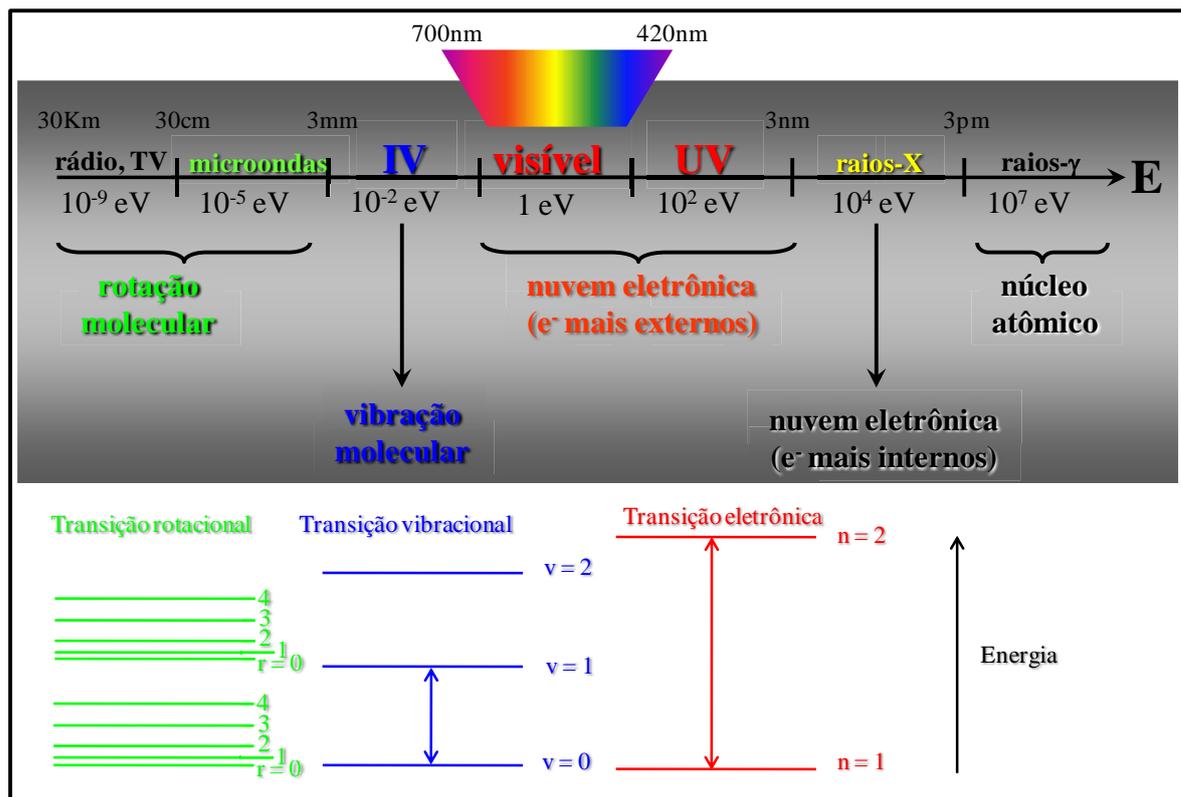
Nas medidas de DSC a amostra e uma referência são submetidas a um aquecimento ou resfriamento mediante uma taxa constante de transferência de calor [IONASHIRO, 1980]. O DSC mede a variação de entalpia (calor) fornecida à amostra e à referência mediante variação de temperatura. Com isso pode-se determinar a capacidade calorífica, à pressão constante, da amostra através da equação 01:

$$C_p = \left( \frac{\partial H}{\partial T} \right)_p \quad (01)$$

onde H (entalpia) corresponde ao calor transferido para a amostra à pressão constante, T é a temperatura da amostra. A capacidade calorífica está relacionada com o calor específico que mede quanto de calor deve ser fornecida a uma amostra para que 1 grama dela aumente 1° C. A água utilizada como referência neste trabalho possui calor específico igual a 1 cal/(g.°C), no SI. As transições de fase da amostra são acompanhadas por alterações na temperatura da amostra, pois uma reestruturação requer a absorção ou liberação de calor. Essas transições podem ser endotérmicas ou exotérmicas, com absorção ou emissão de calor respectivamente [BERNAL, 2002].

## 1.5 Espectroscopia óptica de absorção eletrônica

A espectroscopia óptica estuda a interação entre a radiação eletromagnética e a matéria [SKOOG, 2002]. As moléculas possuem estados energéticos bem definidos e as transições entre esses estados envolvem perda (emissão) ou ganho (absorção) de energia. Desse modo, é possível estudar essas transições de estados energéticos cedendo energia para as moléculas na forma de radiação eletromagnética, ou seja, a luz. Dependendo da frequência e, conseqüente, energia da radiação incidente, é possível observar diferentes fenômenos decorrentes das transições entre estados energéticos das moléculas. Por exemplo, podemos considerar a energia de uma molécula como constituída de três partes principais: eletrônica, vibracional e rotacional [EISBERG, 1974]. Desse modo, o espectro relacionado a esses estados energéticos da molécula pode ser dividido em três regiões espectrais distintas. No infravermelho longínquo observamos espectros de rotação, correspondentes as radiações emitidas em transições entre estados de rotação, tais energias são da ordem de  $10^{-5}$  eV [SKOOG, 2002]. No infravermelho próximo, observamos espectros de rotação-vibração, correspondentes às transições entre estados vibracionais, que também podem comportar alguns estados rotacionais, com energias da ordem  $10^{-2}$  eV [SKOOG, 2002]. Na região do visível e ultravioleta observam-se espectros eletrônicos, referentes às transições eletrônicas, sendo estas energias da ordem de 1 eV [EISBERG, 1974], as regiões podem ser observadas na figura 3. Na faixa de frequência correspondente ao UV-Vis), estaremos observando transições eletrônicas.



**Figura 3:** espectro eletromagnético com o comprimento de onda e a energia por fóton associado à transição correspondente apresentada no diagrama.

Na espectroscopia óptica de absorção no UV-Vis a frequência da radiação absorvida é uma medida da energia necessária para que ocorra a transição eletrônica, já a intensidade é dependente da probabilidade de ocorrer a transição. Geralmente, quando uma molécula absorve a radiação eletromagnética incidente, ela vai para um estado excitado e ao retornar para o estado fundamental, ela o faz emitindo calor. Algumas moléculas têm a capacidade de absorver a radiação e, ao emitir (relaxação), parte é em forma de calor e parte em forma de radiação, conhecida como fluorescência [SKOOG, 2002].

O mecanismo de espectroscopia de absorção molecular é baseado em medidas de absorbância (A) ou transmitância (T). Neste trabalho foi utilizado medidas exclusivamente de absorbância. Segue a equação 02:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc \quad (02)$$

$I_0$  é a intensidade radiante incidente,  $I$  é a intensidade radiante transmitida através da amostra,  $b$  é o caminho óptico da amostra e  $c$  é a concentração e  $\epsilon$  é a absorvidade molar. A equação 02 representa a Lei de Beer [SKOOG, 2002]. Nota-se que a absorbância é diretamente proporcional ao caminho óptico. Uma limitação da Lei é com relação à concentração do material que absorve, sendo usada somente para baixas concentrações moleculares em torno de 0,01 mol/L [SKOOG, 2002].

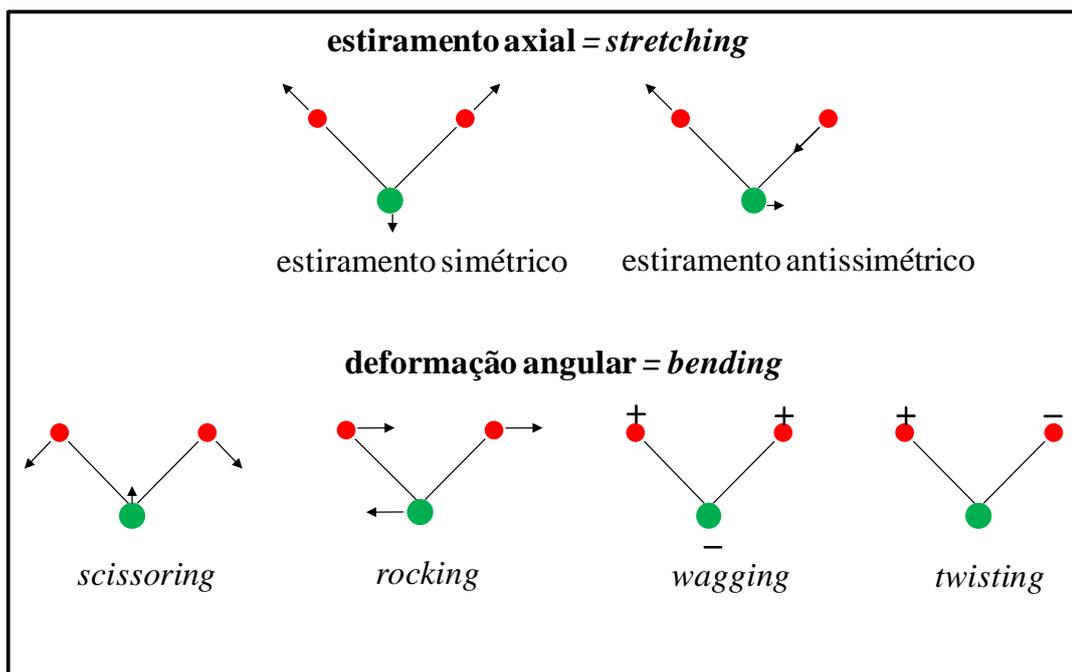
### **1.6 Espectroscopia vibracional: absorção no infravermelho**

Quando a luz que incide na molécula está na região do infravermelho e possui exatamente a mesma diferença de energia entre dois estados vibracionais da molécula, esta pode absorver energia e mudar seu estado energético vibracional. A frequência da radiação absorvida é a mesma da vibração molecular. Para que ocorra absorção são necessários alguns fenômenos tais como: (1) a frequência da radiação tem que ser a mesma da vibração molecular; (2) a molécula deve sofrer uma variação no momento de dipolo; (3) devem obedecer a uma regra de seleção [SALA, 1996]. A primeira condição é satisfeita quando trabalhamos com radiação no infravermelho que quando absorvida pela molécula é suficiente apenas para gerar pequenas diferenças de energia entre diversos estados energéticos vibracionais. A segunda condição ocorre quando a distribuição de carga ao longo de uma molécula não é simétrica, ou seja, quando as moléculas são heteronucleares. A terceira é satisfeita quando o número quântico vibracional varia de uma unidade [SALA, 1996]

Uma molécula que possui  $N$  átomos em um sistema de coordenadas tridimensional tem  $3N$  graus de liberdade. Porém, são excluídos 3 graus de liberdade referentes à translação da molécula através do espaço e 3 devido a rotação da molécula como um todo. Desse modo, uma molécula possui  $3N-6$  graus de liberdade remanescentes que envolvem movimento interatômicos e, portanto, representam o número de vibrações possíveis da molécula. Para

uma molécula linear há  $3N-5$  graus de liberdade, pois a rotação em torno do eixo da ligação não é mensurada e dois graus de liberdade são suficientes para descrever o movimento rotacional [AROCA, 2006]. Alguns fatores tendem a produzir um número menor de bandas experimentais que seriam esperadas, como a simetria das moléculas em que nenhuma variação no momento de dipolo resulta em uma vibração particular, energias de duas ou mais vibrações idênticas, intensidade baixa de absorção. Ocasionalmente pode ocorrer um número maior de bandas que o esperado, com as bandas de sobretom (duas ou três vezes a frequência da vibração fundamental), e bandas de combinação, quando um *quantum* de energia é absorvido por duas vibrações em vez de uma [GAUGLITZ, 2003].

As vibrações podem ser classificadas como estiramento axial e deformação angular. A vibração de estiramento envolve variação na distância interatômica entre dois átomos e pode ser dos tipos simétrica e antissimétrica. As vibrações de deformação são caracterizadas pela variação no ângulo entre as duas ligações e podem ser classificadas em quatro tipos: deformação simétrica no plano (*scissoring*, em inglês), deformação antissimétrica no plano (*rocking*, em inglês), deformação simétrica fora do plano (*wagging*, em inglês) e deformação antissimétrica fora do plano (*twisting*, em inglês) a figura 4 ilustra um modelo simples desses modos vibracionais [STUART, 2004].



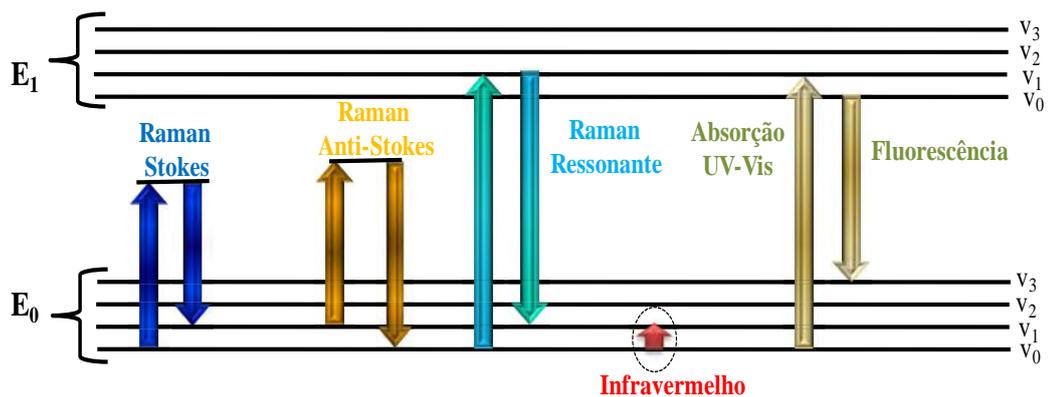
**Figura 4:** modos vibracionais para uma molécula composta por três átomos.

### 1.7 Espectroscopia vibracional: espalhamento Raman

A espectroscopia Raman também está relacionada com os modos vibracionais das moléculas, porém envolve um mecanismo diferente da espectroscopia de absorção no infravermelho. Isso faz com que estas técnicas sejam complementares. Alguns modos vibracionais presentes em uma técnica pode não aparecer em outra e vice-versa, eventualmente podendo ser observada nas duas técnicas [SKOOG, 2002]. A técnica baseia-se na irradiação da amostra com um laser de radiação monocromática visível, infravermelho-próximo ou ultravioleta-próximo, e a luz é então espalhada. Podem ocorrer dois fenômenos, espalhamento Rayleigh (elástico), em que a radiação incidente tem a mesma energia que a radiação espalhada ou espalhamento Raman (inelástico), em que a radiação incidente é ligeiramente diferente da radiação espalhada. Essa diferença de energia que está na região do infravermelho é capaz de ativar os modos vibracionais sendo registrada pelo computador [SKOOG, 2002]. Enquanto que na absorção no infravermelho é necessário que haja uma variação no momento de dipolo da molécula, o espalhamento Raman está relacionado com o

momento de dipolo induzido, devido à radiação incidente na molécula [SALA, 1996]. O momento de dipolo induzido relaciona-se com a polarizabilidade da molécula sendo que, para ocorrer o espalhamento Raman, é necessário que haja variação na polarizabilidade molecular.

No espalhamento Raman, a frequência da radiação espalhada pode ser maior que a frequência da radiação incidente, denominado espalhamento Raman anti-Stokes. Se a frequência da radiação espalhada é menor que o da radiação incidente, então ocorre o espalhamento Raman Stokes. O espalhamento Raman Stokes é mais intenso que o anti-Stokes a temperatura ambiente, pois a probabilidade de ocorrência é maior, já que à temperatura ambiente a maior parte das moléculas está no estado vibracional fundamental. O espalhamento Raman anti-Stokes ocorre para moléculas que já estão em um estado vibracional excitado, cuja população é menor à temperatura ambiente, sendo então menos intenso [SALA, 1996]. Um fator que pode aumentar consideravelmente a probabilidade de ocorrência do espalhamento Raman é que a frequência do laser esteja dentro da banda de absorção da molécula, isto é, a energia incidente é suficiente para promover uma transição eletrônica da molécula espalhadora, obtendo o espalhamento Raman ressonante (RRS, *Ressonance Raman Scattering*, em inglês) podendo aumentar a seção de choque do espalhamento em um fator em torno de  $10^6$  [AROCA, 2006]. A intensidade do espalhamento Raman depende da intensidade do laser, da frequência do laser e da polarizabilidade da molécula. A figura 5 ilustra de forma resumida os fenômenos de espectroscopia óptica.



**Figura 5:** diagrama de energia mostrando diferentes transições de uma molécula para um modelo considerando dois estados eletrônicos de energia.

### 1.8 Microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica é uma poderosa técnica que permite a visualização de superfícies em escala nanométrica. Ela é baseada nas interações entre um *cantilever* [HORNYAK, 1998] [IKAI, 1996] e a superfície da amostra. O *cantilever* é uma haste flexível que na extremidade inferior existe uma ponta extremamente pequena. Essas interações são devidas às forças de repulsão *coulombianas*, forças de *Van der Waals*, força magnética, força elétrica, força de atrito, entre outras [MEYER, 1992] [JANDT, 1998].

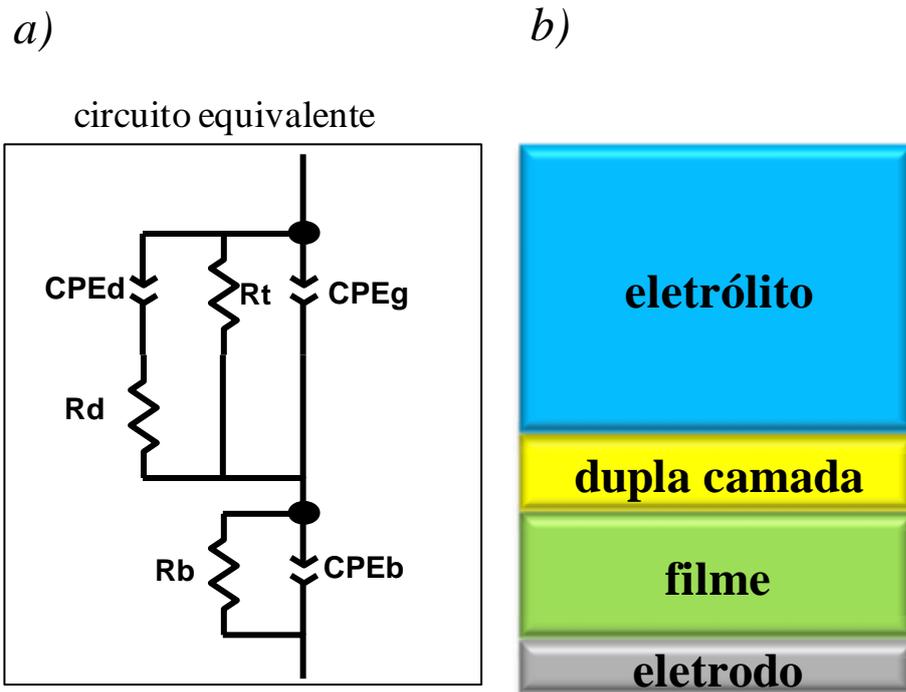
Esta técnica fornece a topografia da superfície da amostra, sendo possível a visualização de defeitos, presença de agregados, distribuição de grãos e possibilitando a medida direta da altura e profundidade, além de obter informações sobre a rugosidade. A aplicação desta técnica na análise da superfície de filmes finos tem sido muito explorada devido a versatilidade. Não é preciso fazer tratamento na amostra, a imagens são obtidas em pouco tempo e pode ser feita em qualquer superfície, sendo que com um equipamento de bancada consegue-se analisar desde pequenas (1  $\mu\text{m}$  x 1  $\mu\text{m}$ ) até grandes áreas (50  $\mu\text{m}$  x 50  $\mu\text{m}$ ) [RODRÍGUEZ, 2010] [AOKI, 2009] [CRESPILO, 2009].

Basicamente, existem três modos de operação [RUBENS, 2003]: (1) modo contato, em que a imagem é obtida com a ponta do *cantilever* tocando suavemente a superfície da

amostra. Esse tipo de análise é indicado para amostras rígidas em que a ponta do *cantilever* não vá danificar a superfície; (2) modo não-contato, em que o *cantilever* oscila sem que a ponta toque a amostra. Não há risco de contaminação e as imagens, geralmente, não contêm muitos detalhes devidos ao fato do *cantilever* estar mais afastado da amostra; (3) modo *tapping* (contato intermitente), o *cantilever* oscila e sua ponta toca a amostra de forma intermitente. É indicado para amostra menos rígidas, como sistemas biológicos e filmes finos de materiais orgânicos [GIESSIBL, 2003].

### 1.9 Medidas elétricas

As medidas elétricas são uma importante ferramenta para analisar possíveis interações entre os materiais que constituem os filmes finos e analitos de interesse. Uma das formas de estudo pode ser feita via espectroscopia de impedância, na qual são coletadas curvas de capacitância em função da frequência da corrente alternada aplicada no dispositivo. As medidas *ac* evitam a polarização das cargas presentes no filme que recobre o eletrodo além de poder ser um processo repetitivo e não destrutivo. A polarização poderia alterar significativamente as propriedades dos dispositivos por exemplo, sensores que não são seletivos para determinadas substâncias em medidas *dc* mas que são altamente seletivos em medidas *ac* [MUSIO, 1997]. O que se pretende é atribuir grandezas mensuráveis aos elementos das unidades sensoriais (composta pelo eletrodo interdigitado e filme fino) para conseguir avaliar, ou ao menos inferir, a contribuição de cada elemento. Taylor e Macdonald [TAYLOR, 1987] propõem um circuito equivalente para modelar o sistema composto de um metal coberto por filme fino pouco condutor imerso em uma solução eletrolítica. Esse sistema é próximo ao que propomos estudar e o circuito equivalente permite o estudo das curvas de capacitância. O modelo é descrito ~~abaixo~~ na figura 6.



**Figura 6:** a) circuito equivalente do sistema para um eletrodo recoberto com um material pouco condutor, imerso em uma solução; b) Ilustração do perfil da unidade sensorial imersa em um eletrólito (solução do analito).

Na figura 6a CPEb e Rb, capacitância e resistência, respectivamente, que em paralelo entre si representam a contribuição do filme para o circuito equivalente. Estas duas grandezas estão em série com a impedância do eletrólito, composta por CPEd, Rd, Rt e CPEg. Na interface filme/eletrólito surge, devido à adsorção de íons do eletrólito no filme, uma região denominada de dupla camada, a qual é modelada através da CPEd representando sua capacitância e Rd representando sua resistência. Rt representa a resistência à transferência de carga através da interface filme/eletrólito. A capacitância geométrica dos eletrodos é representada por CPEg. Na figura 6b é mostrado o perfil da unidade sensorial imersa no eletrólito. Nesse modelo é analisada a capacitância total do circuito em função da frequência da corrente alternada e nas curvas de capacitância são encontradas regiões distintas onde as respostas elétricas são governadas por diferentes fenômenos [RIUL, 2003]. Nas regiões de baixa frequência, entre  $10^0$  e  $10^2$  Hz, ocorrem os efeitos devido à formação da dupla camada

elétrica na interface eletrodo/solução [RIUL, 2003]. Na região de média frequência, entre  $10^2$  e  $10^5$  Hz, são verificados os fenômenos que dependem das propriedades do material que reveste os eletrodos [RIUL, 2003]. Geralmente é nesta região onde são verificadas as maiores mudanças nos valores de capacitância oriundos da interação da solução com a unidade sensorial. Por fim, a região de alta frequência, acima de  $10^5$  Hz, é dominada pela capacitância geométrica dos eletrodos interdigitados [RIUL, 2003] e pela constante dielétrica do meio em que estão inseridos [ZARETSKY, 1988]. As curvas de capacitância (em regiões de baixa, média ou alta frequência) podem sofrer deslocamentos seja para maiores ou menores valores de frequência dependendo da concentração de íons em solução [RIUL, 2003] [AOKI, 2009] e do caráter mais ou menos condutor do filme que recobre o eletrodo [AOKI, 2010 (b)].

Por esse método gera-se uma grande quantidade de dados que comumente são analisados por métodos estatísticos. Neste trabalho foi utilizado um método estatístico de projeções denominado PCA (*principal component analysis*, em inglês) [JOLLIFFE, 1986] [BEEBE, 1998]. O objetivo mais imediato da técnica é verificar se existe um pequeno número de variáveis das componentes principais responsáveis por explicar as outras variáveis do conjunto de dados. As componentes são apresentadas por ordem decrescente de importância, assim a primeira é a que melhor explica a variação dos dados, a segunda o máximo possível que ainda não foi explicado depois de feito a primeira componente e assim por diante.

## **2.1 Preparo das dispersões de DODAB e soluções de NiTsPc**

DODAB (630,95 g/mol) foi adquirido da Fluka, NiTsPc (979,40 g/mol), dopamina hidrocloreada (153,18 g/mol), polialilamina hidrocloreada (PAH) ( $15,0 \times 10^3$  g/mol) e o poli(estirenosulfonato de sódio) (PSS) ( $70,0 \times 10^3$  g/mol) da Sigma-Aldrich Co. Os materiais não sofreram qualquer tipo de purificação/processamento antes de serem utilizados. As soluções e dispersões foram preparadas com água ultrapura obtida de um sistema Milli-Q, modelo Simplicity, com ( $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$  e  $\text{pH} = 5,6$ ). As dispersões de DODAB 1,0 mmol/L foram obtidas por diluição de uma dispersão estoque 5,0 mmol/L previamente preparada. A dispersão de DODAB 5,0 mmol/L foi aquecida a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  para a formação de vesículas, sob agitação mecânica (lenta) durante alguns minutos [FEITOSA, 2006] e armazenada por 24 horas em temperatura ambiente ( $23 \text{ }^\circ\text{C}$ ) antes do crescimento do filme LbL. As soluções de NiTsPc (0,01 - 0,4 mmol/L) foram obtidas mediante diluição simples à temperatura ambiente da solução estoque (0,5 mmol/L). As soluções aquosas de PAH e PSS, ambas com 1,0 mg/mL, foram preparadas pela simples diluição em água ultrapura. As soluções de dopamina ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $3,0 \times 10^{-4}$  e  $6,0 \times 10^{-4}$  mol/L) foram preparadas por diluição a partir da solução estoque de  $10^{-3}$  mol/L.

## **2.2 Caracterização das dispersões de DODAB**

As dispersões de DODAB foram caracterizadas via medidas de DSC realizadas em um microcalorímetro da Micro-Cal, modelo VP-DSC, variando a temperatura de 1 a  $75 \text{ }^\circ\text{C}$  com taxa de aquecimento/resfriamento de  $1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  e pressão constante de 21 psi. Foram analisadas as seguintes dispersões de DODAB: i) DODAB 1,0 mmol/L em água; ii) DODAB 1,0 mmol/L em N concentrações de solução aquosa de NiTsPc, sendo  $N = 0,01; 0,05; 0,1; 0,2;$

0,3; 0,4 e 0,5 mmol/L. Também foi proposto o procedimento inverso: iii) NiTsPc 0,05 mmol/L em dispersão de DODAB 1,0 mmol/L e iv) NiTsPc 0,5 mmol/L em dispersão de DODAB 1,0 mmol/L. Quatro ciclos de aquecimento/resfriamento foram realizados para cada dispersão, sendo considerados os últimos 2 ciclos.

### **2.3 Limpeza dos substratos**

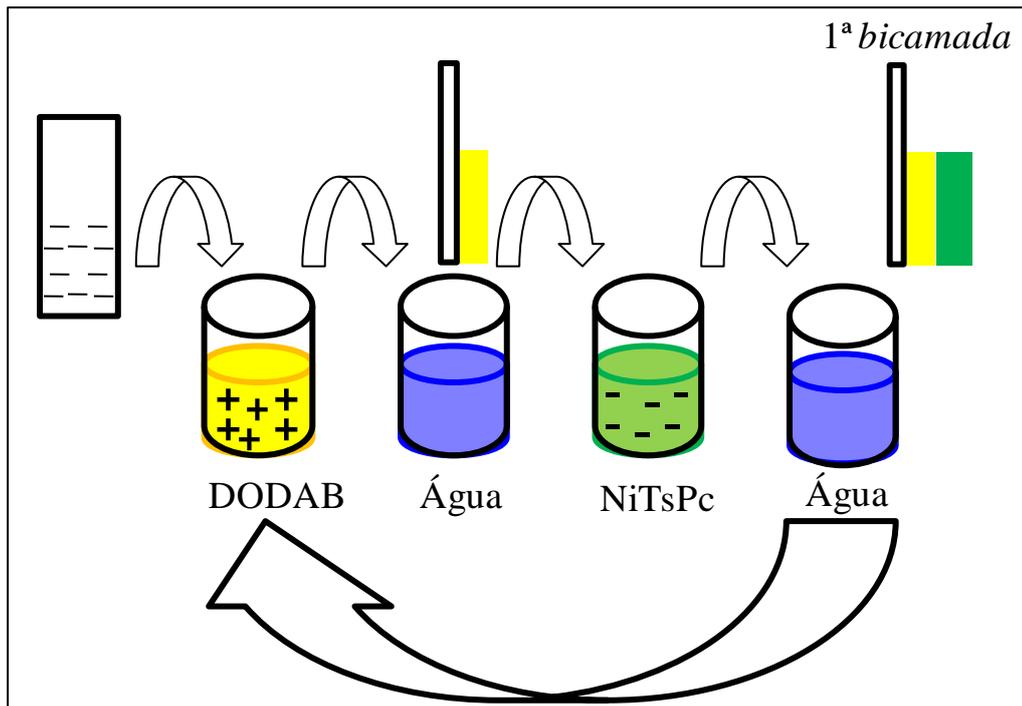
Os substratos sólidos (quartzo, vidro ou seleneto de zinco) foram limpos com detergente neutro, banho em acetona (~ 10 mL), banho em clorofórmio (~10 mL). Ambos os banhos são mantidos em ultrassom por cinco minutos e, posteriormente, extensivamente enxaguados com água ultrapura. Foi também utilizado outro método de limpeza para os substratos de quartzo. Os substratos foram mantidos em banho de solução de ácido sulfúrico concentrado com peróxido de hidrogênio (30% v/v), na proporção de 1:1, por quarenta minutos. Após enxágue em água ultrapura, os substratos foram imersos, sob ultrassom, em água ultrapura, etanol e hidróxido de sódio, na proporção 5:4:1, por 30 minutos e então enxaguados extensivamente. Esse procedimento é denominado de hidrofilição [FERREIRA, 1995].

### **2.4 Preparação dos filmes LbL de DODAB/NiTsPc**

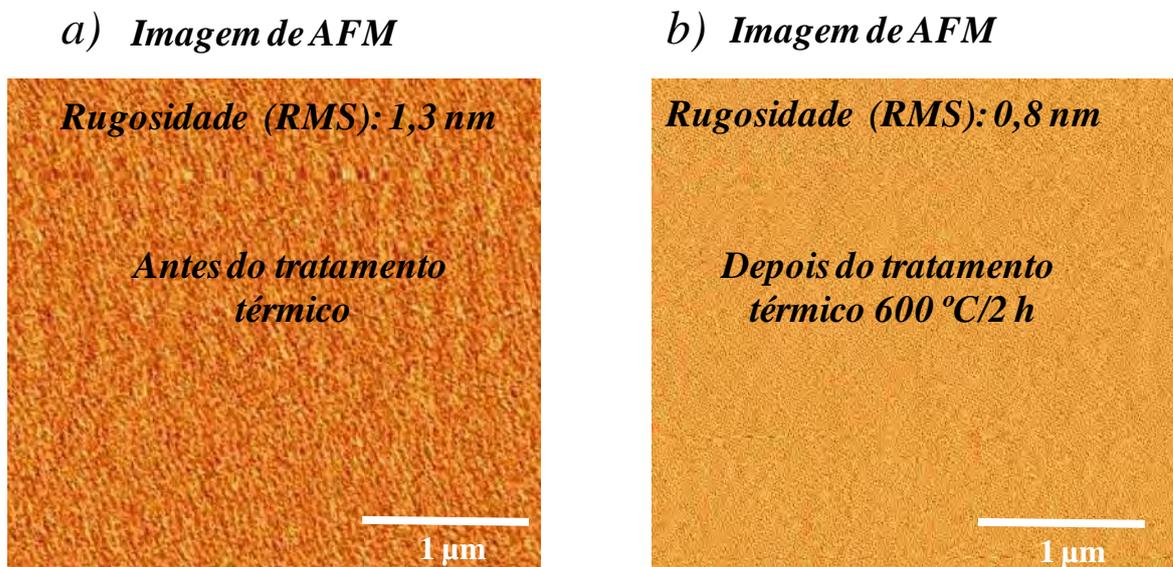
O tempo necessário de imersão do substrato de quartzo na dispersão catiônica de DODAB para formação da primeira camada de DODAB foi determinado com o seguinte procedimento: o substrato foi imerso na dispersão por 1 minuto, depois imerso em água ultrapura para retirada de excesso de material, seco sob fluxo controlado de ar comprimido e obtido um espectro de absorção no UV-Vis. Esse procedimento foi repetido para tempos de imersão de 2, 3, 4, 5 e 6 minutos, sendo que para cada um destes tempos foi utilizado um substrato de quartzo. Vale destacar que foram obtidos espectros no UV-Vis dos 6 substratos

de quartzos com *baseline* do ar e os resultados mostraram que são idênticos em termos de absorção óptica.

Os filmes foram então manualmente crescidos pela técnica LbL a partir da imersão do substrato sólido de forma alternada nas dispersões de DODAB 1,0 mmol/L e soluções de NiTsPc 0,05 ou 0,5 mmol/L. Primeiramente, o substrato foi imerso na dispersão catiônica de DODAB por um período de 3 minutos para a adsorção das moléculas na superfície. Em seguida, o substrato contendo a primeira camada de DODAB foi imerso em água ultrapura para remover o excesso de material catiônico. Posteriormente, o substrato foi imerso na solução aniônica de NiTsPc durante 3 minutos para adsorção das moléculas. O substrato foi novamente imerso em água ultrapura para a remoção do excesso de material aniônico, dando origem à primeira bicamada DODAB/NiTsPc. Um diagrama esquemático do processo de fabricação da primeira bicamada é ilustrado na figura 7. Este ciclo foi repetido para a obtenção do número de bicamadas desejável. Foram crescidos filmes LbL com 21 bicamadas sobre substrato de quartzo submetidos aos dois processos de limpeza para medidas de absorção no UV-Vis e sobre seleneto de zinco para medidas de FTIR, 5 bicamadas sobre eletrodo interdigitado de platina para medidas de espectroscopia de impedância e 2 bicamadas sobre vidro BK7 previamente tratado termicamente (600 °C durante 2 horas) para medidas de AFM. Este tratamento térmico reduz a rugosidade da superfície do filme [ZANFOLIM, 2010] [AOKI, 2010 (a)]. Conforme a figura 8, a rugosidade (calculada a partir de uma linha que passou pelas diagonais da imagem) do substrato de vidro antes do tratamento térmico foi de 1,4 nm enquanto que após o tratamento caiu para 0,8 nm.



**Figura 7:** metodologia empregada para o crescimento de uma bicamada de filmes de DODAB/NiTsPc. O substrato é inicialmente imerso na solução catiônica aguardando um determinado tempo, seguido de lavagem em água ultrapura. Posteriormente é imerso na solução aniônica aguardando um determinado tempo seguido de lavagem novamente. Desse modo é formada a primeira bicamada.



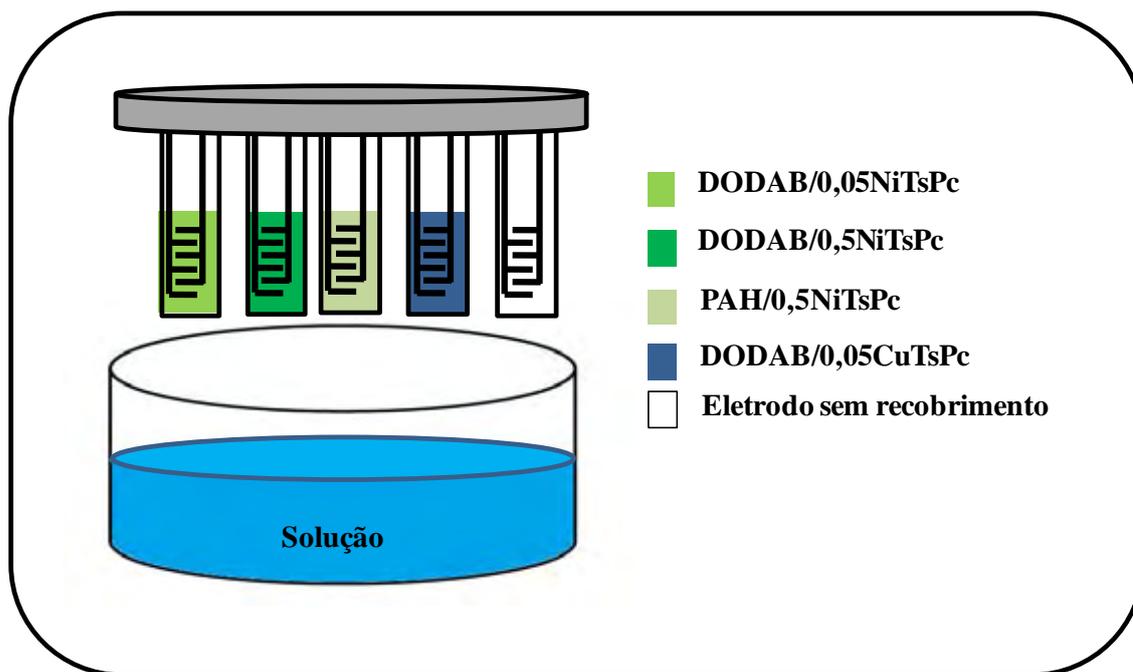
**Figura 8:** imagem topográfica de AFM obtida no modo *tapping* de um substrato de vidro BK7 a) antes do tratamento térmico; b) depois do tratamento térmico a 600°C por 2h.

## 2.5 Caracterização dos filmes LbL de DODAB/NiTsPc

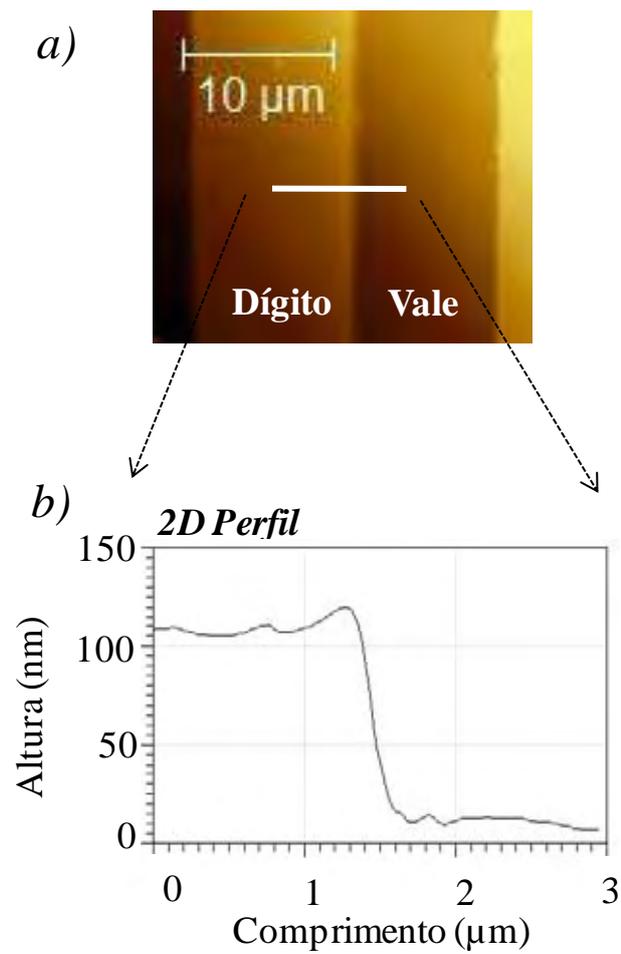
As medidas de absorção no UV-Vis foram realizadas em um espectrofotômetro Varian modelo Cary 50 de 190 a 1100 nm. As medidas de espalhamento Raman e microscopia óptica foram realizadas em um espectrógrafo micro-Raman Renishaw modelo in-Via com laser 785 nm e rede de difração de 1200 linhas por milímetro. Os mapeamentos de linha foram realizados coletando-se espectros Raman ao longo de uma linha de 100  $\mu\text{m}$  a cada 1  $\mu\text{m}$  (passo), gerando um total de 101 espectros ao longo da linha. As imagens óticas foram obtidas por um microscópio Leica acoplado ao espectrógrafo micro-Raman utilizando lentes que permitem aumento de 500 vezes. A potência é ajustada para obter melhor relação sinal/ruído. Os espectros de absorção no infravermelho (FTIR) foram obtidos no modo transmissão em atmosfera ambiente em um espectrômetro FTIR Bruker, modelo Vector 22, resolução espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 128 *scans*. As imagens de AFM foram obtidas em um microscópio Nanosurf easyScan 2 no modo *tapping* (contato intermitente) e resolução de 512 pontos/linha. As imagens coletadas foram analisadas usando um “*software livre*” ~~o programa~~ *Gwyddion 2.19* (*home page* para download: <http://gwyddion.net/download.php>).

Uma língua eletrônica (figura 9) composta por cinco unidades sensoriais foi utilizada na detecção de dopamina ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $3,0 \times 10^{-4}$ ,  $6,0 \times 10^{-4}$  e  $10^{-3}$  mol/L), dissolvida em água, via espectroscopia de impedância realizada em um equipamento Solartron, modelo 1260, a 23°C aproximadamente. Foram coletadas curvas de capacitância entre 1 e  $10^6$  Hz para o sinal de entrada aplicado com amplitude de 50 mV. As unidades sensoriais são formadas por eletrodos interdigitados, de platina recobertos com filmes LbL de DODAB/0,05 NiTsPc, DODAB/0,5 NiTsPc (DODAB 1 mmol/L e NiTsPc 0,05 e 0,5 mmol/L), PAH/0,05NiTsPc (PAH 0,625 mmol/L e NiTsPc 0,05 mmol/L) e DODAB/0,05CuTsPc (DODAB 1 mM e CuTsPc 0,05 mM), além de um eletrodo de platina sem recobrimento. Todos os filmes foram crescidos com o mesmo procedimento, tanto na sequência das etapas quanto no tempo de

imersão. É importante ressaltar que nos eletrodos de platina foi depositada uma camada de PAH/PSS (filme LbL) a partir de soluções com concentrações de 1,0 mg/mL para minimizar os efeitos do substrato [LOBO, 2003]. Os eletrodos interdigitados de platina possuem a configuração de 100 dígitos cada um com 10  $\mu\text{m}$  de largura e 100 nm de altura e são separados entre si a cada 10  $\mu\text{m}$ , conforme ilustra a figura 10.



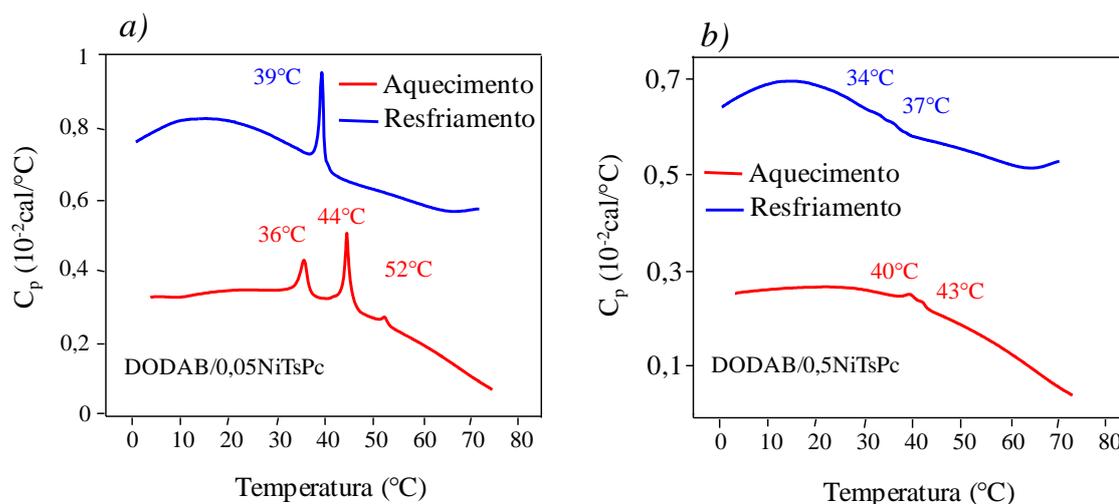
**Figura 9:** diagrama esquemático do modelo da língua eletrônica composta por 5 unidades sensoriais, cujos filmes LbL com 5 bicamadas que recobrem os eletrodos de platina são indicados na legenda.



**Figura 10:** a) imagem topográfica de AFM obtida no modo *tapping* do eletrodo interdigitado de platina destacando o dígito e o vale; b) perfil destacando a altura dos dígitos.

### **3.1 Formação de vesículas de DODAB na presença de NiTsPc**

O DODAB é praticamente insolúvel em água à temperatura ambiente, sendo necessário aquecimento e ação de um agente externo para que ocorra sua dispersão. O método mais comum é o aquecimento do sistema DODAB/água a uma temperatura acima da temperatura de transição de estado gel → líquido cristalino do DODAB ( $T_m \approx 45$  °C), com a consequente formação de vesículas. Na literatura [FEITOSA, 2006] é reportada a formação espontânea de vesículas unilamelares para dispersões de DODAB em água quando aquecida a 60 °C e em concentração de aproximadamente 1,0 mmol/L. Como o objetivo deste trabalho é a fabricação de filmes LbL de DODAB/NiTsPc, foi realizado inicialmente um estudo por DSC para verificar se a presença da NiTsPc influencia a estruturação das vesículas de DODAB. As figuras 11a e 11b mostram medidas de DSC de DODAB disperso em soluções de NiTsPc 0,05 e 0,5 mmol/L, respectivamente, sendo que a curva vermelha representa o aquecimento e a azul o resfriamento. Em ambos os casos a concentração final de DODAB é de 1,0 mmol/L.



**Figura 11:** ciclos de aquecimento (linha vermelha) e resfriamento (linha azul) para DODAB disperso em solução de a) 0,05 mmol/L de NiTsPc; b) 0,5 mmol/L de NiTsPc. Concentração final de DODAB em ambos os casos: 1,0 mmol/L.

Na literatura, no caso de DODAB 1,0 mmol/L são reportados dois picos endotérmicos no aquecimento, um em torno de  $T_s \approx 34$  °C relacionado a uma pré-transição do estado subgel para o estado gel e outro em torno de  $T_m \approx 44$  °C referente à transição do estado gel para o estado líquido-cristalino [SAVEYN, 2009] [WU, 2009]. No caso de DODAB em alta concentração (acima de 5,0 mmol/L) surge um novo pico em torno de  $T_p \approx 51$  °C, atribuído à transição de estado coagel para líquido-cristalino [WU, 2009]. Este pico tende a tornar-se mais evidente para as dispersões mais concentradas.

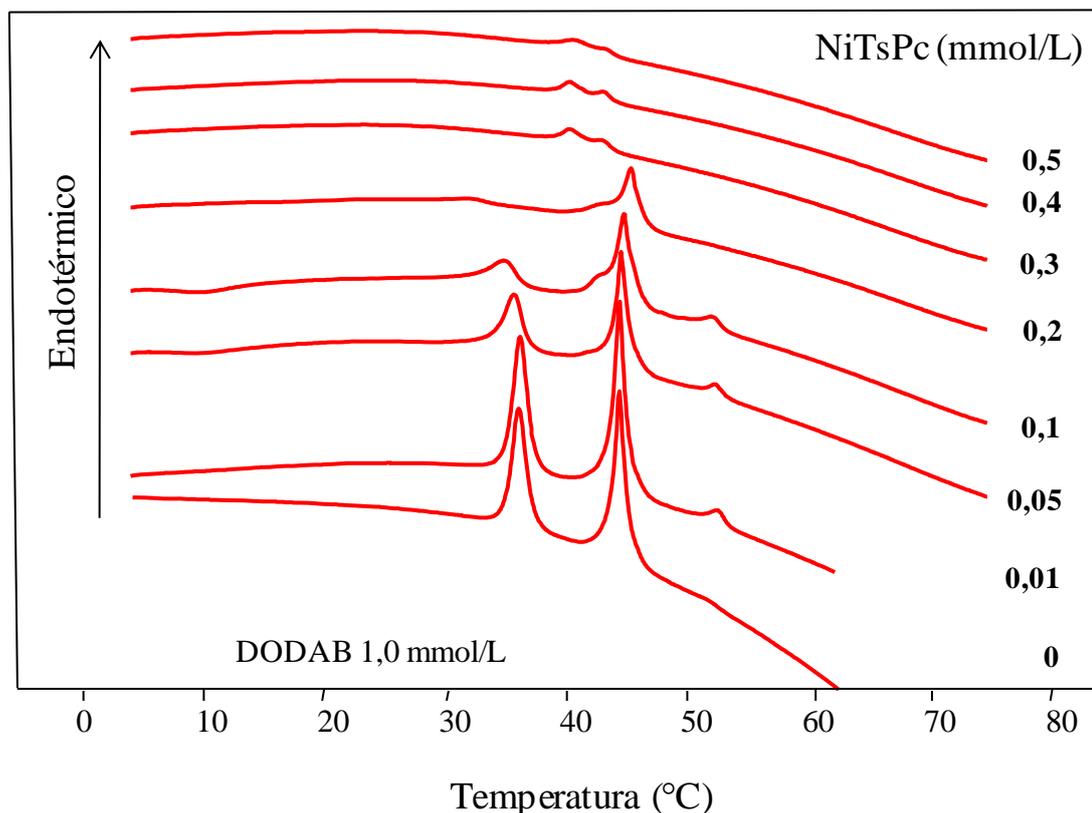
Em nosso caso, medidas de DSC para soluções de NiTsPc não apresentaram picos, revelando que a NiTsPc não apresenta transições de fase no intervalo de temperatura investigado. Desta forma, os picos endo e exotérmicos podem ser atribuídos exclusivamente ao DODAB. Na dispersão de DODAB em NiTsPc 0,05 mmol/L (Figura 11a) são observados dois picos principais localizados em 36 e 44 °C (linha vermelha), que podem ser atribuídos às transições de estados de subgel para gel e de gel para líquido-cristalino, respectivamente. Há também um pico pouco intenso (secundário) em 52 °C que pode sugerir uma interação DODAB-NiTsPc à temperatura ambiente. No ciclo de resfriamento para DODAB em NiTsPc

0,05 mmol/L (figura 11a) é observado somente o pico em 39 °C, o qual é atribuído à transição do estado líquido-cristalino para o estado gel das cadeias alquílicas do DODAB [WU, 2011]. A influência da NiTsPc na estruturação de DODAB foi observada por DSC para DODAB em NiTsPc 0,5 mmol/L (figura 11b) em que são observados apenas dois picos pouco intensos tanto no ciclo de aquecimento (40 °C e 43 °C) quanto no ciclo de resfriamento (37 °C e 34 °C). Em ambos os casos (resfriamento - figuras 11a e b) observa-se uma histerese de  $\approx 5$  °C no valor da  $T_m$  para o resfriamento em relação ao aquecimento, conforme reportado [FEITOSA, 2000] [SAVEYN, 2009].

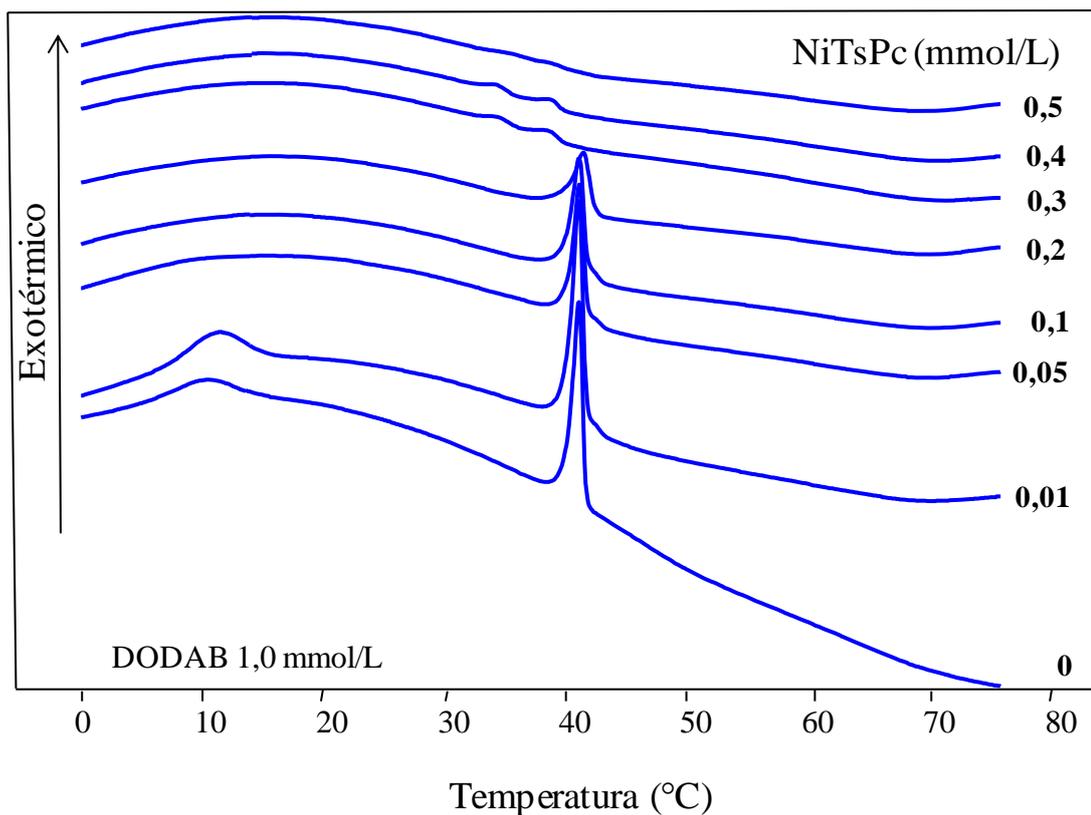
Em relação à formação ou não de vesículas na dispersão do DODAB em solução de NiTsPc, foi observado que a concentração de NiTsPc também influencia fortemente a formação destas estruturas, provavelmente devido à atração eletrostática entre esses componentes. Analisando os ciclos de aquecimento e resfriamento da figura 11b (DODAB em NiTsPc 0,5 mmol/L) é verificada a ausência dos picos característicos relacionados à formação de vesículas [FEITOSA, 2009], descartando então a formação de vesículas. Por outro lado, os picos característicos da formação de vesículas de DODAB são observados nas curvas de DSC da figura 11a (DODAB em NiTsPc 0,05 mmol/L), sendo que tais estruturas vesiculares são mantidas mesmo com o resfriamento da amostra abaixo da  $T_m$  [FEITOSA, 2000]. De acordo com Feitosa *et al.* [FEITOSA, 2009] a transição principal em 44 °C indica a estruturação de DODAB em bicamadas (vesículas uni ou multilamelares) e os picos de pré (36 °C) e pós (52 °C) transição indicam que as estruturas são complexas (multiestruturais), sendo que a pré-transição é relatada como ondulação da bicamada das vesículas, enquanto que a pós-transição é relatada como a formação de estruturas lamelares [FEITOSA, 2000] ou agregados [WU, 2009]. Desta forma, há fortes indícios de que DODAB em solução 0,05 mmol/L de NiTsPc estrutura-se predominantemente na forma de vesículas, enquanto que em soluções de NiTsPc

0,5 mmol/L esta formação é impedida, dando origem predominantemente a agregados moleculares.

A fim de verificar para qual concentração de NiTsPc o DODAB deixa de se estruturar predominantemente na forma de vesículas, foi realizado um estudo sistemático de dispersão de DODAB em diversas concentrações de soluções de NiTsPc. Neste estudo foram feitas medidas de DSC dispersando o pó de DODAB (concentração final = 1,0 mmol/L) em soluções aquosas de NiTsPc com as seguintes concentrações: 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mmol/L. Os resultados são apresentados na figura 12 para o aquecimento e na figura 13 para o resfriamento das amostras.



**Figura 12:** termogramas de aquecimento para pó de DODAB disperso na solução de NiTsPc contendo as seguintes concentrações: 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mmol/L. Em todos os casos a concentração final de DODAB foi de 1,0 mmol/L.



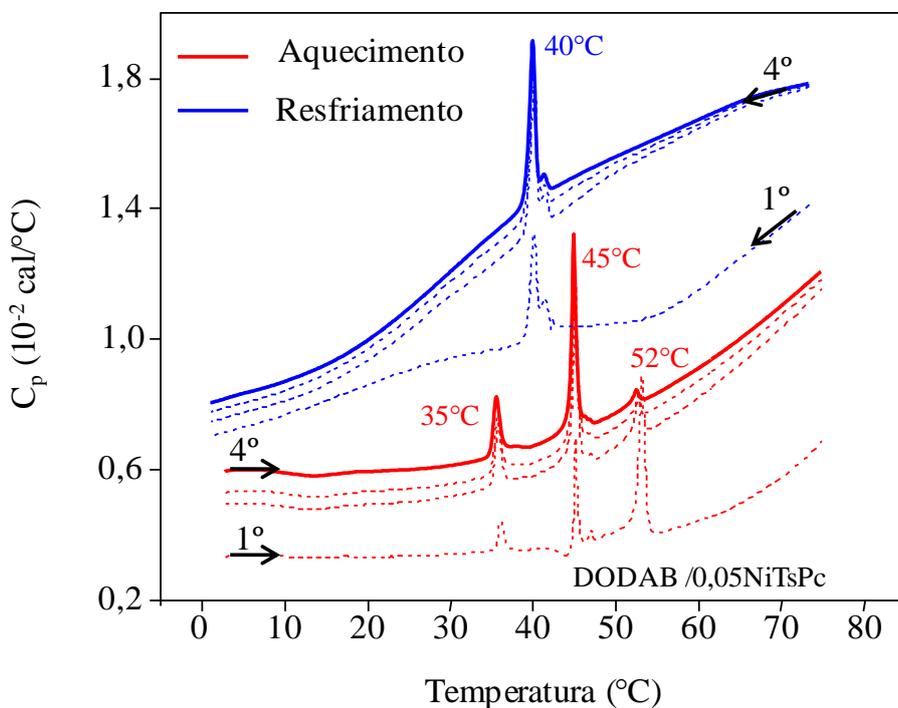
**Figura 13:** termogramas de resfriamento para pó de DODAB disperso na solução de NiTsPc contendo as seguintes concentrações: 0; 0,01;0,05;0,1;0,2;0,3;0,4 e 0,5 mmol/L. Em todos os casos a concentração final de DODAB foi de 1,0 mmol/L.

Nas curvas de aquecimento (figura 12) o DODAB apresenta dois picos característicos com suas transições de estados bem definidas:  $T_s \approx 36 \text{ °C}$  (transição de subgel para gel) e  $T_m \approx 44 \text{ °C}$  (transição de gel para líquido-cristalino). Para dispersões em concentração de NiTsPc 0,01; 0,05 e 0,1 mmol/L surge um pico pouco intenso  $T_p \approx 52 \text{ °C}$ , porém as curvas mantêm as mesmas características e a temperatura dos picos pré-existent não se alteram. Contudo, para dispersões em concentração de NiTsPc superiores a 0,1 mmol/L as curvas foram completamente descaracterizadas.

Já para o resfriamento (figura 13) aparece um único pico em  $39 \text{ °C}$  referente à transição reversa (de líquido-cristalino para gel). Esse pico não é deslocado com a variação da concentração de NiTsPc. As curvas são semelhantes para dispersão de DODAB em soluções

de NiTsPc com 0,01; 0,05; 0,1 e 0,2 mmol/L e descaracterizadas para concentrações superiores. A partir das figuras 12 e 13 pode-se concluir que a dispersão de DODAB em soluções com concentrações de NiTsPc até cerca de 0,1 mmol/L permite a formação das vesículas de DODAB. Desta maneira, as soluções iniciais de 0,05 e 0,5 mmol/L de NiTsPc foram mantidas para o desenvolvimento deste trabalho já que permitem a formação ou não de vesículas de DODAB.

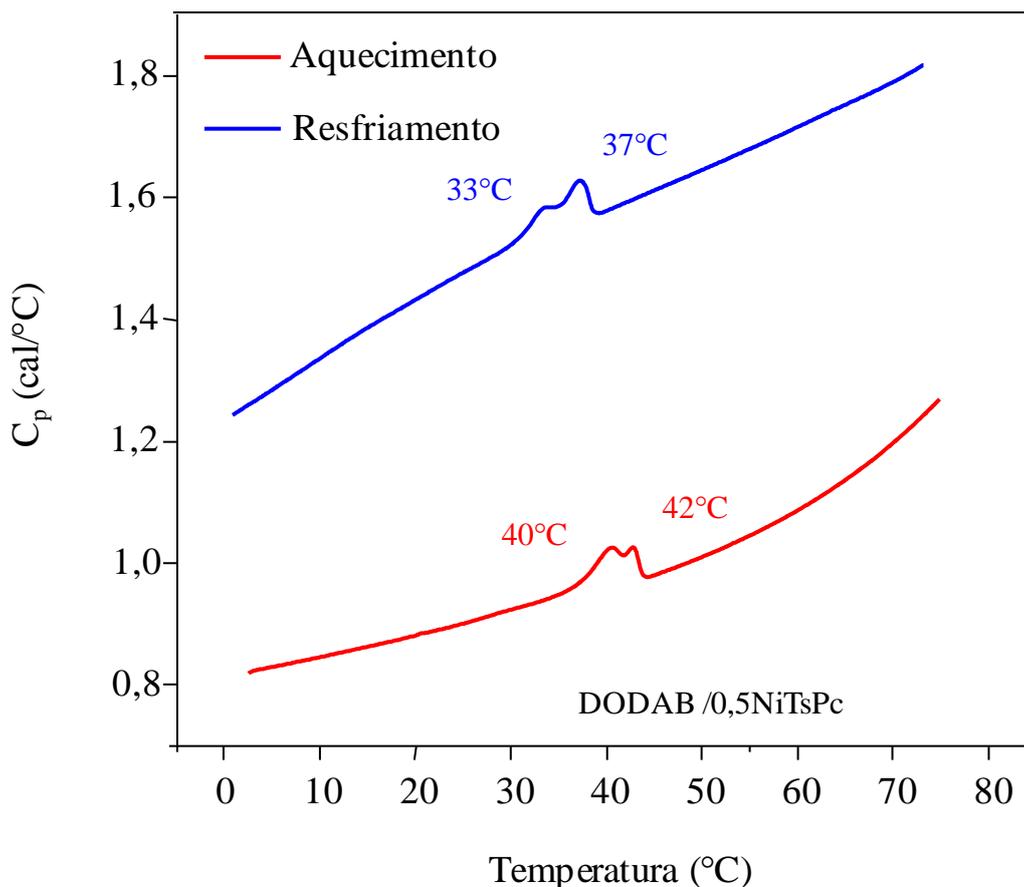
O estudo conduzido até aqui se baseou nas soluções de NiTsPc com diferentes concentrações e às quais era adicionado DODAB em pó. Propõe-se então a metodologia contrária em que se prepara a dispersão de DODAB com 1,0 mmol/L e nela é adicionado NiTsPc em pó de forma que suas concentrações finais fossem de 0,05 e 0,5 mmol/L. As medidas de DSC da mistura final contendo NiTsPc 0,05 mmol/L e DODAB 1,0 mmol/L com quatro ciclos de aquecimento/resfriamento são mostradas na figura 14.



**Figura 14:** ciclos de aquecimento (linha vermelha) e resfriamento (linha azul) para a concentração final de NiTsPc 0,05 mmol/L e DODAB 1,0 mmol/L obtida diretamente do pó de NiTsPc dissolvido na dispersão de DODAB. As linhas tracejadas representam os primeiros três ciclos enquanto as linhas cheias o último ciclo.

O primeiro aquecimento mostra que o pico em  $T_p \approx 52 \text{ }^\circ\text{C}$  é dominante sobre os demais ( $T_s \approx 35 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $T_m \approx 45 \text{ }^\circ\text{C}$ ). À medida que o processo de aquecimento é repetido o pico em  $T_m \approx 45 \text{ }^\circ\text{C}$  torna-se mais preponderante e após quatro aquecimentos é o mais evidente. Isto mostra que, quanto à conformação do DODAB, no início a NiTsPc parece perturbar a formação das vesículas, porém com os repetidos aquecimento/resfriamento, o DODAB estrutura-se predominantemente em vesículas, conforme discutido anteriormente (figura 11). A transição de estado reversa (resfriamento) ocorre em torno de  $\approx 40 \text{ }^\circ\text{C}$  para os quatro resfriamentos, porém é mais bem definida no último, como aconteceu para o aquecimento.

Prosseguindo com o estudo, o DSC de NiTsPc 0,5 mmol/L em DODAB 1,0 mmol/L é mostrado na figura 15, com o ciclo de aquecimento representado pela curva vermelha e o resfriamento pela curva azul. Tanto para o aquecimento quanto para o resfriamento observam-se os tênues picos em  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $33 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . A descaracterização e diminuição na intensidade destes picos revelam a destruição das vesículas. Os resultados são semelhantes ao discutido na figura 11, porém lá a NiTsPc não permitia a formação de vesículas e aqui ela destrói as vesículas.



**Figura 15:** ciclos de aquecimento (linha vermelha) e resfriamento (linha azul) para a concentração final de NiTsPc 0,5 mmol/L e DODAB 1,0 mmol/L obtida diretamente do pó de NiTsPc dissolvido na dispersão de DODAB.

### 3.2 Adsorção da primeira camada de DODAB

A adsorção é o resultado final da competição de possíveis interações entre material/substrato, material/material, material/solvente e solvente/substrato [RAPOSO, 1998]. É um processo espontâneo que surge para que ocorra um equilíbrio de forças na interface do substrato. Geralmente o substrato carregado eletricamente é imerso em uma solução de carga oposta possibilitando atração eletrostática entre o substrato e as moléculas do material. Se a concentração do material for  $\theta$  suficiente ocorre adsorção [OLIVEIRA, 2002]. É importante destacar que a adsorção acarreta na inversão da carga inicial do substrato e não na simples compensação de cargas, já que se ocorresse apenas uma compensação das cargas não seria possível a adsorção de uma nova camada pela falta de cargas na superfície [HOOGVEEN,

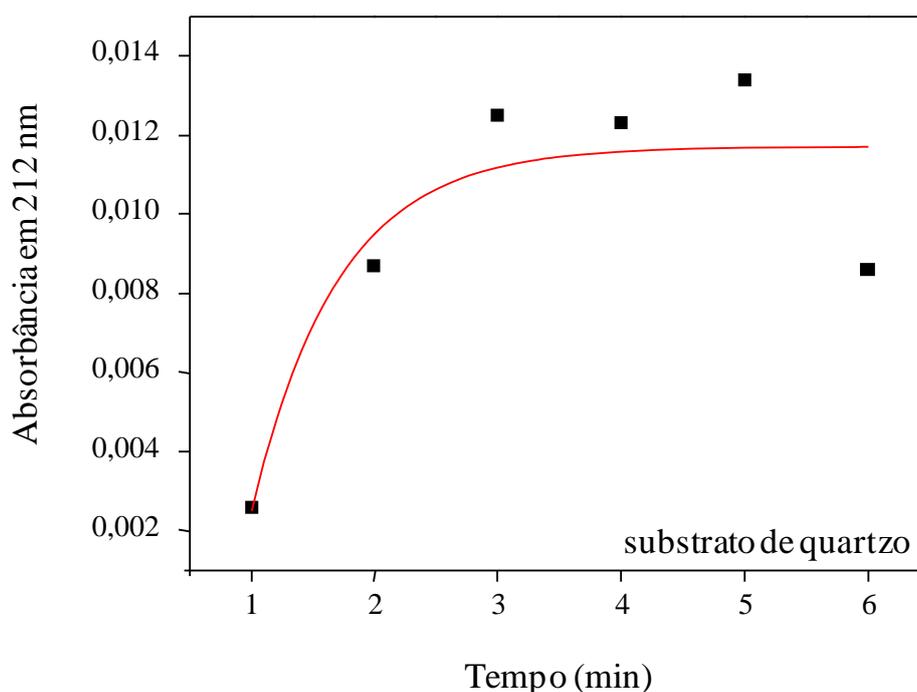
1996] [SILVA, 2010]. Este método, crescimento por atração eletrostática, é o mais reportado na literatura, porém outros mecanismos de crescimento também são possíveis [OLIVEIRA, 2002].

Uma vantagem da técnica LbL é a versatilidade de substratos e superfícies que permitem a adsorção de materiais. A polianilina (polication), por exemplo, adsorve em diversas superfícies de substratos como hidrofóbicas, hidrofílicas e eletricamente carregadas [CHEUNG, 1997]. Além das interações moleculares, outros parâmetros podem influenciar na adsorção do material no substrato e são facilmente controlados, tais como a concentração da solução, pH, tipo do substrato e tempo de imersão [RAPOSO, 1998]. No caso de polímeros pode ser levada em consideração a massa do polímero, a distribuição de carga ao longo da cadeia, além da afinidade elétrica entre o polímero e o substrato [OLIVEIRA, 2002]. Uma sistemática investigação da cinética de crescimento de polímeros conjugados foi feita por Ferreira e Rubner [FERREIRA, 1995] para diversas concentrações e substratos. Pode-se destacar que a adsorção da primeira camada de poli(tiofeno-3-ácido acético), PTAA, ocorre nos primeiros 5 minutos de imersão e que para tempos superiores não ocorre adsorção adicional significativa, além da possibilidade de adsorção de polialilamina hidrocloreada, PAH, em superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas.

Raposo *et al.* [RAPOSO, 1998] reportam a cinética de adsorção de poli(o-metoxianilina), POMA, em diversas concentrações e tempos de imersão. Um importante resultado é que a adsorção da primeira camada ocorre nos primeiros 5 minutos com duas etapas, uma nos primeiros 5 a 10 segundos de imersão com grande quantidade de material adsorvido e a segunda até os 300 minutos de adsorção caracterizada por uma menor quantidade de material adsorvido. Raposo e Oliveira [RAPOSO, 2002] reportam que o tempo necessário para ocorrer a completa adsorção de POMA com poli(ácido etenossulfônico), PVS, POMA/PVS, é de 2 horas, mas que com 3 minutos de imersão é possível obter um

crescimento linear. Este resultado também é observado no trabalho de Ichinose *et al.* [ICHINOSE, 1998], com filmes de octamolibdênio de amônio com PAH.

Nesta dissertação é destacado o tempo necessário para adsorção da primeira camada de DODAB sob substrato de quartzo. A absorvância em função do tempo em que o substrato permaneceu imerso na dispersão de DODAB 1,0 mmol/L é mostrado na figura 16. As medidas são obtidas com substratos diferentes, ou seja, cada ponto do gráfico corresponde a valores de absorvância obtidos para DODAB adsorvido sobre distintos substratos de quartzo, limpos sem a hidrofilição, para diferentes tempos de imersão. Os dados foram obtidos com as seguintes etapas: imersão, lavagem, secagem e medida a absorvância.



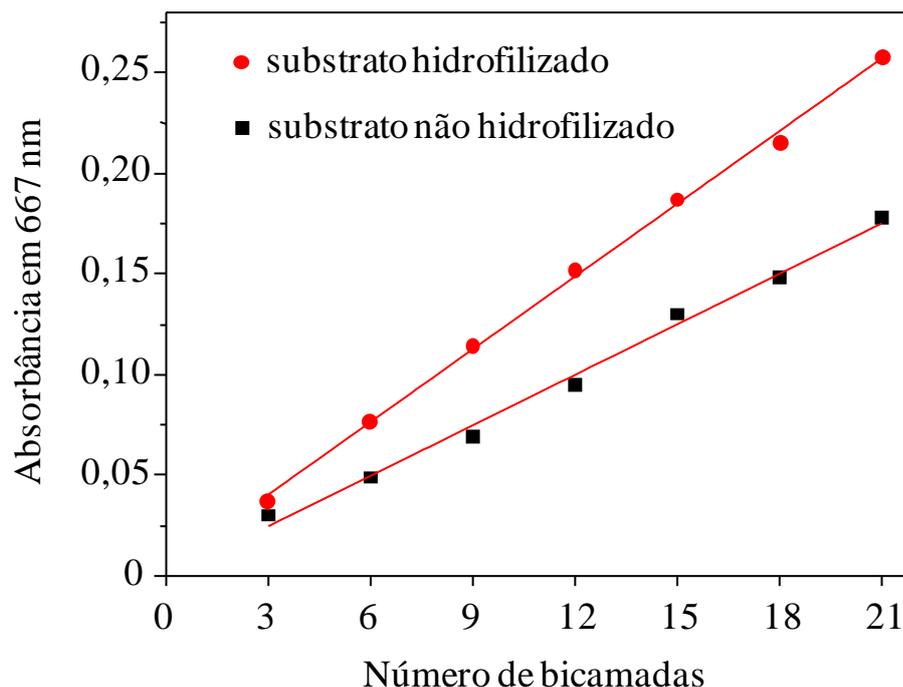
**Figura 16:** absorvância em função do tempo de imersão dos substratos de quartzo em DODAB 1,0 mmol/L. A curva sólida em vermelho indica o ajuste obtido.

A partir da figura 16 é observada que a absorvância não cresce linearmente com aumento do tempo de imersão, apresentando uma saturação em torno de três minutos de imersão. O tempo para que ocorra a saturação da primeira camada de POMA em substratos de

vidros é de cinco minutos [RAPOSO, 1997] enquanto que para filmes de PTAA, em substrato de vidro carregado positivamente, a saturação ocorre após dez minutos de imersão. No resultado da figura 16 ocorre um desvio de até 30% na absorbância de saturação para distintos substratos preparados na mesma condição. Desvio similar foi encontrado por Raposo *et al.* [RAPOSO, 1997] na adsorção da primeira camada de POMA. Esse desvio é atribuído à diferença da superfície dos substratos e o mesmo comportamento pode estar ocorrendo em nosso trabalho. De qualquer forma, como a variação está no valor da absorbância de saturação e não no tempo que leva para saturar, os filmes LbL mencionados daqui para frente foram crescidos com tempo de imersão de três minutos.

### **3.3 Efeito da limpeza do substrato**

A fabricação de filmes finos pode ocorrer em substratos como vidro, vidro com fina camada de ITO, quartzo, mica, teflon [FERREIRA, 1995] [LOWACK, 1998] [RAPOSO, 1997], sendo que a escolha do substrato geralmente depende da aplicação do filme. Por exemplo, para dispositivos que emitem luz e necessitam de uma camada condutora, utiliza-se o vidro com uma fina camada condutora de ITO, pois este sistema é transparente à luz visível. Existem processos químicos que podem funcionalizar a superfície dos substratos facilitando a adsorção dos materiais. Uma dessas técnicas é denominada de hidrofilição. Esse processo promove sítios ativos carregados negativamente na superfície do substrato, facilitando a adsorção das primeiras camadas catiônicas [FERREIRA, 1995]. A figura 17 apresenta a absorbância em função das bicamadas depositadas de filmes LbL de DODAB 1,0 mmol/L e NiTsPc 0,05 mmol/L (DODAB/0,05NiTsPc) podendo ser observado o efeito da hidrofilição do substrato de quartzo no crescimento dos filmes LbL na qual tem-se uma superfície hidrofiliada e em outra superfície não hidrofiliada. Os filmes foram crescidos considerando os procedimentos utilizados anteriormente, descritos na seção experimental.



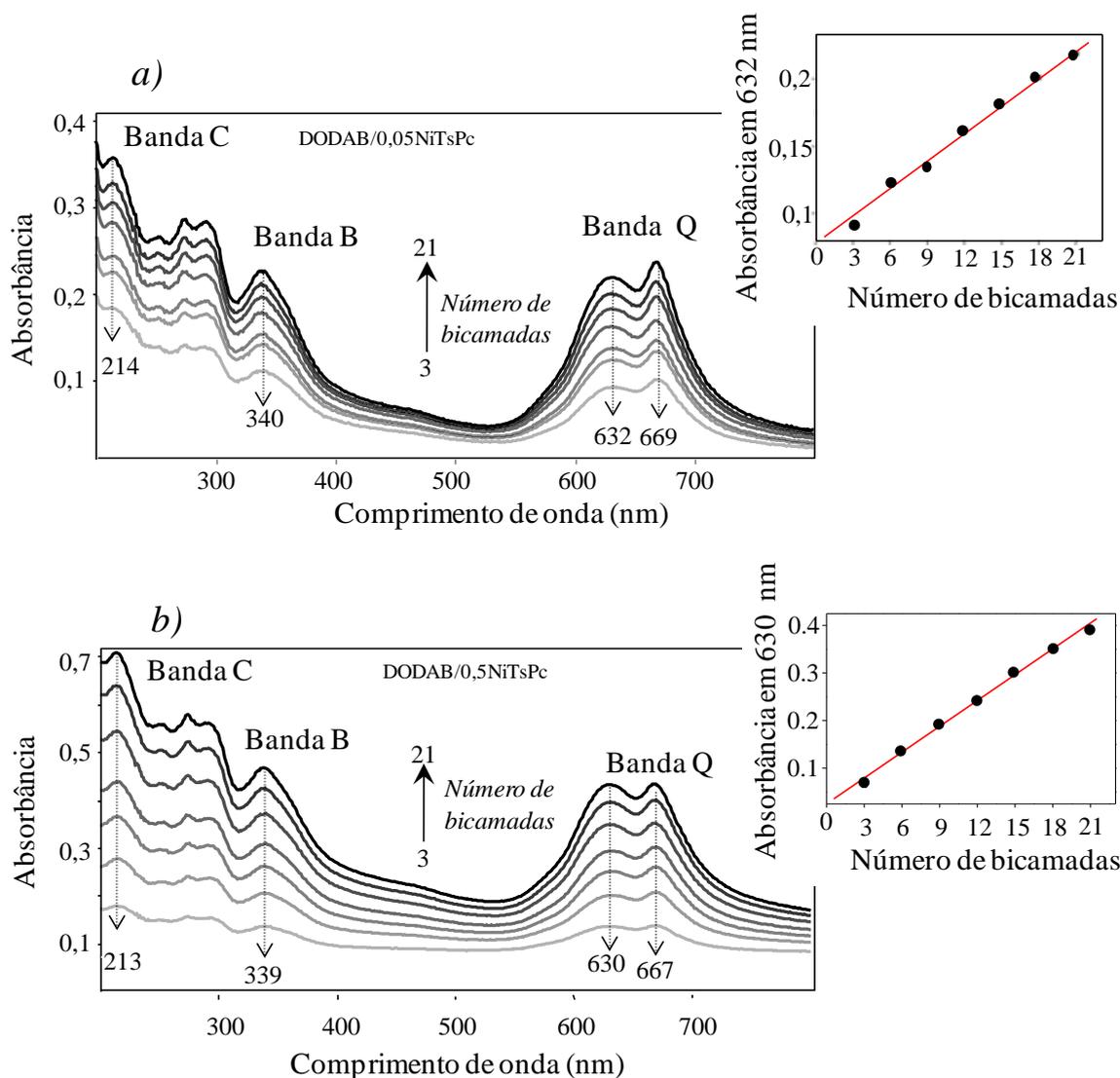
**Figura 17:** máximo de absorbância em função do número de bicamadas para filme LbL de DODAB/0,05NiTsPc. Filme em substrato de quartzo e tempo de imersão de 3 minutos para as duas soluções.

Observa-se um crescimento linear (figura 17) tanto para o substrato cuja superfície foi hidrofílica quanto para o substrato cuja superfície não foi hidrofílica, evidenciando que a mesma quantidade de material está sendo depositada a cada imersão, considerando cada processo independentemente. Contudo, a superfície hidrofílica promove maior adsorção de material por camada comparada à superfície não hidrofílica. Ferreira e Rubner [FERREIRA, 1995] relatam que, especialmente para filmes LbL de PTAA/PAH sendo depositados em diferentes superfícies (hidrofílica, hidrofóbica e carregada positivamente) a adsorção não é influenciada pela natureza da superfície, ou seja, o filme cresceu com a mesma absorbância para os distintos substratos. Em nosso caso, embora a superfície hidrofílica adsorva mais material, ela não é preponderante no crescimento do filme e, mesmo a superfície não estando hidrofílica, houve crescimento linear do filme. Portanto, os filmes seguintes foram crescidos sobre superfícies não hidrofílicas, até porque, considerando nossos

objetivos, nem todos os substratos podem passar pelo processo de hidrofilição por não serem quimicamente resistentes.

### **3.4 Crescimento do filme LbL de DODAB/NiTsPc**

As dispersões de DODAB e as soluções de NiTsPc foram utilizadas separadamente para o crescimento de filmes LbL, visto que elas formam dispersões catiônicas (DODAB) e soluções aniônicas (NiTsPc). Foram crescidos filmes LbL sobre substratos sólidos por imersões alternadas nas dispersões de DODAB 1,0 mmol/L e soluções de NiTsPc 0,05 ou 0,5 mmol/L. Sabendo-se que a espessura exerce grande influência nas propriedades dos filmes finos [VOLPATI, 2008], ao longo das imersões são coletados espectros de absorção no UV-Vis que, além de informar se o filme está crescendo, permite analisar se, a cada passo, a mesma quantidade de material é depositada. Desse modo, temos o controle do crescimento do filme. Para cada 3 bicamadas formadas foi coletado um espectro de absorção no UV-Vis do filme, até um total de 21 bicamadas. Nas figuras 18a e 18b são exibidos os espectros de absorção no UV-Vis para os crescimentos dos filmes contendo DODAB e NiTsPc nas concentrações de 0,05 e 0,5 mmol/L, respectivamente. No detalhe da figura 18a é mostrado o gráfico da absorbância em 632 nm enquanto que o detalhe da figura 18b exibe o gráfico da absorbância em 630 nm, ambos em função do número de bicamadas depositadas.



**Figura 18:** espectros de absorção no UV-Vis para o filme de DODAB/NiTsPc coletados a cada 3 bicamadas para um total de 21 bicamadas. a) Filme DODAB/NiTsPc fabricado com concentração de 0,05 mmol/L de NiTsPc; b) Filme DODAB/NiTsPc fabricado com concentração de 0,5 mmol/L de NiTsPc. No *inset* é apresentado o valor da absorbância em função do número de bicamadas depositadas.

As figuras 18a e 18b mostram um aumento da intensidade de absorção com a deposição das bicamadas, indicando que a cada imersão ocorre a adsorção de material no substrato e consequente crescimento dos filmes LbL. Os detalhes das figuras 18a e 18b revelam que o crescimento é linear, evidenciando que a mesma quantidade de material está sendo depositada a cada imersão. Resultados similares são reportados por Alencar *et al.* [ALENCAR, 2009] e Silva *et al.* [SILVA, 2010] que obtiveram crescimentos lineares para

filmes com bicamadas de PAH/NiTsPc. Ao contrário, Siqueira *et al.* [SIQUEIRA, 2007] mostraram que filmes LbL com bicamadas de PAMAN (poliamidoamina)/NiTsPc possuem crescimento exponencial. Tal comportamento foi atribuído à difusão do polieletrólito durante o crescimento do filme LbL. Zucolotto *et al.* [ZUCOLOTTI, 2006] também não obtiveram crescimento linear para filmes LbL de PANI (polianilina)/FeTsPc.

Em uma análise complementar das figuras 18a e 18b, obtemos algumas informações referentes às bandas de absorção da NiTsPc, já que o DODAB não apresenta bandas de absorção na região analisada. Os espectros mostram regiões distintas de absorção, sendo uma no intervalo do visível, denominada banda Q, e duas no ultravioleta denominadas B e C [LEZNOFF, 1989] [EDWARDS, 1970]. A banda Q é dita degenerada com a divisão em dois máximos de absorção. Um deslocado para o azul e localizado em 632 nm (figura 18a) para o filme DODAB/0,05 NiTsPc e em 630 nm (figura 18b) para o filme DODAB/0,5 NiTsPc. Estes máximos são referentes à absorção dos dímeros e demais agregados moleculares [CAMP, 2002] [EDWARDS, 1870] [GUO, 2002]. O outro máximo é deslocado para o vermelho e localizado em 669 nm (figura 18a) para o filme DODAB/0,05 NiTsPc e 667 nm (figura 18b) para o filme DODAB/0,5 NiTsPc. Estes máximos são referentes à absorção da forma monomérica das moléculas de NiTsPc [CAMP, 2002] [EDWARDS, 1970] [GUO, 2002]. A banda B ocorre para máximos de absorção em 340 nm (figura 18a) e 339 nm (figura 18b) enquanto a banda C para máximos de absorção em 214 nm (figura 18a) e 213 nm (figura 18b). Nestas figuras, 18a e 18b, há regiões de absorção entre as bandas B e C, também observadas por Edwards e Gouterman [EDWARDS, 1970] para filmes de diversas ftalocianinas evaporadas e atribuídas por estes autores à presença do átomo metálico central. As duas bandas mais destacadas na literatura são as bandas Q e B, as quais são atribuídas a transições eletrônicas do tipo  $\pi - \pi^*$  [SAINI, 2009] e  $n - \pi^*$  [SEOUDI, 2006] para a banda Q e somente  $\pi - \pi^*$  para a banda B [SEOUDI, 2006] [DAVIDSON, 1982]. De acordo com

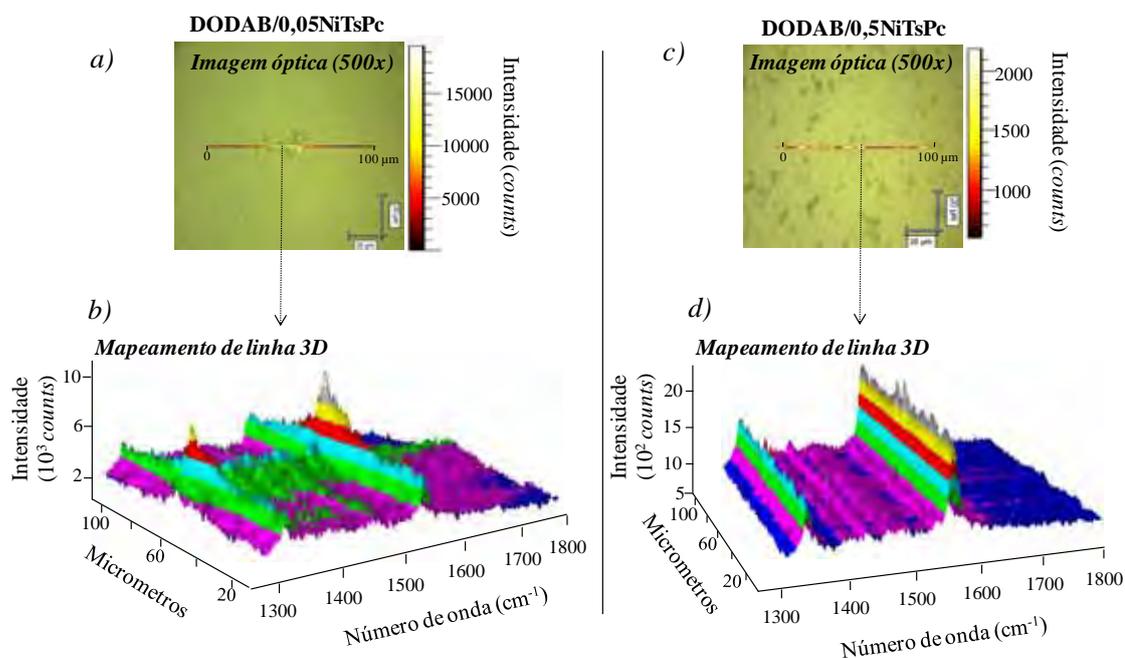
Leznoff [LEZNOFF, 1989], a diferença entre elas é que na banda B são os elétrons dos anéis mais internos que participam da absorção da luz enquanto que na banda Q são os elétrons dos anéis internos e externos.

Comparando as intensidades de absorção da banda Q para os filmes DODAB/0,05NiTsPc (figura 18a), o máximo de absorção localizado em 669 nm, quando comparada ao máximo em 632 nm, possui um pequeno aumento na absorbância, indicando que as moléculas de NiTsPc assumem preferencialmente a forma monomérica. Este resultado é diferente quando comparado com o trabalho de Zampa *et al.* [ZAMPA, 2007], que cresceram filmes com tretracamadas, sendo uma delas com NiTsPc, em que o máximo de absorção da NiTsPc ocorre para a forma dimérica e um ligeiro ombro para a forma monomérica. Porém, neste último caso, a concentração de NiTsPc era de 0,5 mmol/L. No nosso caso, para os filmes DODAB/0,5NiTsPc (figura 18b), o máximo de absorção da banda Q localizado em 630 nm, quando comparado ao máximo localizado em 667 nm, possui praticamente o mesmo valor de absorbância, indicando que as duas formas (monomérica e dimérica/agregados) estão presentes em igualdade no filme LbL. Comparando a absorbância dos filmes DODAB/0,05NiTsPc (figura 18a) e DODAB/0,5NiTsPc (figura 18b), para o mesmo número de bicamadas depositadas, observa-se que para o filme crescido a partir da solução 0,5 mmol/L de NiTsPc a absorbância é aproximadamente duas vezes maior. Isto deve estar relacionado com a maior adsorção de material pelo uso da solução mais concentrada de NiTsPc (0,5 mmol/L).

### **3.5 Morfologia do filme LbL de DODAB/NiTsPc**

A morfologia dos filmes de DODAB/0,05 NiTsPc e DODAB/0,5 NiTsPc foi investigada em escala micrométrica através da técnica micro-Raman e nanométrica pela técnica AFM. Em especial, a técnica micro-Raman traz informações químicas e morfológicas

combinadas em um mapeamento que pode ser sobreposto a uma imagem óptica. Em nosso caso, o mapeamento consiste na obtenção de uma sequência de espectros de espalhamento Raman coletados a cada 1  $\mu\text{m}$ , ao longo de uma linha de 100  $\mu\text{m}$ . A partir dos 101 espectros coletados é gerada uma linha em escala de cores, onde é monitorada a intensidade de uma banda específica, em que regiões mais claras indicam maior intensidade da banda e consequentemente maior quantidade de material. O mapeamento 3D é obtido plotando-se os 101 espectros lado a lado, ao longo dos 100  $\mu\text{m}$ . Para o mapeamento de linha foi escolhida a banda localizada em  $1560\text{ cm}^{-1}$ , por ser a banda mais intensa do espalhamento Raman da NiTsPc, cuja atribuição possui algumas variações na literatura: estiramento C=N do grupo isoindol, estiramento do anel benzênico [GAFFO, 2002] e ao estiramento C=C e C=N do grupo pirrol [ZUCOLOTTO, 2003]. A imagem óptica e o mapeamento 3D do filme LbL de DODAB/0,05NiTsPc são apresentados nas figuras 19a e 19b, respectivamente. Nas figuras 19c e 19d têm-se a imagem óptica e mapeamento 3D do filme LbL de DODAB/0,5NiTsPc, respectivamente.



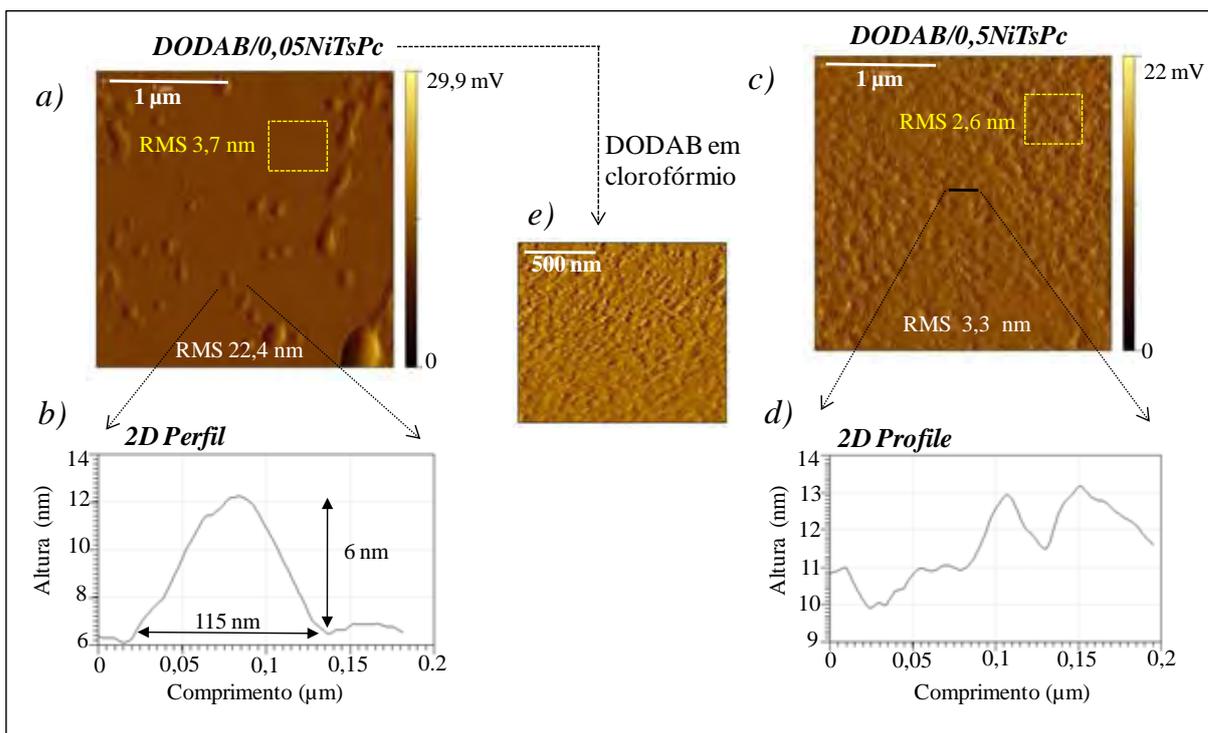
**Figura 19:** filme LbL de DODAB/0,05NiTsPc a) imagem óptica; b) mapeamento Raman 3D. Filme LbL de DODAB/0,5NiTsPc; c) imagem óptica; d) mapeamento Raman 3D.

O filme LbL de DODAB/0,05NiTsPc (figura 19a) apresenta uma superfície predominantemente uniforme com a existência de poucos agregados isolados ao longo do filme. Quantidades mais significativas de agregados, porém em menores dimensões, são observadas para o filme DODAB/0,5NiTsPc (figura 19c). O mapeamento 3D realizado no filme LbL de DODAB/0,05NiTsPc (figura 19b) mostra que no agregado há uma maior concentração de NiTsPc, causando grande variação na intensidade do espalhamento Raman, enquanto fora do agregado ocorre pouca variação. A diferença pode ser mensurada através da relação entre as intensidades máxima e mínima da banda analisada. Na região do agregado a variação é de 66% enquanto que fora do agregado não passa de 7%. Este resultado está de acordo com a imagem óptica (figura 19a) em que o filme é predominantemente uniforme com apenas uma flutuação da intensidade do espalhamento nas regiões de agregado. No mapeamento 3D do filme LbL DODAB/0,5 NiTsPc (figura 19d) observa-se que a relação entre as intensidades de máximo e mínimo da banda é de 6% fora dos agregados. Porém, ao contrário da figura 19b a flutuação da intensidade do espalhamento Raman é mais frequente, consistente com a presença de grandes quantidades de pequenos agregados.

Comportamento semelhante foi observado por Zucolotto *et al.* [ZUCOLOTTO, 2006], para filmes de PANI/FeTsPc, contendo 1,2 g/L de PANI e 1,5 g/L de FeTsPc que apresentam agregados de ordem micrométrica. Estes resultados estão de acordo também com o observado na espectroscopia de absorção UV-Vis (figura 18), a qual mostrou que o filme LbL de DODAB/0,05NiTsPc possui uma banda de absorção da forma monomérica um pouco mais intensa de que a da forma dimérica/agregados, enquanto o filme LbL de DODAB/0,5NiTsPc apresenta as mesmas intensidades das bandas para as duas formas. Além disso, os espectros de UV-Vis mostraram que o filme LbL de DODAB/0,5NiTsPc apresenta maiores valores de absorvância comparado ao filme LbL de DODAB/0,05NiTsPc para o mesmo número de

bicamadas, o que é consistente com a presença dos agregados de NiTsPc observado para o filme depositado a partir da solução de NiTsPc 0,5 mmol/L.

Para avançar na análise morfológica dos filmes de DODAB/NiTsPc, imagens de AFM da superfície dos filmes foram coletadas para a área de 2,5  $\mu\text{m}$  x 2,5  $\mu\text{m}$ . A figura 20a apresenta uma imagem de morfologia coletada no modo *tapping* (contato intermitente) para o filme LbL de DODAB/0,05NiTsPc e a figura 20b apresenta a imagem do perfil de uma vesícula para o mesmo filme. Na figura 20c é mostrada a morfologia do filme LbL contendo DODAB/0,5NiTsPc e, na figura 20d, o perfil extraído de uma região sem vesícula. Na figura 20e vê-se a morfologia de um filme de DODAB/0,05NiTsPc, porém o DODAB foi dissolvido na forma monomérica em clorofórmio [WANG, 2003], servindo como referência na análise comparativa das imagens dos filmes de DODAB/NiTsPc.



**Figura 20:** filme LbL de DODAB/0,05NiTsPc a) imagem de AFM da morfologia; b) perfil de uma vesícula. Filme LbL contendo DODAB/0,5NiTsPc; c) imagem de AFM da morfologia; d) perfil de uma região sem vesícula; e) imagem de AFM da morfologia para um filme LbL de DODAB/0,05NiTsPc, porém para o DODAB disperso em clorofórmio.

Na imagem da figura 20a (DODAB/0,05NiTsPc) observa-se a presença de vesículas de DODAB espalhadas por toda a região analisada, com diâmetros que variam entre 100 e 200 nm (foram analisados 20 tamanhos de vesículas). Para outras regiões analisadas, há ainda vesículas com menos de 100 nm de diâmetro ou com até 400 nm de diâmetro. Analisando o perfil obtido de uma destas vesículas (figura 20b), temos as dimensões de 115 nm de diâmetro e altura de aproximadamente 6 nm, revelando uma forma circular achatada (não esférica). Moraes *et al.* [MORAES, 2008] imobilizaram lipossomos de DPPG (dipalmitoilfosfatidilglicerol) (sal de sódio) com PAMAM em filmes LbL com diâmetro dos lipossomos de DPPG em torno de 120 nm. Feitosa *et al.* [FEITOSA, 2006] reportou vesículas de DODAB com raio hidrodinâmico entre 80 e 337 nm, Lopes *et al.*, [LOPES, 2008] reportam vesículas de DODAB com diâmetros em torno de 200 nm. Assim, as vesículas presentes neste trabalho são da mesma ordem de tamanho das reportadas na literatura.

Para o filme LbL de DODAB/0,5NiTsPc (figura 20b) não foi verificada a presença de vesículas na região analisada. Este resultado é semelhante ao obtido para o filme LbL de DODAB/NiTsPc com o DODAB disperso em clorofórmio (figura 20e), condição na qual não ocorre formação de vesículas. O perfil obtido da superfície do filme LbL DODAB/0,5NiTsPc indica apenas a presença de irregularidades, diferente da estrutura de vesícula mostrada na figura 20a. Pode-se concluir que os filmes de DODAB/0,5NiTsPc não formam vesículas, como os filmes LbL de DODAB dissolvidos em clorofórmio com NiTsPc 0,05 mmol/L.

Os resultados de AFM são consistentes com os obtidos pelas análises de DSC para a dispersão de DODAB em soluções de NiTsPc (figura 11). A formação de vesículas de DODAB em solução de NiTsPc 0,05 mmol/L, indicado pelos resultados de DSC são confirmados nas imagens de AFM, as quais revelam a presença de vesículas imobilizadas nos filmes LbL crescidos nas mesmas condições. As análises de DSC também indicaram a não formação de vesículas de DODAB disperso em solução de NiTsPc 0,5 mmol/L. Este

resultado também está de acordo com as imagens de AFM dos filmes fabricados a partir das mesmas condições, para as quais não foram verificadas presença de vesículas.

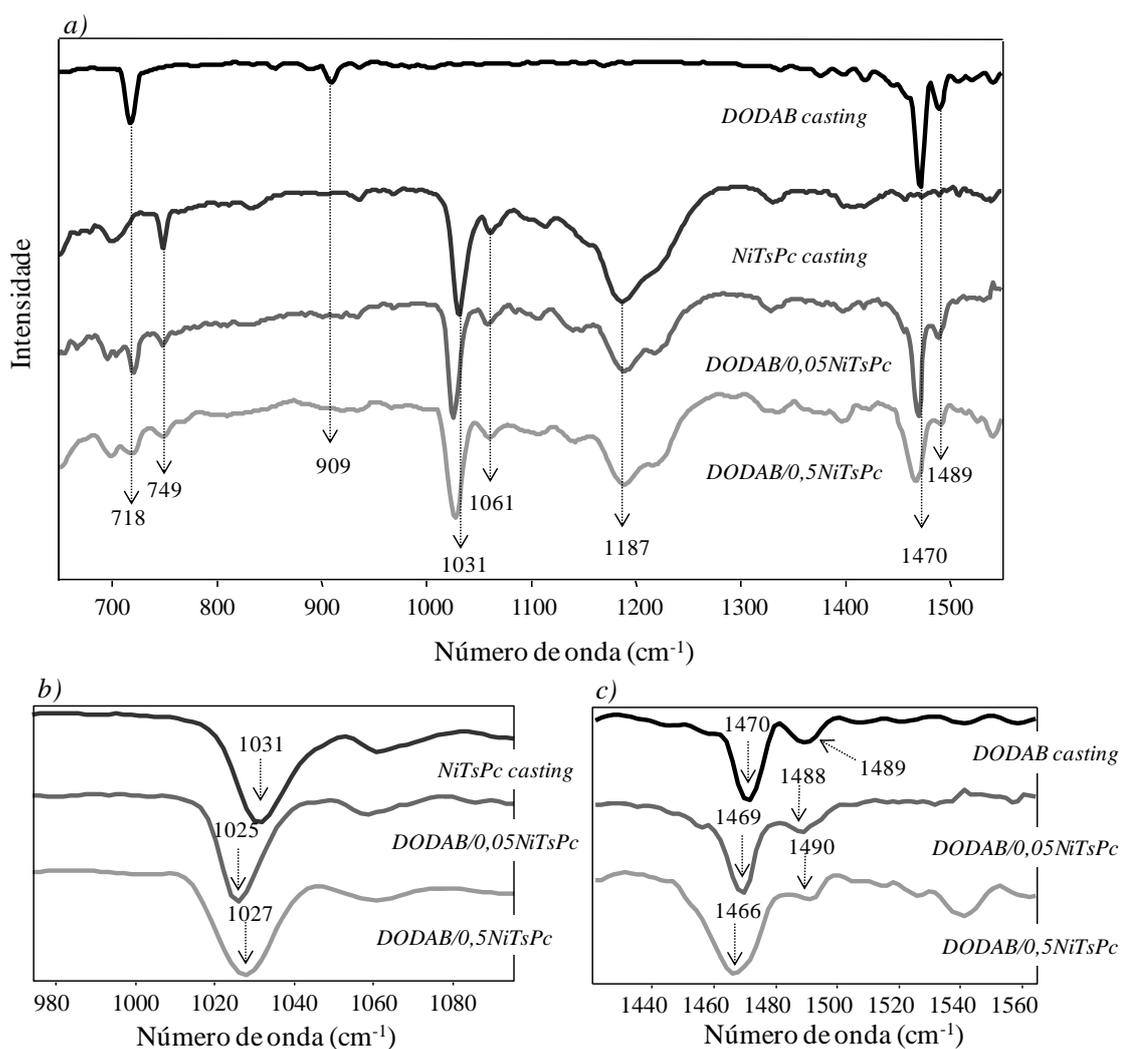
Informações adicionais podem ser obtidas através da análise da rugosidade da superfície dos filmes. A RMS (raiz quadrática média) da rugosidade medida para a área analisada do filme LbL contendo DODAB/0,05NiTsPc (figura 20a) é de 22,4 nm e para o filme LbL DODAB/0,5NiTsPc é de 3,3 nm (figura 20c). O alto valor de RMS para a figura 20a está relacionado à presença das vesículas, já que o filme LbL de DODAB/0,05NiTsPc tem pequeno valor de RMS, em torno de 3,7 nm, quando medido em uma região onde não há vesículas (região quadrada destacada na figura 20a). Para outras regiões analisadas a RMS da rugosidade é de 49,5 nm e 19,8 nm, na presença de vesículas grandes (~ 400 nm) e pequenas (~ 80 nm), respectivamente. Siqueira Jr. *et al.* [SIQUEIRA, 2007] compararam a morfologia, via AFM, de filmes finos de poliamidoamina (PAMAN) com NiTsPc e poliamidoamina (PAMAN) contendo nanopartículas de platina com NiTsPc e obtiveram baixa rugosidade para os dois filmes, em torno de 5,0 nm. Porém, o filme com nanopartículas de platina apresentava uma superfície globular. Os trabalhos de Rodríguez *et al.* [RODRIGUEZ, 2010], Vergnat *et al.* [VERGNAT, 2011] e Grzadziel *et al.* [GRZADZIEL, 2003] revelam uma morfologia totalmente diferente em relação aos filmes LbL de DODAB/NiTsPc, parecendo como tiras alongadas paralelas ao substrato para filmes com diversas MPcs obtidos através da técnica PVD.

Nossos resultados revelam a possibilidade de imobilização do DODAB em filmes LbL, na forma de vesículas ou não, juntamente com a NiTsPc, dependendo da concentração de NiTsPc. Isto abre perspectivas para a utilização destes filmes, por exemplo, na incorporação de fármacos às vesículas de DODAB como receptores biológicos para uma possível interação entre fármacos e proteínas, enzimas ou drogas, atuando como biossensores. [NIKOLELIS, 1999], [MORAES, 2008 e 2010].

### 3.6 Interação molecular DODAB/NiTsPc

Há diversos mecanismos de adsorção responsáveis pelo crescimento de filmes LbL, entre eles a força iônica, ligação de hidrogênio, força de *Van der Waals*, interações hidrofóbicas, entre outras [OLIVEIRA, 2002]. Dessas, a mais comum é a força iônica originada por interações eletrostáticas a partir de soluções de cargas opostas [RAPOSO, 1998] [DECHER, 1992]. Os resultados de espectroscopia de absorção no UV-Vis (figura 18) mostraram que os filmes LbL contendo DODAB/0,05NiTsPc e DODAB/0,5NiTsPc crescem de forma controlada. Já em termos do mecanismo de interação responsável pelo crescimento do filme LbL, a hipótese é que os grupos  $N^+(CH_3)_2$  de DODAB e  $SO_3^-$  de NiTsPc possam ser os sítios ativos responsáveis pelas interações eletrostáticas entre estes materiais. Desse modo, foi realizado um estudo via FTIR para analisar as possíveis interações entre DODAB e NiTsPc.

Na figura 21a tem-se o espectro de FTIR para os filmes *casting* de DODAB disperso em água e solução aquosa de NiTsPc usados como referência para os materiais puros, além dos espectros de FTIR dos filmes LbL com 21 bicamadas de DODAB/0,05NiTsPc e DODAB/0,5NiTsPc. Na figura 21b é mostrado um *zoom* da região espectral onde foram observados deslocamentos de bandas relativas à NiTsPc e a figura 21c mostra um *zoom* da região espectral onde foram observados deslocamentos de bandas do DODAB.



**Figura 21:** espectros de FTIR a) entre 650 e 1550  $\text{cm}^{-1}$  para filmes *casting* de DODAB e de NiTsPc e filmes LbL com 21 bicamadas de DODAB/0,05NiTsPc e DODAB/0,5NiTsPc. Zoom da região; b) entre 980 e 1080  $\text{cm}^{-1}$ ; c) entre 1440 e 1560  $\text{cm}^{-1}$ .

Os espectros FTIR dos filmes *casting* (DODAB e NiTsPc) da figura 21a usados como referência são idênticos aos encontrados na literatura para estes materiais [SUGA, 1993] [SIQUEIRA, 2008]. Nas tabelas I e II são atribuídos os modos vibracionais das bandas de FTIR observadas nos espectros dos filmes *casting* de DODAB e NiTsPc da figura 21a. Para o espectro de FTIR do filme *casting* do DODAB são observadas modificações em algumas bandas comparadas aos filmes LbL. Da mesma forma, partindo do espectro de FTIR do filme

*casting* de NiTsPc como referência, são observadas mudanças espectrais comparado ao filme LbL.

Analisando a figura 21a, nota-se que a banda em  $909\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento C-N da cabeça hidrofílica  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$  de DODAB está presente apenas nos filmes *casting*. Quando DODAB está imobilizado no filme LbL, juntamente com a NiTsPc, esta banda desaparece nas concentrações de NiTsPc usadas. Já a banda em  $1031\text{ cm}^{-1}$  em destaque na figura 21b presente no filme *casting* de NiTsPc, e referente ao estiramento simétrico S-O do grupo sulfônico  $\text{SO}_3^-$ , apresenta um deslocamento para menores valores de número de onda quando NiTsPc é imobilizada nos filmes LbL. Estas mudanças sugerem que a interação entre estes materiais se dá principalmente pelos seus grupos polares, propiciando o crescimento dos filmes e confirmando nossa hipótese inicial. Zucolotto *et al.* [ZUCOLOTTO, 2003] observaram forte interação entre a FeTsPc com PAH quando estes materiais estão na forma de filme LbL, afirmando que as interações são formadas através das “pontes salinas” formadas pelos grupos  $\text{NH}_3^+$  do PAH e  $\text{SO}_3^-$  da FeTsPc, além de interações do nitrogênio do PAH com o átomo metálico central da FeTsPc. Estas interações resultaram em modificações em todo o espectro FTIR da FeTsPc. Em nosso caso, as interações entre NiTsPc e DODAB ocorrem de forma mais fraca, formadas pelos grupos  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$  de DODAB e  $\text{SO}_3^-$  da NiTsPc; porém, sem envolvimento do átomo metálico central de níquel. Também foi observada pequena diminuição da intensidade relativa da banda em  $749\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação C-H fora do plano da NiTsPc e que também pode estar relacionada à interação entre os materiais.

**Tabela I:** atribuição experimental das bandas de FTIR para o DODAB

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições
718	CH <sub>2</sub> deformação angular <sup>a</sup>
909	C-N estiramento <sup>a</sup>
1470	CH <sub>2</sub> deformação angular <sup>a</sup>
1489	CH <sub>3</sub> -N <sup>+</sup> deformação angular <sup>b</sup>
2850	CH <sub>2</sub> estiramento simétrico <sup>a,c</sup>
2917	CH <sub>2</sub> estiramento antissimétrico <sup>a,c</sup>
2953	CH <sub>3</sub> -N <sup>+</sup> estiramento antissimétrico <sup>a</sup>

a-Umemura 1984; b-Wu 2009 ; c-Wu 2011

**Tabela II:** atribuição experimental das bandas FTIR para a NiTsPc

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições
650	C-C deformação angular for a do plano (anel aromático) <sup>a</sup> C-H deformação angular for do plano <sup>d</sup>
670	Respiração do macrociclo <sup>e,c</sup> C-H deformação angular for do plano <sup>d</sup>
700	C-H deformação angular for a do plano <sup>a,d</sup> C-H deformação angular <sup>c</sup>
749	C-H deformação angular for a do plano <sup>a,b,d</sup>
838	C-H deformação angular fora do plano <sup>d</sup> ; C-H deformação angular <sup>c</sup>
935	S-O estiramento simétrico <sup>b</sup>
970	S-O estiramento simétrico <sup>b</sup>
1030	S-O estiramento simétrico <sup>b,e</sup>
1061	S-O estiramento simétrico <sup>e</sup> ; C-N estiramento <sup>d</sup>
1099	C-N estiramento <sup>d</sup>
1112	C-H deformação angular fora do plano <sup>a,d</sup>
1185	S-O estiramento antissimétrico <sup>b,e</sup> C-H deformação angular no plano <sup>d</sup>
1222	S-O estiramento antissimétrico <sup>e,d</sup>
1331	C=C e C-N estiramento do isoindol <sup>a,d,e</sup>

a-ZUCOLOTTO 2003 b-GAFFO 2004 c-BERROS 2007 d-BERTONCELLO 2008 e-VERMA 2008

Os espectros de FTIR também permitem obter informações quanto aos possíveis estados físicos das cadeias de DODAB (subgel, coagel, gel e líquido-cristalino) [KAWAI, 1985] [WU, 2009] [SEDODON, 1995] sendo descritos e detalhados por Wu *et al.* [WU, 2009, 2011]. Bandas atribuídas aos estiramentos antissimétrico ( $\sim 2916\text{ cm}^{-1}$ ) e simétrico ( $\sim 2850\text{ cm}^{-1}$ ) do grupo metileno ( $\text{CH}_2$ ) da cadeia, segundo Wu *et al.* [WU, 2011] são as mesmas para os estados subgel, coagel e gel. As bandas centradas entre  $1466\text{-}1470\text{ cm}^{-1}$ , referente à deformação  $\text{CH}_2$  da calda hidrofóbica, e  $1487\text{-}1490\text{ cm}^{-1}$ , referente à deformação antissimétrica da cabeça hidrofílica ( $\text{CH}_3\text{-N}^+$ ), são denominadas bandas-chave e úteis para o monitoramento estrutural do DODAB. Wu *et al.* [WU, 20011] reportam que nos estados subgel e coagel a deformação angular (*scissoring*) do  $\text{CH}_2$  aparece em  $1470\text{ cm}^{-1}$ , enquanto na fase gel aparece em  $1466\text{ cm}^{-1}$ . Já a deformação antissimétrica do grupo  $\text{CH}_3\text{-N}^+$  da cabeça polar na fase subgel e gel aparece em  $1487\text{ cm}^{-1}$  e na fase coagel está em  $1489\text{ cm}^{-1}$ .

A banda em  $1470\text{ cm}^{-1}$  em destaque na figura 21c presente no filme *casting* do DODAB apresenta algumas mudanças quando comparada aos filmes LbL de DODAB/0,05NiTsPc e DODAB/0,5NiTsPc, sendo deslocada para  $1469$  e  $1466\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Isto sugere que, segundo Wu *et al.*, o DODAB no filme *casting* e no filme LbL de DODAB/0,05NiTsPc foi imobilizado no estado subgel ou coagel (mais empacotado e ordenado) e no filme LbL DODAB/0,5NiTsPc foi imobilizado no estado gel. A outra banda-chave, localizada entre  $1487\text{-}1489\text{ cm}^{-1}$  para os filmes DODAB/0,05NiTsPc e DODAB/0,5NiTsPc não é simétrica, como resultado de uma superposição de bandas, sugerindo a presença de distintos estados, consistentes com os resultados de DSC.

### 3.7 Aplicação sensorial

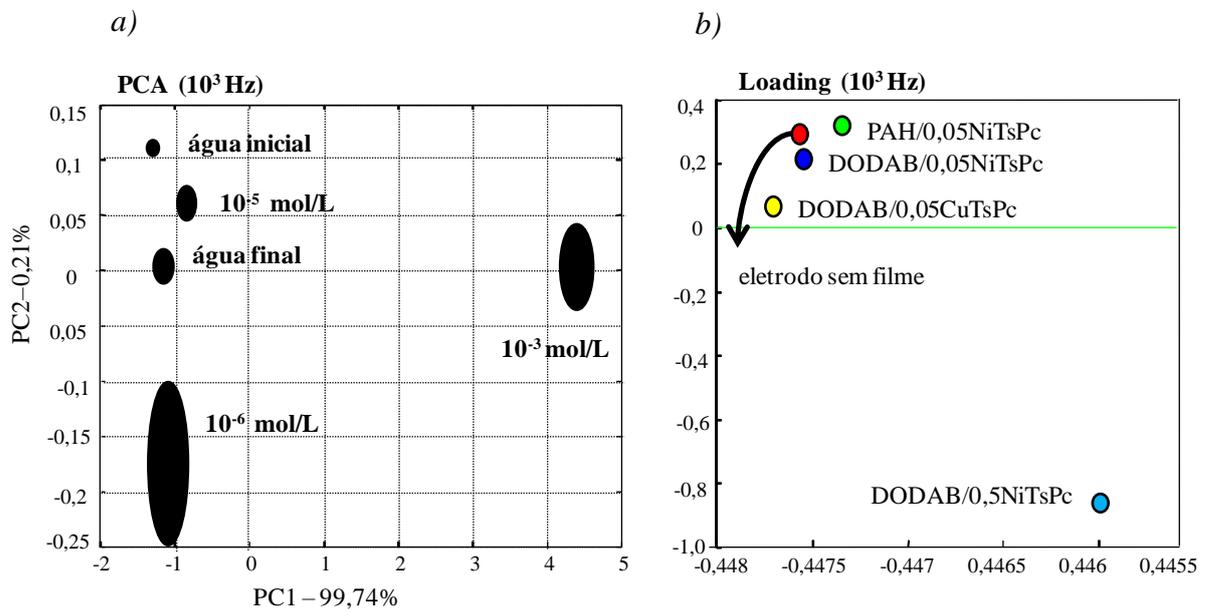
A fim de verificar o desempenho dos filmes de DODAB/0,05NiTsPc e DODAB/0,5NiTsPc como elementos transdutores de sinal em unidades sensoriais, uma língua

eletrônica [RIUL, 2002] foi montada a partir da deposição de filmes finos sobre eletrodos interdigitados formando unidades sensoriais para a discriminação de soluções contendo dopamina. A dopamina faz parte de um grupo de aminas aromáticas denominado catecolamina que atuam como neurotransmissores presentes no sistema nervoso central dos mamíferos. De modo geral, seu metabolismo está relacionado ao Mal de Parkinson, esquizofrenia, depressão, entre outros [VENTON, 2003]. Essas doenças são relacionadas a distúrbios na concentração da dopamina nas vias neurais. Desse modo, diversos estudos têm sido realizados na detecção da dopamina [FABREGAT, 2011] [CHEN, 2006] [WANG, 2001]. Kang *et al.* [KANG, 1997] revestiram eletrodos com filmes de p-NiTAPc (ftalocianina tetra-amino de níquel) através da técnica eletropolimerização e obtiveram um limite de detecção para a dopamina de  $9,0 \times 10^{-8}$  mol/L. Wang *et al.* [WANG, 2001] conseguiram um limite de detecção de  $3,0 \times 10^{-6}$  mol/L para a dopamina com eletrodos recobertos com uma única camada de ácido fíolático (TLA), além de trabalhos como o de Ferreira *et al.* [FERREIRA, 2004] que utilizaram filmes LB da mistura de PANI com complexos de rutênio para a detecção de dopamina em solução obtida de um medicamento disponível no mercado.

### **3.7.1 Eletrodos interdigitados sem recobrimento de PAH/PSS**

Inicialmente a língua eletrônica usada foi composta por 5 unidades sensoriais com diferentes tipos de filmes que recobrem os eletrodos interdigitados: filmes LbL de DODAB/0,05NiTsPc, DODAB/0,5NiTsPc, PAH/0,05NiTsPc e DODAB/0,05CuTsPc, todos com 5 bicamadas, além de um eletrodo sem a presença de filme. Estas unidades sensoriais foram empregadas na discriminação de soluções de dopamina nas concentrações de  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-3}$  mol/L, além de água ultrapura utilizada no início e no final das medidas, via espectroscopia de impedância (capacitância real vs. frequência). Estes dados de capacitância foram analisados por meio da análise das componentes principais (PCA), um método

estatístico que permite encontrar padrões e agrupar respostas mais semelhantes para um conjunto de dados [JOLLIFFE, 1986] [BEEBE, 1998]. A figura 22a apresenta um gráfico da análise de PCA onde foram correlacionados valores de capacitância coletados em uma frequência fixa de 1 kHz [AOKI, 2009] na qual os valores coletados de capacitância estão na região em que domina as propriedades do filme fino (entre  $10^2$  e  $10^4$  Hz) de todas as unidades sensoriais para a discriminação das amostras contendo dopamina.

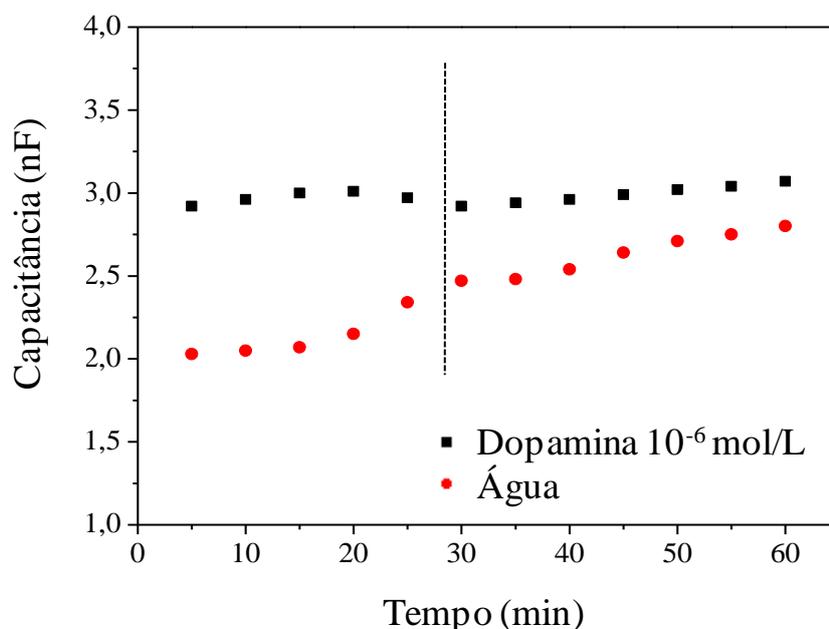


**Figura 22:** a) PCA gerada a partir dos valores de capacitância coletados em 1 kHz para todas as unidades sensoriais. A área hachurada indica a dispersão das medidas realizadas (5 repetições para cada solução); b) *loading* para PC1 vs. PC2.

Desse modo a análise estatística via PCA é proposta para que possam ser identificados padrões nas repostas das unidades sensoriais para as soluções. Cada região destacada na figura 22a consiste na resposta de todos os eletrodos, fornecendo a análise global do conjunto de unidades sensoriais. É possível verificar pela figura 22a que ocorre dispersão das cinco medidas realizadas para a solução de  $10^{-6}$  mol/L, não ocorrendo para as demais. A PCA conseguiu distinguir todas as soluções desde a mais concentrada ( $10^{-3}$  mol/L) até a menos

concentrada ( $10^{-6}$  mol/L), inclusive conseguiu separar a concentração menos concentrada das águas inicial e final. A fim de complementar a análise da PCA, foi feito o diagrama de *loading* mostrado na figura 22b. O *loading* classifica as unidades sensoriais em um diagrama 2D e pode ser interpretado como o “peso” de cada variável original, assim a distância entre as unidades indicam o quão semelhantes são. A semelhança na resposta entre as unidades sensoriais recobertas com filme fino (exceto DODAB/0,5NiTsPc) e a unidade sensorial sem filme chama a atenção. Há o indício de que essa semelhança seja devido à perda de material enquanto as medidas estão sendo realizadas.

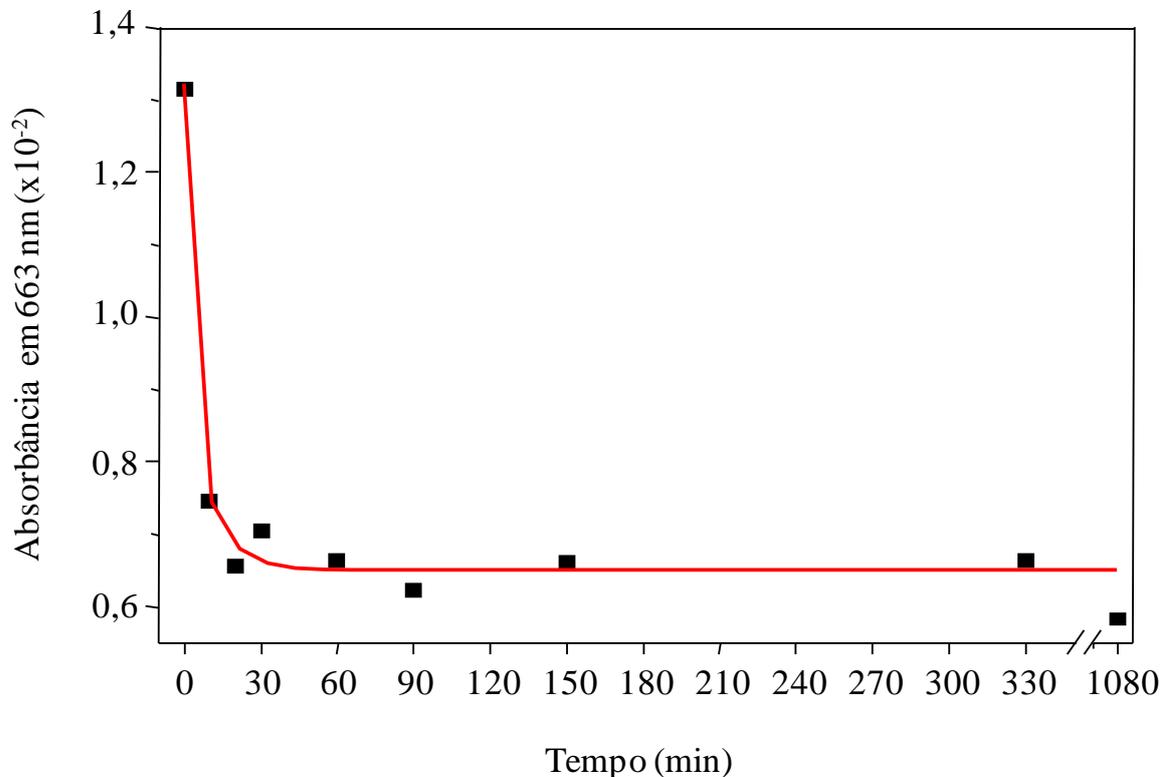
É importante ressaltar, porém, que testes de estabilização foram realizados previamente às medidas de impedância, imergindo uma unidade sensorial (no caso, DODAB/0,05NiTsPc) em água ultrapura e em solução de dopamina ( $10^{-6}$  mol/L). A figura 23 mostra as curvas de capacitância coletadas a cada 5 minutos durante uma hora.



**Figura 23:** estabilização do sinal para a unidade sensorial DODAB/0,05NiTsPc imersa em água ultrapura e logo em seguida em dopamina  $10^{-6}$  mol/L. Valores de capacitância coletados em 1 kHz.

Os resultados, mostrados na figura 23, apontaram que 30 minutos são suficientes para a estabilização do sinal elétrico. Assim, para todas as unidades sensoriais, foram esperados 30 minutos para que ocorresse a estabilização do sinal elétrico antes das curvas de capacitância serem obtidas. O tempo de 30 minutos necessário para estabilização do sinal indica que já houve uma perda do filme depositado sobre o eletrodo imerso na solução. Este efeito associado às sucessivas imersões da unidade sensorial nas diferentes soluções podem ter ocasionado quase que a perda total de material sobre as unidades sensoriais.

A perda de material ocasionada pelas sucessivas imersões foi avaliada produzindo um filme LbL de DODAB/0,05NiTsPc com 5 bicamadas sobre o quartzo. A figura 24 mostra a absorbância do filme LbL de DODAB/0,05 NiTsPc mantido imerso em água ultrapura em intervalos de tempo acumulativos em que após cada imersão foi coletado um espectro UV-Vis.



**Figura 24:** absorbância do filme LbL de DODAB/0,05NiTsPc em função do tempo acumulado de imersão em água ultrapura.

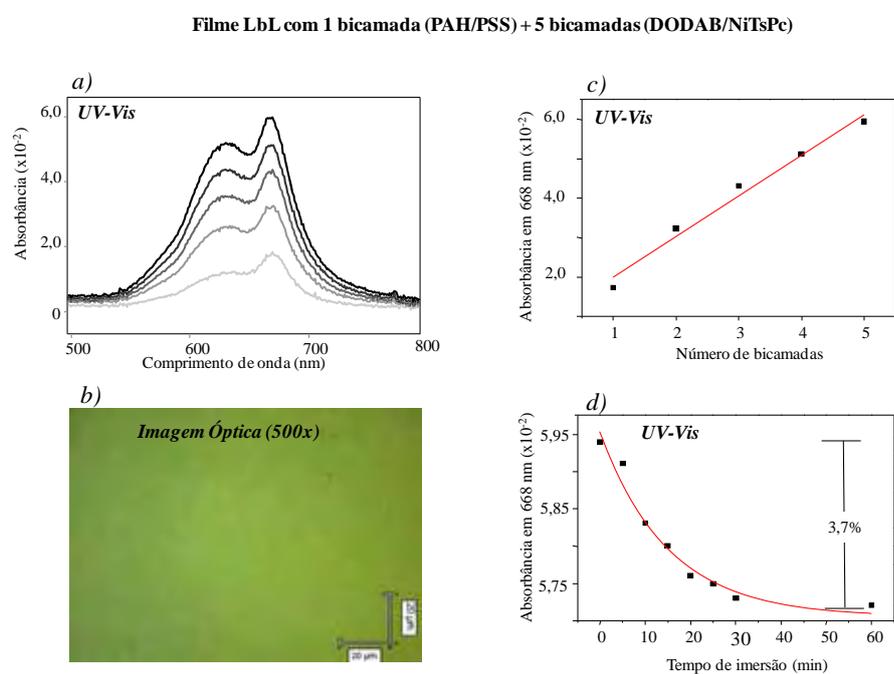
O resultado, mostrado na figura 24, indica que após a primeira imersão do filme na água ultrapura ocorre perda de quase a metade do filme (~ 47%), provavelmente devido à fraca interação entre o DODAB e a NiTsPc discutida na seção 3.6. Assim a perda de material devido à estabilização do sinal associada a perda devido as sucessivas imersões fazem com que as unidades sensoriais recobertas com filme LbL comportam-se como a unidade sensorial sem recobrimento. Desse modo, procurou-se uma solução para a perda de material ocasionada pelas sucessivas imersões durante as medidas, que será discutido na próxima seção.

### **3.7.2 Eletrodos interdigitados com prévio recobrimento de PAH/PSS**

Para contornar o problema da perda de material foi proposta uma deposição prévia de um suporte com polieletrólitos que poderá ajudar na fixação do filme sobre o substrato ou minimizar os efeitos do substrato sobre o filme. Moraes *et al.* [MORAES, 2010], por exemplo, depositou previamente sobre as unidades sensoriais duas bicamadas de filme LbL de PAH/PVS (poli(sulfonato de vinil) para minimizar os efeitos do substrato. Em nosso caso, para avaliar a eficiência do suporte foram fabricados três filmes com arquiteturas distintas. Os dois polieletrólitos escolhidos foram o PAH e o PSS, muito utilizados na literatura [DECHER, 1992] [FERREIRA, 1995], que são catiônico e aniônico, respectivamente.

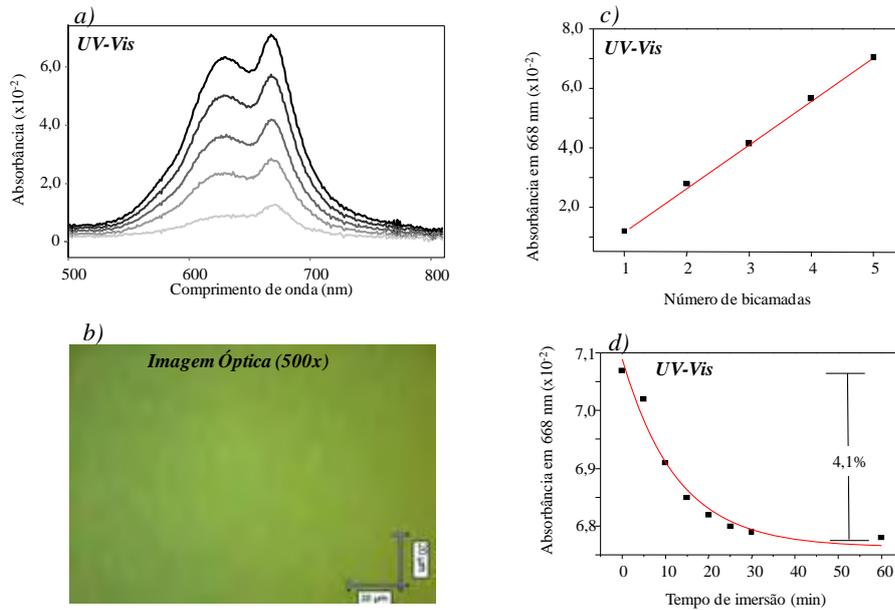
Os espectros de absorção no UV-Vis dos filmes DODAB/0,05NiTsPc sobre uma e duas bicamadas de PAH/PSS e sobre uma bicamada de PAH/NiTsPc são mostrados nas figuras 25a, 26a e 27a. As imagens ópticas dos filmes DODAB/0,05NiTsPc sobre uma e duas bicamadas de PAH/PSS e sobre uma bicamada de PAH/NiTsPc são mostradas nas figuras 25b, 26b e 27b. O valor da absorbância em 668 nm em função das bicamadas depositadas são mostrados nas figuras 25c, 26c e 27c para os filmes DODAB/0,05NiTsPc sobre uma e duas bicamadas de PAH/PSS e sobre uma bicamada de PAH/NiTsPc, respectivamente. As figuras 25d, 26d e 27d apresentam o valor da absorbância em função do tempo acumulativo de

imersão do substrato em água ultrapura para os filmes DODAB/0,05NiTsPc sobre uma e duas bicamadas de PAH/PSS e sobre uma bicamada de PAH/NiTsPc, respectivamente.



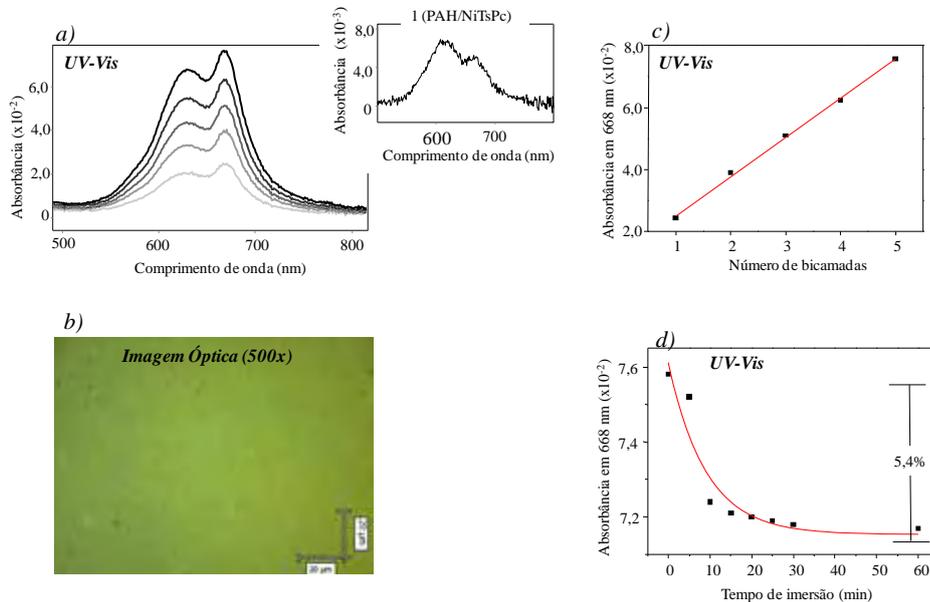
**Figura 25:** filme LbL DODAB/0,05NiTsPc sobre uma bicamada de PAH/PSS a) espectro de absorção no UV-Vis; b) imagem óptica; c) valor da absorbância em função das bicamadas; d) valor da absorbância em função do tempo acumulado de imersão do substrato em água ultrapura.

Filme LbL com 2 bicamadas (PAH/PSS) + 5 bicamadas (DODAB/NiTsPc)



**Figura 26:** filme LbL DODAB/0,05 NiTsPc sobre duas bicamadas de PAH/PSS a) espectro de absorção UV-Vis; b) imagem óptica; c) valor da absorbância em função das bicamadas; d) valor da absorbância em função do tempo acumulado de imersão do substrato em água ultrapura.

Filme LbL com 1 bicamada (PAH/NiTsPc) + 5 bicamadas (DODAB/NiTsPc)



**Figura 27:** filme LbL DODAB/0,05 NiTsPc sobre uma bicamada de PAH/NiTsPc a) espectro de absorção UV-Vis, detalhe para a absorção da primeira bicamada; b) imagem óptica; c) valor da absorbância em função das bicamadas; d) valor da absorbância em função do tempo acumulado de imersão do substrato em água ultrapura.

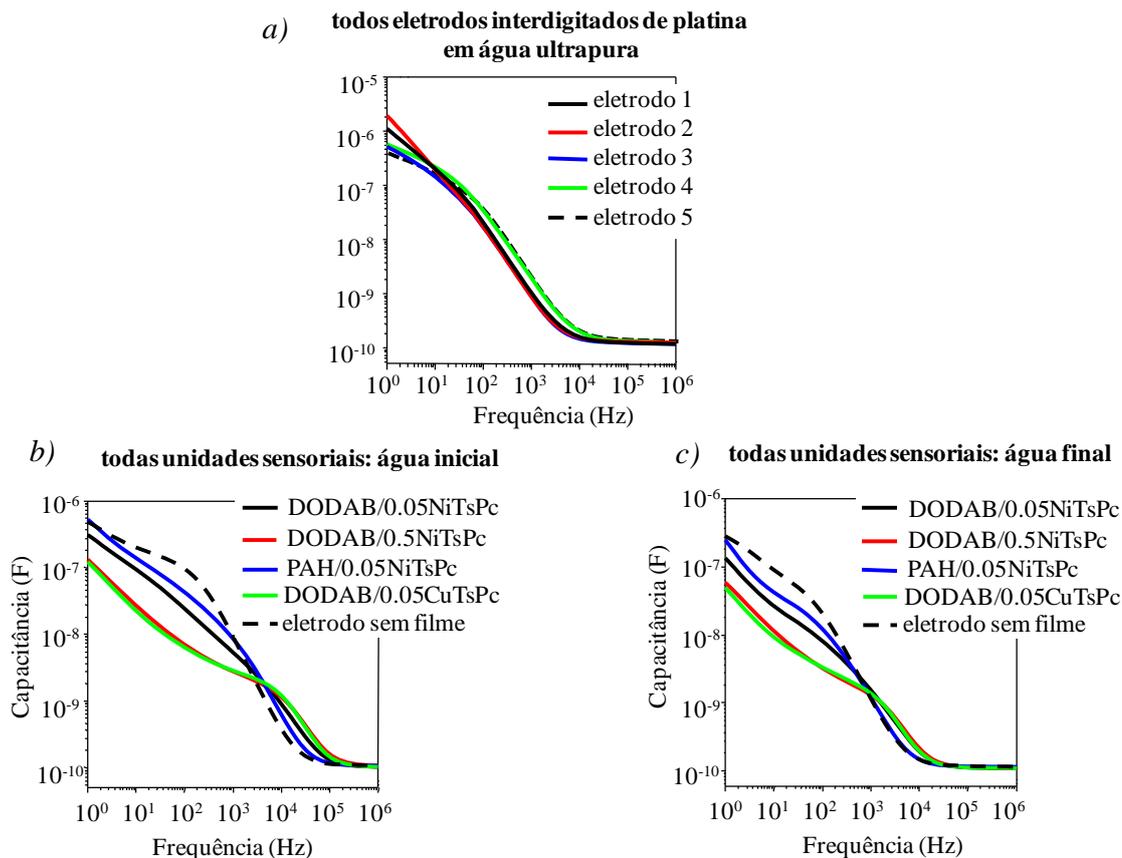
Os espectros de absorção no UV-Vis (figuras 25a, 26a e 27a) revelam o mesmo padrão de crescimento dos filmes, como observado para a figura 18a, e estes crescimentos são lineares como mostram as figuras 25c, 26c e 27c indicando que a mesma quantidade de material é depositada a cada ciclo de deposição, respectivamente. O destaque da figura 27a mostra uma inversão das intensidades da banda Q da NiTsPc. A intensidade da banda da forma agregada (633 nm) é maior que a intensidade da banda da forma monomérica (669 nm). Com a sequência de deposição de DODAB e NiTsPc a banda da forma monomérica volta a prevalecer sobre a forma agregada. As figuras 25b e 26b mostram filmes predominantemente homogêneos enquanto a figura 27b apresenta poucos e pequenos agregados espalhados pelo filme. Este resultado é condizente com o destaque da figura 27a. Os resultados (valor da absorvância em função do tempo de imersão) após as sucessivas imersões dos substratos em água ultrapura mostram que a perda de material dos substratos (figuras 25d, 26d e 27d) é relativamente pequena quando comparada à perda de material dos substratos sem a prévia deposição dos polieletrólitos (figura 24). Assim, foi escolhida a prévia deposição de uma bicamada de PAH/PSS sobre os eletrodos interdigitados para a sequência de experimentos por considerarmos que esta arquitetura é a que menos influenciaria nas propriedades das unidades sensoriais.

### **3.7.3 Língua eletrônica**

Assim, nas unidades sensoriais foram depositadas previamente uma bicamada de PAH/PSS com posterior deposição dos filmes de DODAB/0,05NiTsPc; DODAB/0,5NiTsPc; PAH/0,05NiTsPc e DODAB/0,05CuTsPc. Estas unidades foram imersas em soluções de dopamina nas seguintes concentrações:  $10^{-6}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-4}$ ;  $3,0 \times 10^{-4}$ ;  $6,0 \times 10^{-4}$  e  $10^{-3}$  mol/L, além da água ultrapura. A escolha dos filmes que recobrem as unidades sensoriais possibilita as seguintes comparações: i) comparando as unidades sensoriais DODAB/0,05NiTsPc e

DODAB/0,5NiTsPc podemos investigar a influência da concentração de NiTsPc, ii) com as unidades DODAB/0,05NiTsPc e PAH/0,05NiTsPc podemos inferir no desempenho do DODAB e iii) comparando as unidades DODAB/0,05NiTsPc e DODAB/0,05CuTsPc podemos avaliar a influência do átomo metálico (Ni ou Cu) na discriminação das soluções.

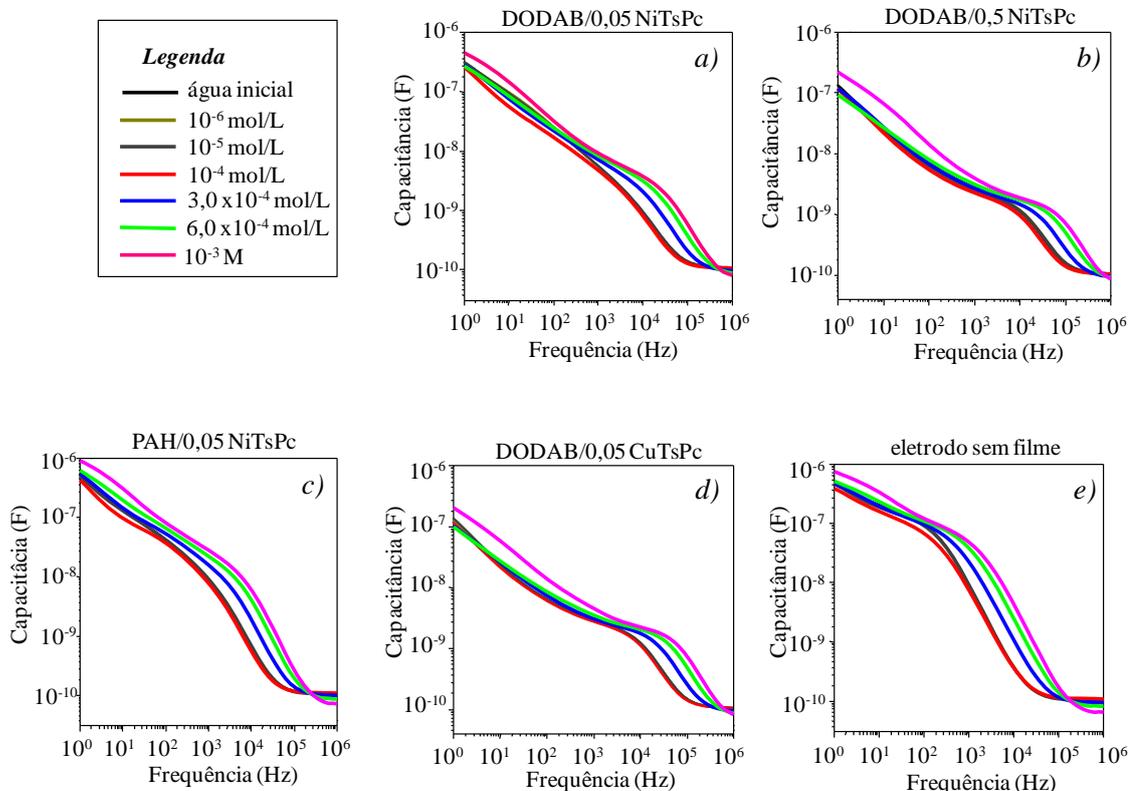
A figura 28a mostra as curvas da capacitância real x frequência de todos os eletrodos interdigitados de platina imersos em água ultrapura antes da deposição dos filmes LbL. A similaridade entre as curvas garante a reprodutibilidade dos eletrodos limpos em termos da sua geometria e resposta elétrica. Isto garante que qualquer diferença na resposta elétrica de cada unidade sensorial seja devido ao filme e não a uma possível diferença gerada na fabricação dos eletrodos interdigitados de platina. As figuras 28b e 28c mostram as curvas da capacitância real vs. frequência de todas unidades sensoriais imersas na água ultrapura inicial (antes dos experimentos sensoriais) e na água ultrapura final (depois dos experimentos sensoriais), respectivamente. Portanto, as mudanças observadas nas curvas de capacitância comparando as figuras 28a (eletrodos sem filme em água ultrapura) e 28b (unidades de detecção em água ultrapura) podem ser atribuídas exclusivamente à presença dos filmes LbL e não a diferenças entre os eletrodos interdigitados de platina. A utilização de diferentes materiais recobrando os eletrodos interdigitados dá diferentes curvas de capacitância, ou seja, as unidades sensoriais respondem de modo diferente (água ultrapura neste caso). Além disso, as diferenças entre as figuras 28a (eletrodos interdigitados de platina em água ultrapura) e 28c (unidades sensoriais em água ultrapura) revela que os filmes LbL não foram retirados das unidades sensoriais durante os experimentos sensoriais. Também a similaridade entre as curvas de capacitância vs. frequência (figuras 28b e 28c) mostra que as unidades sensoriais não sofreram danos significativos durante os experimentos.



**Figura 28:** curvas de capacitância real vs. frequência para a) eletrodos interdigitados de platina sem filme imersos em água ultrapura (antes da deposição do filme LbL) e para unidades sensoriais (eletrodos interdigitados de platina cobertos com filme LbL) imersos em b) água ultrapura inicial (antes dos experimentos sensoriais) e c) água ultrapura final (após os experimentos sensoriais).

A figura 29 mostra curvas típicas da capacitância real vs. frequência para todas as unidades sensoriais imersas na água inicial e soluções aquosas de dopamina ( $10^{-6}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-4}$ ;  $3,0 \times 10^{-4}$ ;  $6,0 \times 10^{-4}$  e  $10^{-3}$  mol/L). Como tendência geral, nota-se um aumento da capacitância, principalmente na região de resposta do filme ( $10^2 - 10^5$  Hz), para concentrações de dopamina maiores que  $10^{-4}$  mol/L independente da unidade de detecção. Em contrapartida, a superposição das curvas de capacitância é observada para concentrações de dopamina inferiores a  $10^{-4}$  mol/L. Portanto, análises estatísticas foram aplicadas novamente, não apenas para melhorar o tratamento dos dados obtidos via língua eletrônica quanto a

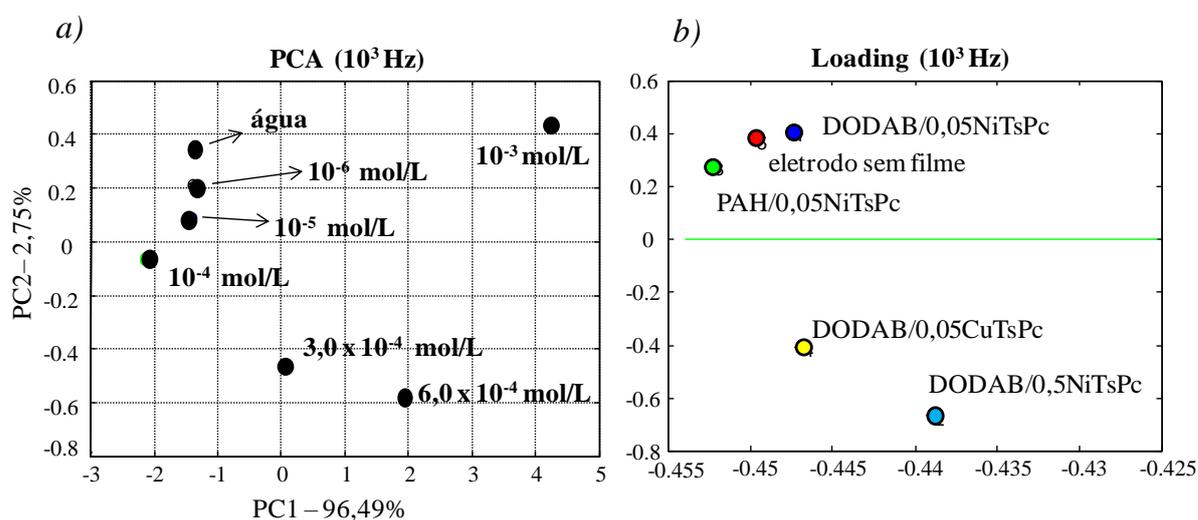
distinção de soluções aquosas de dopamina em diferentes concentrações, mas também para fornecer informação a respeito de cada unidade sensorial.



**Figura 29:** curvas de capacitância vs. frequência para filmes LbL com 5 bicamadas de de a) DODAB/0.05NiTsPc; b) DODAB/0.5NiTsPc; c) PAH/0.05NiTsPc; d) DODAB/0.05CuTsPc; e) eletrodo sem filme imersos em  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $3,0 \times 10^{-4}$ ,  $6,0 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-3}$  mol/L de solução aquosa de dopamina, como também em água ultrapura inicial (antes dos experimentos de sensoriamento).

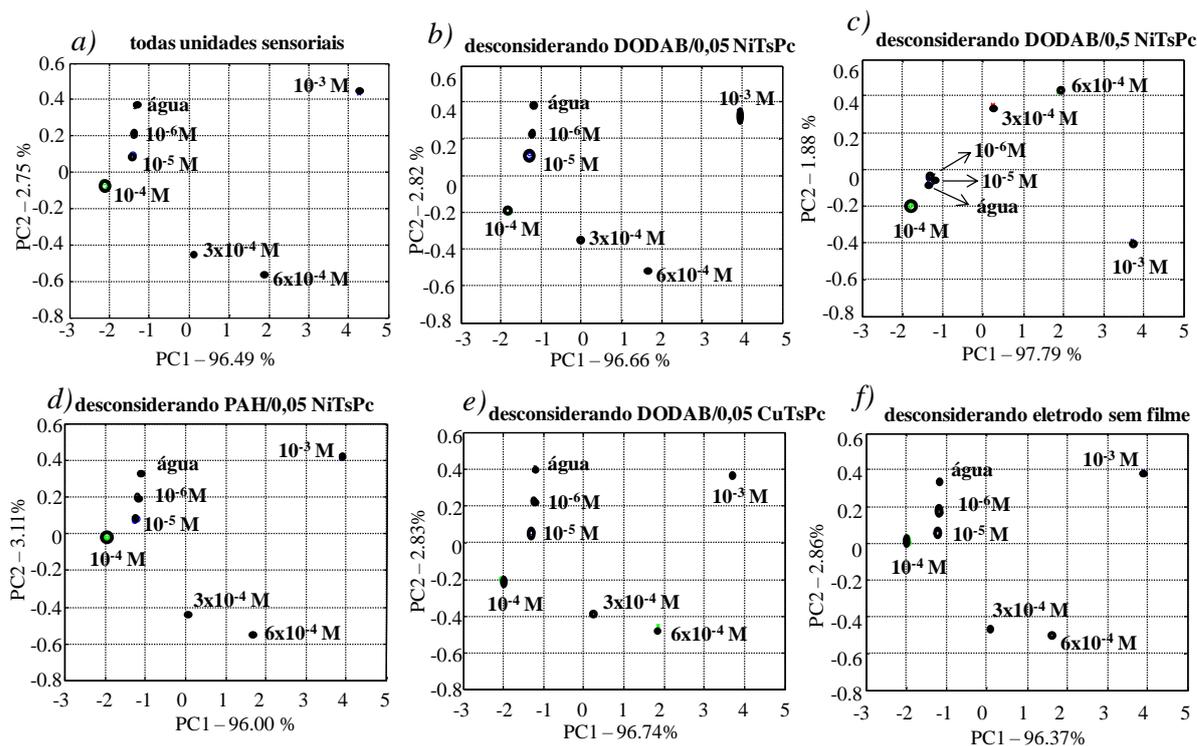
A figura 30a mostra o PCA com os valores da capacitância tomados em 1 kHz para cada unidade sensorial, similar por trabalhos previamente relatados [AOKI, 2009] [OLIVATI, 2009]. Portanto, cada grupo no diagrama do PCA corresponde a resposta de todas as unidades sensoriais, fornecendo assim uma análise mais qualitativa da língua eletrônica. Está claro na figura 30a que todas as concentrações de dopamina estão separadas em distintas regiões do PCA, isto é, a língua eletrônica consegue distinguir diferentes concentrações de soluções aquosas de dopamina no intervalo investigado neste trabalho. Complementarmente, a figura 30b apresenta o diagrama de *loading* que classifica as unidades sensoriais em um diagrama

2D, considerando as similaridades das respostas elétricas entre as unidades sensoriais. Pode ser visto que as unidades sensoriais podem ser classificadas em dois grupos principais: (i) eletrodo sem filme, PAH/0,05 NiTsPc e DODAB/0,05 NiTsPc; (ii) DODAB/0,5 NiTsPc e DODAB/0,05 CuTsPc. Esta classificação pode ser atribuída à espessura dos filmes LbL, pois foi encontrado via AFM que os filmes do grupo (ii) são em torno de duas vezes mais espessos que os do grupo (i), revelando a importância desempenhada pela espessura, mais do que o tipo de átomo metálico na ftalocianina (Ni e Cu) ou até mesmo o tipo de material (PAH e DODAB) neste caso.



**Figura 30:** PCA considerando os valores da capacitância coletados em  $10^3$  Hz para todas unidades sensoriais em soluções aquosas de dopamina ( $10^{-6}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-4}$ ;  $3,0 \times 10^{-4}$ ;  $6,0 \times 10^{-4}$  e  $10^{-3}$  mol/L); b) *loading* para PC1 vs. PC2.

A importância de cada unidade sensorial na distinção das concentrações de dopamina também foi avaliada através de possíveis mudanças no padrão do PCA quando uma unidade sensorial é removida [AOKI, 2009]. A figura 31a mostra o PCA para todas as unidades sensoriais (apenas por comparação) e as figuras 31b-f mostram o PCA sem uma das unidades sensoriais. Brevemente, a principal mudança no padrão do PCA ocorre quando é removida a unidade sensorial com o filme LbL DODAB/0,5NiTsPc, sugerindo que esta unidade sensorial é a que desempenha um papel mais importante na discriminação de dopamina.



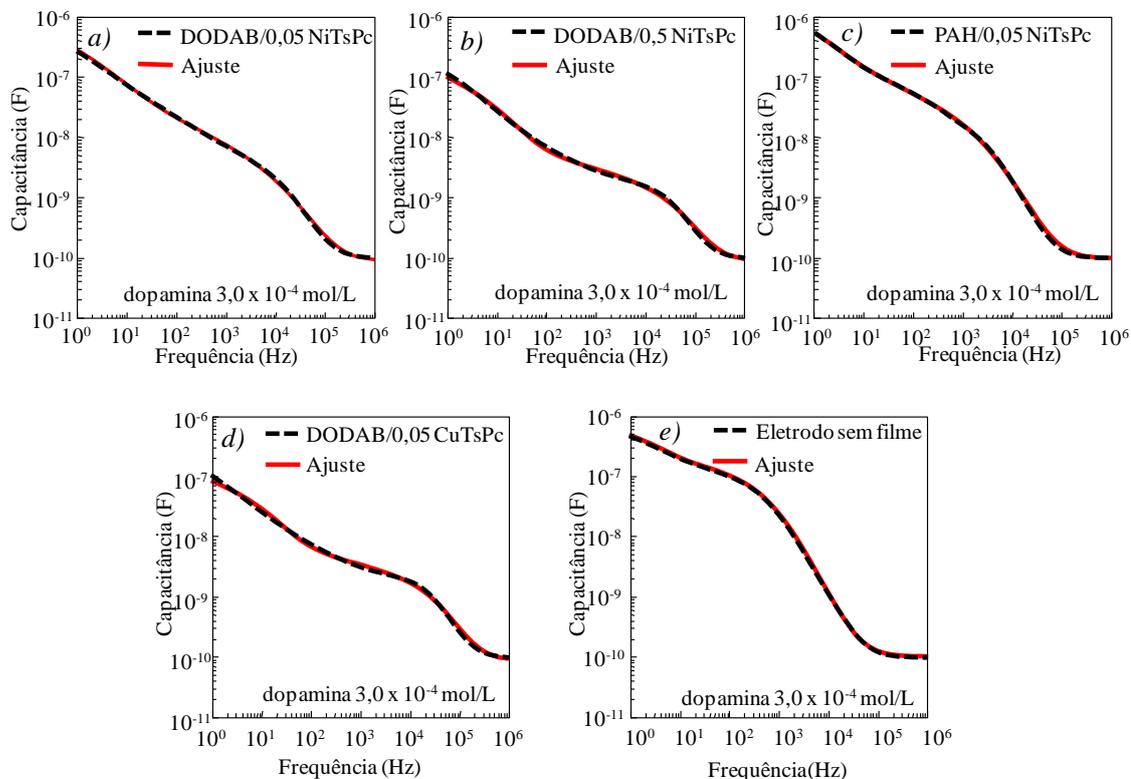
**Figura 31:** PCA com a) todas as unidades sensoriais, b) desconsiderando DODAB/0,05 NiTsPc, c) desconsiderando DODAB/0,5 NiTsPc, d) desconsiderando PAH/0,05 NiTsPc, e) desconsiderando DODAB/0,05 CuTsPc e f) desconsiderando o eletrodo sem filme.

O circuito equivalente proposto por Taylor e McDonald [TAYLOR, 1987] foi aplicado para ajustar os dados dos experimentos de impedância. O ajuste obtido com as unidades sensoriais imersas em uma das soluções de dopamina ( $3,0 \times 10^{-4}$  mol/L) é mostrado na figura 32. Complementar às análises de PCA, os valores obtidos para cada componente do circuito equivalente mostrado na figura 33 permite extrair informações relevantes em relação aos experimentos sensoriais. i) Os dados das unidades sensoriais PAH/0,05NiTsPc e DODAB/0,05NiTsPc foram ambos ajustados sem o elemento Rb (resistência do filme) do circuito equivalente, indicando um comportamento capacitivo principal para estas unidades, o que pode estar intimamente relacionado com a menor espessura destes filmes. ii) As unidades sensoriais DODAB/0,05CuTsPc e DODAB/0,5NiTsPc apresentaram valores de Rb de  $10^5$  e  $10^6 \Omega$ , respectivamente, sendo consistente com suas maiores espessuras. iii) Todas as unidades sensoriais mostraram uma diminuição nos valores de Rd (resistência da dupla

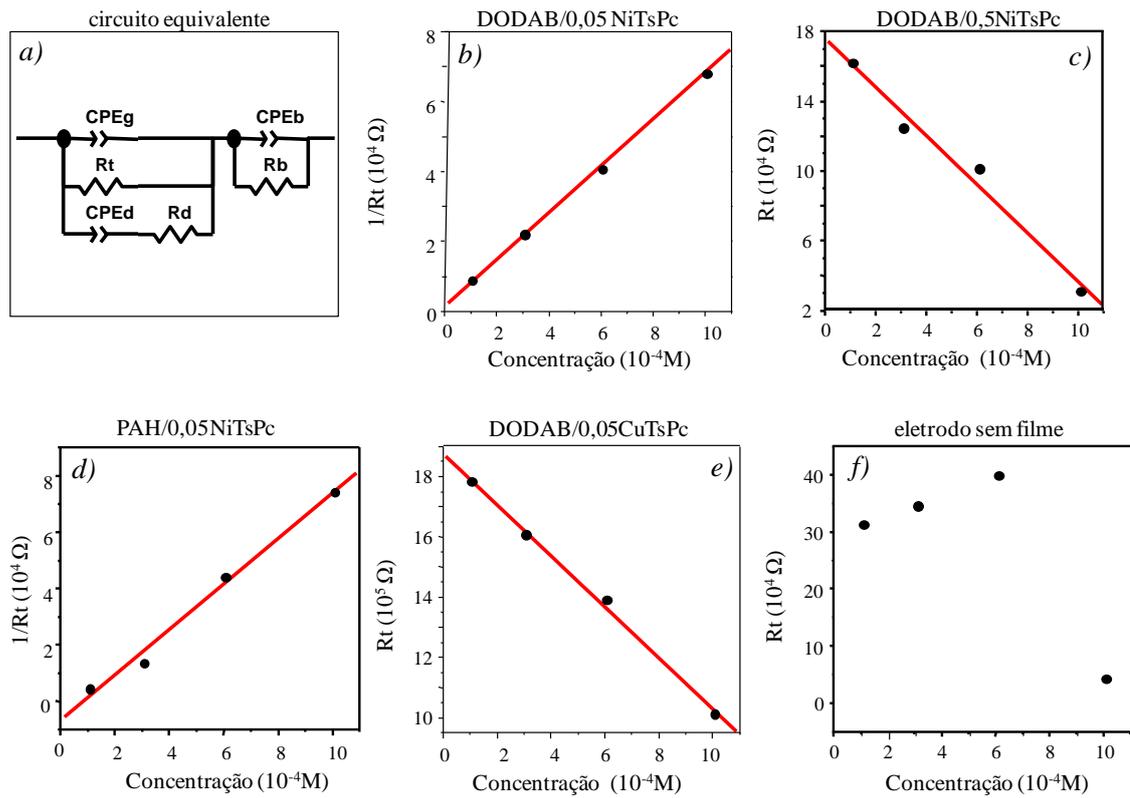
camada) e  $R_t$  (transferência de carga) com o aumento da concentração da solução de dopamina (exceto o eletrodo sem filme no caso do  $R_t$ ). Os resultados descritos em i) e ii) estão de acordo com a discussão do *loading plot* (figura 30b), onde dois grupos com diferentes contribuições principais para o *loading plot* foram determinados. Um grupo composto pelas unidades sensoriais com DODAB/0,5NiTsPc e DODAB/0,05CuTsPc e outro composto pelas unidades sensoriais com PAH/0,05NiTsPc, DODAB/0,05NiTsPc e eletrodo sem filme.

Além disso, os valores de  $R_d$  (resistência da dupla camada) e  $R_t$  (transferência de carga) encontrados para todas unidades sensoriais para concentrações superiores a  $10^{-4}$  mol/L permite a obtenção de curvas de calibração. As curvas com o parâmetro  $R_d$  mostraram o mesmo comportamento para todas as unidades sensoriais, incluindo o eletrodo sem filme, com similar inclinação. Isso confirma a formação da dupla camada pelas moléculas de dopamina na interface filme/solução sendo fortemente dependente da concentração. As curvas de calibração obtidas com os valores de  $R_t$  (figura 33b-f) apresentam comportamento diferente para cada unidade sensorial, consistente com o padrão encontrado nos *loading plots* (figura 30b). A unidade sensorial composta pelo filme LbL DODAB/0,5NiTsPc (figura 33c) e DODAB/0,05CuTsPc (figura 33e) mostram um comportamento linear quando é usado os valores de  $R_t$  vs. concentração de dopamina (C) e as unidades sensoriais compostas pelos filmes LbL DODAB/0,05NiTsPc (figura 33b) e PAH/0,05NiTsPc (figura 33d) apresentam comportamento linear quando é usado  $1/R_t$  vs. concentração de dopamina (C). A linearidade não pode ser obtida para a unidade sensorial sem filme (figura 33f). Portanto, o diferente comportamento das unidades sensoriais comparando os valores de  $R_t$  pode ser relacionado às características dos filmes e as diferentes interações filmes/analito. Shervedani *et al.* [SHERVEDANI, 2006], [SHERVEDANI, 2009] também observaram uma relação linear entre  $1/R_{ct}$  ( $R_{ct}$  é a resistência da transferência de carga no circuito equivalente proposto

pelos autores) e concentração de glicose (entre 1 e 100 mmol/L) usando um biossensor enzimático (glicose oxidase) e espectroscopia de impedância eletroquímica.



**Figura 32:** curvas de capacitância vs. frequência e os correspondentes ajustes obtidos usando o circuito equivalente proposto por Taylor and Macdonald (figura 33a) para todas unidades sensoriais imersas em solução de dopamina  $3,0 \times 10^{-4}$  mol/L.



**Figura 33:** a) circuito equivalente proposto por Taylor and Macdonald usado para a análise do ajuste das curvas. CPEg representa a capacitância geométrica do eletrodo interdigitado,  $R_t$  a transferência de carga entre solução/dupla camada, CPEd a capacitância da dupla camada formada na interface solução/filme,  $R_d$  a resistência da dupla camada, CPEb a capacitância do filme fino e  $R_b$  a resistência do filme fino; b-f) Curvas de calibração usando os valores de  $R_t$  obtidos dos ajustes para todas as unidades sensoriais para as soluções aquosas de dopamina ( $10^{-4}$ ;  $3,0 \times 10^{-4}$ ;  $6,0 \times 10^{-4}$  e  $10^{-3}$  M).

O crescimento de filmes LbL de DODAB/NiTsPc foi realizado com sucesso e aplicado em unidades sensoriais. Um estudo prévio de DSC foi realizado para determinar o efeito da NiTsPc sobre o comportamento térmico das vesículas de DODAB, em que foi dispersado pó de DODAB (1,0 mmol/L) em várias concentrações de NiTsPc (0,01 – 0,5 mmol/L). Os termogramas mostraram que concentrações superiores a 0,1 mmol/L de NiTsPc pode alterar as propriedades térmicas e estruturais do DODAB, impedindo a formação de vesículas de DODAB e sugerindo uma interação entre os compostos. O processo inverso, em que adicionamos pó de NiTsPc na dispersão aquosa de DODAB (1,0 mmol/L) mostra que a NiTsPc (0,5 mmol/L) destrói as vesículas de DODAB enquanto que NiTsPc (0,05 mmol/L) perturba a estruturação das vesículas mas com vários ciclos de aquecimento/resfriamento o DODAB estrutura-se preferencialmente na forma de vesículas. Determinadas as concentrações ideais, foi investigado o tempo de imersão do substrato na dispersão de DODAB 1,0 mmol/L. O tempo encontrado foi de 3 minutos. O efeito de dois procedimentos de limpeza da superfície do substrato foi avaliado e constatado ambos promovem a adsorção de material e permitem o crescimento linear dos filmes LbL.

Estabelecidas as condições de tempo e concentração dos materiais, os filmes LbL de DODAB/NiTsPc foram crescidos com tempo de imersão do substrato nas soluções de 3 minutos, usando dispersão de DODAB 1,0 mmol/L e soluções aquosas de NiTsPc 0,05 ou 0,5 mmol/L. A espectroscopia de absorção no UV-Vis revelou que ambos os filmes LbL cresceram linearmente com o número de bicamadas depositadas. Porém, o filme DODAB/0,5NiTsPc apresenta maiores valores de absorbância (mais espesso) e o filme DODAB/0,05NiTsPc é dominado pela NiTsPc presente na forma monomérica. Conforme os

dados de FTIR, o crescimento dos filmes LbL de DODAB/NiTsPc se dá por interação eletrostática entre os grupos  $N^+(CH_3)_2$  e  $SO_3^-$  do DODAB e NiTsPc, respectivamente.

A microscopia ótica e o espalhamento Raman revelaram que o filme LbL DODAB/0,05NiTsPc é microscopicamente homogêneo, enquanto que o filme LbL DODAB/0,5NiTsPc apresenta agregados de NiTsPc na superfície, resultado consistente com os dados de UV-Vis referente ao equilíbrio entre monômeros e dímeros/agregados de NiTsPc nos filmes LbL. Além disso, os filmes LbL de DODAB/0,05NiTsPc apresentam vesículas de DODAB polidispersas na superfície como observado por AFM, enquanto que filmes LbL de DODAB/0,5NiTsPc não apresentam vesículas de DODAB, o que está de acordo com os dados de DSC.

Uma língua eletrônica composta por 5 unidades sensoriais (eletrodo + filme) sendo 4 eletrodos interdigitados recobertos com distintos filmes LbL (DODAB/0,05NiTsPc; DODAB/0,5NiTsPc; PAH/0,05NiTsPc; DODAB/0,05CuTsPc) e um eletrodo interdigitado de platina sem filme foi elaborada. Em todos os eletrodos interdigitados (exceto o eletrodo interdigitado sem filme) foi depositada uma prévia bicamada de PAH/PSS para evitar a perda de material nas medidas sensoriais. Fazendo análise da PCA das curvas de capacitância obtidas, a língua eletrônica foi capaz de distinguir soluções aquosas de dopamina de até  $10^{-6}$  mol/L ( $10^{-6}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-4}$ ;  $3,0 \times 10^{-4}$ ;  $6,0 \times 10^{-4}$  e  $10^{-3}$  mol/L) além da água e inferir que a unidade sensorial composta pelo filme DODAB/0,5NiTsPc é a que desempenha um papel mais importante na discriminação da dopamina. O *loading* (análise de PCA) agrupa as unidades sensoriais em duas regiões: i) DODAB/0,5NiTsPc e DODAB/0,05CuTsPc ii) DODAB/0,05NiTsPc, PAH/0,05NiTsPc e eletrodo interdigitado sem filme, principalmente devido à espessura dos filmes LbL que recobrem as unidades sensoriais. Os filmes da região i) são mais espessos que os da região ii). Ao ajustar os dados experimentais através de um circuito elétrico equivalente, os filmes LbL mais espessos (DODAB/0,5NiTsPc e

DODAB/0,05CuTsPc) apresentam um comportamento linear de  $R_t$  (transferência de carga) com a concentração de dopamina enquanto que os filmes LbL menos espessos (DODAB/0,05NiTsPc e PAH/0,05NiTsPc) apresentam um comportamento linear com  $1/R_t$  com a concentração de dopamina. Finalmente, a possibilidade de imobilizar DODAB como estruturas de vesículas ou não em filmes LbL depende da concentração de NiTsPc que pode ser aplicada em sensores ou biossensores para ajustar as suas propriedades.

### **Perspectivas futuras**

Esta dissertação está baseada na fabricação e caracterização morfológica de filmes LbL de DODAB/0,05NiTsPc e DODAB/0,5NiTsPc. Como perspectiva pode-se aprofundar os estudos na parte teórica e experimental de alguns pontos abordados neste trabalho tais como:

- cinética de adsorção dos materiais no substrato;
- utilização de outras técnicas, como espalhamento de luz e MEV, para caracterização das vesículas de DODAB na presença de NiTsPc;
- estudar outras formas de preparação das vesículas de DODAB como sonificação e extrusão.

Há resultados prévios do efeito da mistura das soluções de NiTsPc e dispersão de DODAB via micro-Raman e espectroscopia de absorção UV-Vis. Estes resultados indicam um possível encapsulamento de NiTsPc pelas vesículas de DODAB, porém é necessário refazer os experimentos e assim tirar conclusões.

Os resultados discutidos nesta dissertação foram submetidos para publicação em 22 junho de 2012.

- ALENCAR, W.S. *et al.*, **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, p. 5086–5091, 2009.
- ALESSIO, P. *et al.*, **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.12, p. 3972–3983, 2010.
- AOKI, P.H.B. *et al.*(a), **J. RamanSpectrosc**, v. 41, p. 40-48, 2010.
- AOKI, P.H.B. *et al.*(b), **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 9, 2010.
- AOKI, P.H.B. *et al.*, **Journal of Nanoscience And Nanotechnology**, v. 8, p. 4341-4348, 2008.
- AOKI, P.H.B. *et al.*, **Langmuir**, v. 25, p. 2331-2338, 2009.
- AOKI, P.H.B. *et al.*, **Materials Science and Engineering C**, v. 32, p. 862-871, 2012.
- AROCA, R., *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*, New York, John Wiley & Sons, 2006.
- ATILLA, D. *et al.*, **Synthetic Metals**, v. 159, p.13–21, 2009.
- BARBASSA, L.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M., **BMC Biotechnology**, v. 11, p. 40, 2011.
- BEEBE, K.R.; PEEL, R.J.; SEASHOLTZ, M.B., *Chemometrics: A Pratical Guide*, John Wiley and Sons, New York, 1998.
- BENATTI, C.R. *et al.*, **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 111, p. 93–104, 2001.
- BENATTI, C.R.; EPAND, R.M.; LAMY, M.T., **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 145, p. 27–36, 2007.
- BENTEN, H. *et al.*, **Thin Solid Films**, v. 517, p. 2016–2022, 2009.
- BERNAL, C. *et al.*, **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 849-855, 2002
- BERROS, C. *et al.*, **Journal of Physical Chemistry A**, v. 111, 2007.
- BERTONCELLO, P.; PERUFFO, M.; **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 321, 2008.
- BOHRER, F.I. *et al.*, **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, p. 478–485, 2009.
- BRAUN, A.; TCHERNIAC, J., **Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 40, p. 2709-2714, 1907.
- BRITO R.O.; MARQUES, E.F., **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 137, p. 18–28, 2005.
- CAI, X. *et al.*, **Journal of Physical Chemistry A**, v. 113, p. 2500–2506, 2009.

- CAMP, P.J. *et al.*, **Journal of Physical Chemistry A**, v. 106, p. 10725-10732, 2006.
- CARMONA-RIBEIRO, A.M., **Chemical Society Reviews**, v. 21, n. 3, p. 207-213, 1992.
- CARVALHO, L.A.; CARMONA-RIBEIRO, A.M., **Langmuir**, v. 14, p. 6077-6081, 1998.
- CASELI, L. *et al.*, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 319, p. 100–108, 2008.
- CASELI, L. *et al.*, **Langmuir**, v. 24, p. 4150-4156, 2008.
- CHEN, S.M.; CHZO, W.Y., **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 587, p. 226–234, 2006.
- CHENG, Y.H.; LIN, K.Y.; LEE, M.C.M., **Thin Solid Films**, v. 517, p. 2959–2962, 2009.
- CHEUNG, J.H.; FOU, A.F.; RUBNER, M.F., **Thin Solid Films**, v. 244, p. 985-989, 1994.
- CHEUNG, J.H.; STOCKTON, W.B.; RUBNER, M.F., **Macromolecules**, v. 30, p. 2712-2716, 1997.
- COPPOCK, J.D. *et al.*, **Langmuir**, v. 25, p. 5006–5011, 2009.
- CORREIA, F.M.; PETRI, D.F.S.; CARMONA-RIBEIRO, A.M., **Langmuir**, v. 20, p. 9535-9540, 2004.
- CRESPILHO, F.N. *et al.*, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 3073–3077, 2009.
- DAVIDSON, A.T., **J. Chern. Phys.**, v. 71, 1982.
- DE BONI, L. *et al.*, **Journal of Physical Chemistry A**, v. 112, p. 6803-6807, 2008
- DECHER, G.; HONG, J.D.; SCHMITT, J., **Thin Solid Films**, v. 210, p. 831-835, 1992.
- EBERHARDT, W.; HANACK, M., **Synthesis**, p. 95, 1997.
- EDWARDS, L.; GOUTERMA, M., **Journal of Molecular Spectroscopy**, v. 33, p. 292-310, 1970.
- EISBERG, R.; RESNICK, R., *Física Quântica. Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas*, Editora Campus Elsevier, 1974.
- FABREGAT, G. *et al.*, **Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, p. 14933-14941.
- FEITOSA, E. *et al.*, **Colloid and Polymer Science**, v. 287, p. 591–599, 2009.
- FEITOSA, E. *et al.*, **Langmuir**, v. 22, p. 3579-3585, 2006.
- FEITOSA, E.; ALVES, F.R., **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 156, p. 13–16, 2008.
- FEITOSA, E.; BARRELEIRO, P.C.A.; OLOFSSON, G., **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 105, p.201–213, 2000.

- FEITOSA, E.; BENATTI, C.R.; TIERA, M.J., **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 13, p. 273–280, 2010.
- FEITOSA, E.; KARLSSON, G., EDWARDS, K., **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 140, p.66–74, 2006.
- FENG, Y.J.; ALONSO-VANTE, N., **Physica Status Solidi B**, v. 245, n. 9, p. 1792–1806, 2008.
- FERREIRA, M.; CHEUNG, J.H.; RUBNER, M.F., **Thin Solid Films**, v. 244, p. 806-809, 1994
- FERREIRA, M.; RUBNER, M.F., **Macromolecules**, v. 28, p. 7107-7114, 1995.
- FERREIRA, M.L. *et al.*, **Thin Solid Films**, v. 446, p. 301–306, 2004.
- FUKAO, N. *et al.*, **Macromolecules**, v. 44, p. 2964–2969, 2011.
- GAFFO, L. *et al.*, **Journal of Raman Spectroscopy**, v.33, p. 833–837, 2002.
- GAFFO, L. *et al.*, **Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 60, p. 321-327, 2004.
- GAUGLITZ, G.; VO-DINH, T., *Handbook of Spectroscopy*, 2003.
- GIESSIBL, F.J., **Reviews of Modern Physics**, v. 75, p. 949-983, 2003.
- GOBERNADOMITRE, I.; AROCA, R., *Chemistry of Materials*, v. 7, p. 118-122, 1995.
- GRZADZIEL, L.; ZAK, J.; SZUBER, J., **Thin Solid Films**, v. 436, p. 70–75, 2003.
- GUILLAUD, G.; SIMON, J.; GERMAIN, J.P., **Coordination Chemistry Reviews**, v. 178, p. 1433–1484, 1998.
- GUO, L. *et al.*, **Applied Physics B**, v. 74, p. 253–257, 2002.
- HOOGEVEEN, N.G. *et al.*, **Langmuir**, v. 12, p. 3675-3681, 1996.
- HORNYAK, G.L. *et al.*, **Micron**, v. 29, p. 183-190, 1998.
- ICHINOSE, I. *et al.*, **Langmuir**, v. 14, p. 187-192, 1998.
- IKAI, A. *Surface Science Reports* 26, p. 261-332, 1996.
- ILER, R.K., **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 21, p. 569-594, 1966.
- IONASHIRO, M., *Cerâmica*, v. 26, n. 121, p. 17-24, 1980.
- ISRAELACHVILI, J.N., *Intermolecular and surface forces*, 2<sup>a</sup> Edition, London, Academic Press, 1992.
- IZQUIERDO, A., **Langmuir**, v. 21, p. 7558-7567, 2005.

- JANDT, K. D., **Materials Science and Engineering R**, v. 21, p. 221-295, 1998.
- JOLLIFFE, I.T., *Principal Component Analysis*, Springer-Verlag, New York, 1986.
- JUNG, M. *et al.*, **Langmuir**, v. 16, p. 968-979, 2000.
- KANG, T.F.; SHEN, G.L.; YU, R.Q.; **Analytica Chimica Acta**, v. 356, p. 245-251, 1997.
- KAWAI, T. *et al.*, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 103, n. 1, 1985.
- KE, M.R.; HUANG, J.D.; WENG, S.M., **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 201, p. 23–31, 2009.
- KEMPA, A.; OBROWOLSKI, J., **Canadian Journal of Chemistry**, v. 66, p. 2553-2555, 1988.
- KIKUCHI, I.S.; CARMONA-RIBEIRO, A.M., **Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, p. 2829-2835, 2000.
- KROGMAN, K.C. *et al.*, **Langmuir**, v. 23, p. 3137-3141, 2007.
- KUO, Y.C.; CHUNG, J.F., **Colloids and Surfaces B**, v. 83, p. 299–306, 2011.
- LASIC, D.D., **Journal Biochemical**, v. 256, p. 1-11, 1998.
- LEZNOFF, C.C.; LEVER, A.B.P., *Phthalocyanines: Properties and Applications*, VCH-Publishers, Vol 1-4, 1989.
- LINSTEAD, R.P.; ROBERTSON, J.M., **Journal of the Chemical Society**, v. 3, p. 1736-1738, 1936.
- LOBO, R. F. M. *et al.*, **Nanotechnology**, v. 14, p. 101–108, 2003.
- LOPES, A.; EDWARDS, K.; FEITOSA, E., **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 322, p. 582–588, 2008.
- LOWACK, K.; HELM, C.A., **Macromolecules**, v. 31, p. 823-833, 1998.
- MARTÍN, M.G.; RODRÍGUEZ-MÉNDEZ, M. L.; DE SAJA, J. A., **Langmuir**, v. 26, p. 19217-19224, 2010.
- MELO, L.D.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M., **Langmuir**, v. 26, p. 12300–12306, 2010.
- MEYER, E., *Atomic force microscopy. Progress in Surface Science*, Oxford, v. 41, p. 3-49, 1992.
- MORAES, M.L. *et al.*, **Analytical chemistry**, v. 82, p. 3239–3246, 2010.
- MORAES, M.L. *et al.*, **Materials Science and Engineering C**, v. 28, p. 467–471, 2008.
- MUSIO, F.; FERRARA, M.C., **Sensors and Actuators B**, v. 41, p. 97-103, 1997.

- NETZER, L.; ISCOVICI, R.; SAGIV, J., **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 93, p. 415-417, 1983
- NETZER, L.; SAGIV, J., **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, n. 3, p. 674-676, 1983
- NIKOLELIS, D.; HIANIK, T.; KRULL, U., **Electroanalysis**, v. 11, n. 1, p. 7-15, 1999.
- OLIVATI, C. A. *et al.*, **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 32, p. 41-46, 2009.
- OLIVEIRA, Jr. *et al.*, *Handbook of Polyelectrolytes and Their Applications*, v. 1, 2002.
- PATERNI, L.G.; MATTOSO, L.H.C.; OLIVEIRA, Jr., **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 228-235, 2001.
- PELTEKIS, N. *et al.*, **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, p. 13008–13012, 2008.
- PEREZ-LOPEZ, S. *et al.*, **Journal of Physical Chemistry B**, v.113, n. 1, p. 319-327, 2009.
- RAPOSO, M. *et al.*, **Macromolecules**, v. 30, p. 6095-6101, 1997.
- RAPOSO, M.; OLIVEIRA, Jr., **Brazilian Journal of Physics**, v. 4, p. 28, 1998
- RAPOSO, M.; OLIVEIRA, O.N., **Langmuir**, v. 18, p. 6866-6874, 2002.
- RIUL, A. *et al.*, **Synthetic Metals**, v. 132, p. 109–116, 2003.
- RIUL, Jr. A. *et al.*, **Langmuir**, v. 18, p. 239-245, 2002.
- RODRÍGUEZ, A. *et al.*, **Applied Surface Science**, v. 256, p. 3374–3379, 2010.
- ROMERO, M.P.; LOURO, S.R.W., **European Biophysics Journal with Biophysics Letters**, v. 40, p. 57, 2011
- RUBENS, B.F., *Estudo de Polímeros por Microscopia de Força Atômica*, 2003.
- SAINI, G. S. S. *et al.*, **J. Phys.: Condens. Matter**, v. 21, 2009.
- SALA, O., *Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho*, São Paulo, Editora UNESP, 2ª edição, 1996.
- SAVEYN, P. *et al.*, **Soft Matter**, v. 5, p. 1735–1742, 2009.
- SCHLENOFF, J.B.; DUBAS, S.T.; FARHAT, T., **Langmuir**, v. 16, p. 9968-9969, 2000.
- SEDODON, J.M.; TEMPLER, R.H., *Handbook of Biological Physics*, v.1, p. 97-160, 1995.
- SEOUDI, R. *et al.*, **Opt. Mater**, v. 29, p. 304–312, 2006.
- SHEN, Y. *et al.*, *Semiconductor Science and Technology*, v. 25, 2010.

- SHERVEDANI, R. K. *et al.*, **Bioelectrochemistry**, v. 69, p. 201-208, 2006.
- SHERVEDANI, R. K.; HATEFI-MEHRJARDI, A., **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 137, p. 195-204, 2009.
- SILVA, A.M G. *et al.*, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 270, p. 417–425, 2004.
- SILVA, J.R.; SOUZA, N.C.; OLIVEIRA, Jr., O.N., **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 356, p. 937–940, 2010.
- SIQUEIRA, Jr. *et al.*, **Electrochemistry Communications**, v. 9, p. 2676–2680, 2007.
- SIQUEIRA, Jr. *et al.*, **Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, p. 9050–9055, 2008.
- SIZUN, T. *et al.*, **Sensors and Actuators B**, v. 159, p. 163–170, 2011.
- SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A., *Princípios de Análise Instrumental*, Toronto, Bookman, 2002.
- SOBRAL, C.N.C.; SOTO, M.A.; CARMONA-RIBEIRO, A.M., **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 152, p. 38–45, 2008.
- STUART, B., *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, JohnWiley & Sons, 2004.
- SUGA, K.; BRADLEY, M.; RUSLING, J.F., **Langmuir**, v. 9, p. 3649-3655, 1993.
- TAYLOR, M.D.; MACDONALD, A G., **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 20, p. 1277-1283, 1987.
- TKACHENKO, N.V. *et al.*, **Applied Surface Science**, v. 256, p. 3900–3905, 2010.
- UMEMURA, J. *et al.*, **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 112, p. 293-309, 1984.
- VENTON, J.B.; WIGHTMAN, R.M., **Analytical Chemistry**, v. 1, p. 414-421, 2003.
- VERGNAT, C. *et al.*, **Macromolecules**, v. 44, p. 3817–3827, 2011.
- VERMA, D. *et al.*, **Spectrochimica Acta Part A**, v. 70, p. 1180-1186, 2008.
- VOLPATI, D. *et al.*, **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, p. 15275–15282, 2008.
- WANG, L. *et al.*, **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 123, p. 177-185, 2003.
- WANG, Q.; JIANG, N.; LI, N., **Microchemical Journal**, v. 68, p. 77-85, 2001.
- WU, F.G.; WANG, N.N.; YU, Z.W., **Langmuir**, v. 25, p. 13394–13401, 2009.
- WU, F.G.; YU, Z.W.; JI, G., **Langmuir**, v.27, p. 2349–2356, 2011.
- YANG, Y.B. *et al.*, **Materials Letters**, v. 63, p. 608–610, 2009.

YE, R.B. *et al.*, **Thin Solid Films**, v. 517, p. 3001–3004, 2009.

ZAMPA, F.M. *et al.*, **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 5, p. 352–358, 2009.

ZAMPA, M.F. *et al.*, **Biomacromolecules**, v. 8, p. 3408-3413, 2007.

ZANFOLIM, A. A. *et al.*, **J. Phys. Chem. C**, v. 114, p. 12290-12299, 2010.

ZARETSKY, M.C.; MOUAYAD, L.; MELCHER, J.R.; **IEEE Transactions on Electrical Insulation**, v. 23, n. 6, 1988.

ZUCOLOTTO, V. *et al.*, **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, p. 3733-3737, 2003.

ZUCOLOTTO, V., **Sensors and Actuators B**, v. 113, p. 809–815, 2006.