

Ricardo Jorge Andrade Moreira da Silva

Licenciado em Química FCUP

**Desenvolvimento, Caracterização e Optimização de um
biossensor amperométrico para a determinação de glucose
baseado em microinterfaces gelificadas suportadas em
membranas de poliéster**



FC

FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

**Departamento de Química
FCUP
2005**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Química

**QD572
SILr D
2005**

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto



FC

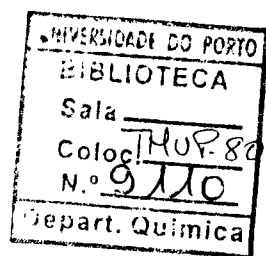
Biblioteca
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto



D000065016

Ricardo Jorge Andrade Moreira da Silva
Licenciado em Química FCUP

**Desenvolvimento, Caracterização e Optimização de um
biossensor amperométrico para a determinação de
glucose baseado em microinterfaces gelificadas
suportadas em membranas de poliéster**



A Presidente do júri

N. Agostinho Matos

5.9.2005

Departamento de Química
FCUP
2005

Agradecimentos

Ao meu Pai.

Ao Prof. Carlos Pereira pela pessoa fantástica que é e por ter proporcionado todas as condições para tornar a realização deste trabalho possível.

Ao Eng. António Fernando por me acolher no seu grupo de investigação e por todo o incentivo, sugestões e condições que permitiram o desenvolvimento com sucesso deste trabalho.

Um agradecimento especial à Tia Matilde por sempre me receber de braços abertos e a todos os meus familiares pela confiança que sempre depositaram em mim. Também lembrar todo o apoio dos empregados de casa e demais amigos.

À Ângela, por estar sempre a meu lado.

A todos os meus amigos, em especial ao Tiago, ao Sérgio, ao Barreira, ao Miranda e aos restantes "7M's e friends" pela entreajuda e pela constante troca de informação e de ideias sobre as mais variadas temáticas.

Um agradecimento a todo o grupo de Electroquímica e Química Analítica que me recebeu, assim como a todos os colegas de laboratório. Também ao FEDER pelo financiamento concedido no projecto POCTI/QUI/42472/2001.

Um agradecimento à colaboração que existiu com o Grupo Ferroelétricos do Departamento de Física, nomeadamente, pela disponibilidade e simpatia demonstradas pelo Prof. Doutor Paulo Carvalho.

A todos um Muito Obrigado

Resumo

Na sequência do trabalho desenvolvido neste grupo de investigação, pretendeu-se com a realização deste trabalho proceder à optimização de um biossensor amperométrico para a determinação de glucose baseado em microinterfaces líquido-gel suportadas em membranas de poliéster (PET) microperfuradas. Com este propósito, procedeu-se à caracterização dos vários componentes do biossensor, nomeadamente, do transdutor, da biomolécula e das características específicas deste tipo de interfaces, utilizando para tal, técnicas electroquímicas como a voltametria cíclica e a espectroscopia de impedância electroquímica. O uso destas técnicas permitiu não só a caracterização antes mencionada, como também acompanhar a transferência assistida através da interface de um dos produtos da reacção enzimática de oxidação da glucose (o ácido glucónico).

Na última fase deste trabalho, realizou-se vários estudos de optimização da interface gelificada, na tentativa de introduzir uma maior versatilidade e aplicabilidade a este biossensor. Estudou-se a utilização de diferentes solventes orgânicos, diferentes electrólitos de suporte em ambas as fases e de um novo método para a imobilização da enzima através da deposição em poliéster de filmes de monocamadas de Langmuir-Blodgett de politiofenos substituídos. Estes estudos foram complementados utilizando técnicas como a goniometria e a determinação de parâmetros dieléctricos.

Abstract

Following previous work carried out in this research group, this work intended to optimize an amperometric biosensor for the determination of glucose based on liquid-gel microinterfaces supported in photoablated polyester membranes (PET). The characterization of the components of the biosensor, such as the transducer, the biomolecule and the experimental parameters specific to this type of interfaces, was performed, using electrochemical techniques such as cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. The use of these techniques allowed not only the characterization of the electrochemical system, but also to follow the assisted transfer through the interface of a product of the enzymatic reaction of glucose oxidation (gluconic acid).

In the last phase of this work, several optimization studies of the gelified interface were performed, with the intent to introduce a better versatility and applicability to this biosensor. A study with the use of different organic solvents, different supporting electrolytes in both phases and a new method of enzyme immobilization with the development of Langmuir-Blodgett monolayers of substituted polythiophenes, was carried out. These studies were complemented by techniques as goniometry and determination of dielectric parameters.

Índice Geral

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE GERAL	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABELAS	XII
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	XIII

Capítulo 1

1.1 BIOSSENSORES	3
1.1.1 EVOLUÇÃO DOS BIOSSENSORES DE GLUCOSE	4
1.1.2. CONSTITUIÇÃO DOS BIOSSENSORES: A ENZIMA	6
1.1.3. CINÉTICA ENZIMÁTICA	7
1.1.4. PROCESSOS DE IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS	9
1.2. INTERFACES ENTRE DUAS SOLUÇÕES ELECTROLÍTICAS IMISCÍVEIS (ITIES)	12
1.2.1. EVOLUÇÃO	12
1.2.2. DETERMINAÇÃO ANALÍTICA UTILIZANDO AS ITIES	13
1.2.3. MICRO-ITIES	14
1.2.4. POLARIZABILIDADE DAS ITIES.....	19
1.2.5. PROCESSOS DE TRANSPORTE DE MASSA NAS ITIES	20
1.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	23
1.3.1. PREPARAÇÃO DOS FILMES DE POLIÉSTER	24
1.3.2. PREPARAÇÃO DOS ELÉCTRODOS DE Ag/AgCl	24
1.3.3. SÍNTESE DO TETRAFENILBORATO DE TETRAOCTILAMÓNIO (TOATPB)	25
1.3.4. PREPARAÇÃO DOS GÉIS	25
1.3.5. MONTAGEM DO SENSOR	26
1.3.6. TÉCNICA: VOLTAMETRIA CÍCLICA	28
1.4 DESENVOLVIMENTO DO BIOSSENSOR	31
1.4.1. DETECÇÃO DA D(+)-GLUCOSE	32
1.4.2. EFEITO DA VELOCIDADE DE VARRIMENTO	39
1.4.3. DETECÇÃO POTENCIOMÉTRICA VS. DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA	41
1.4.4. EFEITO DA TEMPERATURA	43
1.5 CONCLUSÃO	50

Capítulo 2

2.1 INTRODUÇÃO	56
2.1.1. A ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELECTROQUÍMICA NO ESTUDO DAS ITIES	56
2.1.2. INTERFERÊNCIAS	60
2.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	64
2.2.1. PREPARAÇÃO DA CÉLULA ELECTROQUÍMICA DE 4 ELÉCTRODOS.....	64
2.2.2. TÉCNICA: ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELECTROQUÍMICA.....	66
2.2.3. INTERFERÊNCIAS	66
2.3. CARACTERIZAÇÃO	68
2.3.1. TRANSFERÊNCIA ASSISTIDA DO H^+	68
2.3.2. INTERFERÊNCIAS	74
2.4 CONCLUSÃO	80

Capítulo 3

3.1 OPTIMIZAÇÃO.....	85
3.1.1. EFEITO DOS SOLVENTES ORGÂNICOS	85
3.1.2. EFEITO DO AGENTE GELIFICANTE	86
3.1.3. DETERMINAÇÃO DE CONSTANTES DIELECTRICAS E DE RELAXAÇÃO DIELECTRICA.....	90
3.1.4. APLICAÇÃO DE FILMES LANGMUIR-BLODGETT DE POLITIOFENOS SUBSTITUÍDOS EM BIOSSENSORES.....	93
3.1.5. CARACTERIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES	98
3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	101
3.2.1. MATERIAL E REAGENTES.....	101
3.2.2. PURIFICAÇÃO DO 1,6-DICLOROHEXANO (1,6-DCH).....	102
3.2.3. PREPARAÇÃO DE GÉIS ORGÂNICOS	103
3.2.3.1. Policloreto de vinilo – PVC.....	103
3.2.3.2. 1,3:2,4-dibenzilideno sorbitol – DBS.....	104
3.2.4. PREPARAÇÃO DE SAIS ORGÂNICOS LIPOFÍLICOS.....	105
3.2.5. DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CAPACIDADE.....	107
3.2.5.1. Interface Líquido-Líquido.....	107
3.2.5.2. Interface Gel-Líquido.....	108
3.2.6. DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA DOS GÉIS ORGÂNICOS.....	110
3.2.7. TÉCNICAS	110
3.2.7.1. Langmuir-Blodgett (LB).....	110
3.2.7.2. Goniometria.....	112
3.2.7.3. Determinação dos parâmetros associados às propriedades dieléctricas.....	114
3.3. ANÁLISE DE RESULTADOS.....	116
3.3.1 OPTIMIZAÇÃO DOS GÉIS ORGÂNICOS	116
3.3.2. CARACTERIZAÇÃO DE SOLVENTES E GÉIS ORGÂNICOS	117
3.3.2.1. Efeito do electrólito da fase orgânica	118
3.3.2.2. Efeito do solvente orgânico	119
3.3.2.3. Efeito do electrólito da fase aquosa.....	121
3.3.2.4. Efeito da gelificação da fase orgânica.....	122
3.3.2.5. Resistência dos géis orgânicos	124
3.3.2.6. Transferência iónica através de uma microinterface gelificada água 1,6-DCH.....	126

3.3.3. ESTUDO DAS PROPRIEDADES DIELECTRICAS DE GÉIS ORGÂNICOS.....	127
3.3.4. PREPARAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE GLUCOSE OXIDASE EM FILMES DE LANGMUIR-BLODGETT DE 9,9-DIFENILFLUORENO OLIGOTIOFENO (FT3).....	133
3.3.5. CARACTERIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES POR DETERMINAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTACTO DE GOTAS DE ÁGUA.....	136
3.3.5.1. <i>Poliéster (PET)</i>	136
3.3.5.2. <i>Gel orgânico o-NPOE</i>	138
3.3.5.3. <i>9,9-Difenilfluoreno oligotiofeno (FT3)</i>	140
3.4 CONCLUSÃO.....	141
4. TRABALHO FUTURO.....	143
5. BIBLIOGRAFIA.....	144

Índice de Figuras

Capítulo 1

FIGURA 1.1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PRIMEIRO BIOSSENSOR PARA A DETERMINAÇÃO DE GLUCOSE: O ELÉCTRODO ENZIMÁTICO DE CLARK.	5
FIGURA 1.2. IMAGEM DE UMA ESTRUTURA DE CRISTAL DA GLUCOSE OXIDASE DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> DETERMINADA A UMA RESOLUÇÃO DE 2.3 Å.....	7
FIGURA 1.3. ESQUEMA DEMONSTRATIVO DA REACÇÃO ENZIMÁTICA DE DECOMPOSIÇÃO DA D(+)-GLUCOSE. ...	8
FIGURA 1.4. ORGANOGAMA DAS TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS MAIS UTILIZADAS.....	11
FIGURA 1.5. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS CÉLULAS UTILIZADOS EM ESTUDOS DE ITIES, UTILIZANDO A VOLTAMETRIA CÍCLICA.	15
FIGURA 1.6. CAMADA DE DIFUSÃO EM MICROORIFÍCIOS.	18
FIGURA 1.7. ESQUEMA DAS DETERMINAÇÕES VOLTAMÉTRICAS EM (A) MACRO E MICRO-ITIES SUPORTADAS EM (C) MICROORIFÍCIOS (E) MICROPIPETAS..	19
FIGURA 1.8. ESQUEMA DO PROCESSO INTERFACIAL DENTRO DA JANELA DE POTENCIAL..	21
FIGURA 1.9. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS QUATRO TIPOS DE MECANISMOS DE REACÇÃO DE TRANSFERÊNCIA IÓNICA ASSISTIDA POR LIGANDOS.	22
FIGURA 1.10. MEMBRANA DE 66 MICROORIFÍCIOS	25
FIGURA 1.11. MEMBRANA COM MICROLINHA.....	25
FIGURA 1.12. TUBO DE TEFLON.	27
FIGURA 1.13. COLOCAÇÃO DO FILME MICROPERFURADO.	27
FIGURA 1.14. COLOCAÇÃO DO ANEL DE TEFLON DE FIXAÇÃO.	27
FIGURA 1.15. COLOCAÇÃO DE PARAFILM NA EXTREMIDADE.	27
FIGURA 1.16. COLOCAÇÃO GEL ORGÂNICO DE REFERÊNCIA.	27
FIGURA 1.17. COLOCAÇÃO DO GEL ORGÂNICO.	28
FIGURA 1.18. MONTAGEM DOS GÉIS DAS FASES ORGÂNICAS.	28
FIGURA 1.19. IMERSÃO DO SENSOR NA FASE AQUOSA.....	28
FIGURA 1.20. BIOSSENSOR COM OS SISTEMAS DE DETECÇÃO E AMPLIFICAÇÃO.	28
FIGURA 1.21. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CÉLULA ELECTROQUÍMICA UTILIZADA NO BIOSSENSOR. ...	29
FIGURA 1.22. RELAÇÃO POTENCIAL-TEMPO EM VOLTAMETRIA CÍCLICA.	29
FIGURA 1.23. VOLTAMOGRAMA CÍCLICO TEÓRICO PARA UMA TRANSFERÊNCIA IÓNICA.....	30

FIGURA 1.24. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DO BIOSSENSOR.	32
FIGURA 1.25. VOLTAMOGRAMA CÍCLICO DA DETERMINAÇÃO DA GLUCOSE.	33
FIGURA 1.26. VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DETERMINADOS NA PRESENÇA DE 1.5 mM, 2.4 mM E 3.8 mM DE D(+)-GLUCOSE.	34
FIGURA 1.27. CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DA GLUCOSE.	35
FIGURA 1.28. MODELO ESQUEMÁTICO DO COMPORTAMENTO DE ELÉCTRODOS ENZIMÁTICOS.	36
FIGURA 1.29. REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA DIFERENTES ESPESSURAS DA MEMBRANA DE POLIÉSTER.	38
FIGURA 1.30. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO EFEITO DA ESPESSURA DO FILME NAS MICRO-ITIES SUPORTADAS EM MICROORIFÍCIOS.	39
FIGURA 1.31. REPRESENTAÇÃO DE DUAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO BASEADAS EM MICROORIFÍCIOS E MICROLINHAS.	40
FIGURA 1.32. REPRESENTAÇÃO DO EFEITO DA VELOCIDADE DE VARRIMENTO NAS DETERMINAÇÕES AMPEROMÉTRICAS.	41
FIGURA 1.33. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO COMPORTAMENTO DE DIFUSÃO ASSIMÉTRICO CARACTERÍSTICO DAS MICRO-ITIES GELIFICADAS SUPORTADAS EM MICROORIFÍCIOS.	42
FIGURA 1.34. COMPARAÇÃO ENTRE A RESPOSTA POTENCIOMÉTRICA E A RESPOSTA AMPEROMÉTRICA.	43
FIGURA 1.35. EFEITO DA TEMPERATURA NAS REACÇÕES CATALÍTICAS.	45
FIGURA 1.36. REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS AMPEROMÉTRICAS DETERMINADAS A DIFERENTES TEMPERATURAS.	47
FIGURA 1.37. REPRESENTAÇÃO DA RELAÇÃO LINEAR ENTRE A TEMPERATURA E CORRENTE MÁXIMA.	49
FIGURA 1.38. REPRESENTAÇÃO DA FORMA LINEAR DA EQUAÇÃO DE ARRHENIUS AO SISTEMA EM ESTUDO.	50

Capítulo 2

FIGURA 2.1. CIRCUITO EQUIVALENTE REPRESENTATIVO DAS ITIES.	57
FIGURA 2.2. REPRESENTAÇÃO DA RESPOSTA DE UM SISTEMA ELECTROQUÍMICO TEÓRICO A UMA PERTURBAÇÃO SINUSOIDAL.	58
FIGURA 2.3. REPRESENTAÇÃO VECTORIAL DA IMPEDÂNCIA DE UM SISTEMA.	59
FIGURA 2.4. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CÉLULA DE VIDRO DE 4 ELÉCTRODOS UTILIZADA NAS DETERMINAÇÕES DE IMPEDÂNCIA.	64
FIGURA 2.5. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CÉLULA ELECTROQUÍMICA II, UTILIZADA NA CÉLULA DE 4 ELÉCTRODOS.	65
FIGURA 2.6. CIRCUITO EQUIVALENTE UTILIZADO NO AJUSTE DA CÉLULA ELECTROQUÍMICA II: $R(C(RW))$	66
FIGURA 2.7. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CÉLULA ELECTROQUÍMICA III, UTILIZADA PARA O ESTUDO DAS INTERFERÊNCIAS.	67

Índice Figuras

FIGURA 2.8. CURVA AMPEROMÉTRICA DA ADIÇÃO DE DIFERENTES VOLUMES DE HCL 10M	68
FIGURA 2.9. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO PDT	69
FIGURA 2.10. REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS DE CAPACIDADE PARA UMA MACROINTERFACE ÁGUA 1,2-DCE PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PDT	70
FIGURA 2.11. REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS DE CAPACIDADE PARA UMA MACROINTERFACE ÁGUA 1,2-DCE PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GOX	72
FIGURA 2.12. REPRESENTAÇÃO DA CAPACIDADE INTERFACIAL COM A CONCENTRAÇÃO DE GOX A POTENCIAIS FIXOS	73
FIGURA 2.13. REPRESENTAÇÃO DOS VALORES DE CAPACIDADE PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE D(+)-GLUCOSE	73
FIGURA 2.14. REPRESENTAÇÃO DO EFEITO DA PRESENÇA DE ETANOL NA RESPOSTA DO BIOSSENSOR	76
FIGURA 2.15. REPRESENTAÇÃO DO EFEITO DA PRESENÇA DE AA NA RESPOSTA DO BIOSSENSOR	78
FIGURA 2.16. REPRESENTAÇÃO DO EFEITO DA PRESENÇA DE CITRATO NA RESPOSTA DO BIOSSENSOR	79

Capítulo 3

FIGURA 3.1. ESTRUTURA QUÍMICA DA MOLÉCULA 1,3:2,4-DIBENZILIDENO SORBITOL (DBS) DEMONSTRANDO A SUA ESTRUTURA ESPECÍFICA EM FORMA DE "BORBOLETA"	88
FIGURA 3.2. CIRCUITOS ELÉCTRICOS EQUIVALENTES DE DIELECTRICOS	91
FIGURA 3.3. VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS ϵ' E ϵ'' COM O LOGARITMO DA FREQUÊNCIA	92
FIGURA 3.4. REACÇÃO DE SÍNTESE DOS 9,9-DIFENILFLUORENOS-CAPPED OLIGOTIOFENOS, FTN	94
FIGURA 3.5. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PRATO DE WILHELMY	96
FIGURA 3.6. REPRESENTAÇÃO DE UMA ISOTÉRMICA GENÉRICA DE UMA MONOCAMADA DE LANGMUIR-BLODGETT DE UM ÁCIDO GORDO	97
FIGURA 3.7. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ÂNGULO DE CONTACTO FORMADO POR UMA GOTA NUMA SUPERFÍCIE SÓLIDA	98
FIGURA 3.8. VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS, UTILIZANDO COMO SOLVENTE O 1,6-DCH, ANTES E APÓS A PURIFICAÇÃO	103
FIGURA 3.9. VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS PARA A UTILIZAÇÃO DE VÁRIOS SAIS LIPOFÍLICOS NA FASE ORGÂNICA	106
FIGURA 3.10. CIRCUITO EQUIVALENTE UTILIZADO NO AJUSTE DA CÉLULA ELECTROQUÍMICA IV: R(CW))	107
FIGURA 3.11. REPRESENTAÇÃO DAS CÉLULAS ELECTROQUÍMICAS UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CAPACIDADE EM MACROINTERFACES LÍQUIDO-LÍQUIDO	108
FIGURA 3.12. REPRESENTAÇÃO DA CÉLULA DE VIDRO UTILIZADA NA DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CAPACIDADE DOS GÉIS ORGÂNICOS	109

FIGURA 3.13. REPRESENTAÇÃO DA CÉLULA ELECTROQUÍMICA UTILIZADA NA DETERMINAÇÃO DAS IMPEDÂNCIAS DOS GÉIS ORGÂNICOS.....	109
FIGURA 3.14. CÉLULA UTILIZADA NA DETERMINAÇÃO DE RESISTÊNCIAS DE GÉIS.	110
FIGURA 3.15. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA BALANÇA DE LANGMUIR.	111
FIGURA 3.16. IMAGEM DO SISTEMA UTILIZADO (KSV MINITROUGH) NO ESTUDO DOS FILMES DE MONOCAMADAS DE 9,9-DIFENILFLUORENOS-CAPPED OLIGOTIOFENOS FT3 DE LANGMUIR-BLODGETT	112
FIGURA 3.17. IMAGEM DA MONTAGEM UTILIZADA NA DETERMINAÇÃO DE ÂNGULOS DE CONTACTO.....	113
FIGURA 3.18. MONTAGEM UTILIZADA PARA A DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS ASSOCIADOS ÀS PROPRIEDADES DIELECTRICAS.	114
FIGURA 3.19. REPRESENTAÇÃO DOS VALORES OBTIDOS PARA A UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES ALQUILAMÓNIOS COMO ELECTRÓLITOS DE SUPORTE DA FASE ORGÂNICA DE 1,6-DCH.	118
FIGURA 3.20. REPRESENTAÇÃO DE PARÂMETROS OBTIDOS PARA MACROINTERFACES LÍQUIDO-LÍQUIDO DE DIFERENTES DICLOROALCANOS.	120
FIGURA 3.21. REPRESENTAÇÃO DOS VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DA UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES DIHALOBUTANOS COMO FASE ORGÂNICA.	121
FIGURA 3.22. REPRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA A UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES ELECTRÓLITOS NA FASE AQUOSA.	122
FIGURA 3.23. REPRESENTAÇÃO DA CURVAS DE CAPACIDADE OBTIDAS PARA DIFERENTES FASES ORGÂNICAS GELIFICADAS.	123
FIGURA 3.24. REPRESENTAÇÃO DA VARIAÇÃO DA RESISTÊNCIA COM A ESPESSURA DE GÉIS DE 1,6-DCH.	125
FIGURA 3.25. REPRESENTAÇÃO DOS VALORES DAS PARTES REAL E IMAGINÁRIA DA CONSTANTE DIELECTRICA PARA DIFERENTES SOLVENTES ORGÂNICOS.	129
FIGURA 3.26. REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS DAS DE CONSTANTE DIELECTRICA PARA DIFERENTES FASES ORGÂNICAS EM 1,4-DBB.	131
FIGURA 3.27. REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS DAS COMPONENTES DA CONSTANTE DIELECTRICA PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BTPPATPBCL EM 1,4-DBB. A) COMPONENTE REAL; B) COMPONENTE IMAGINÁRIA.	132
FIGURA 3.28. REPRESENTAÇÃO DAS CAPACIDADES DIELECTRICAS PARA UM GEL ORGÂNICO DE 1,4-DBB CONSTITUÍDO POR 3% PVC, 10 mM BTPPATPBCL E 5 mM PDT.....	133
FIGURA 3.29. ISOTÉRMICAS DA ADIÇÃO DE DIFERENTES QUANTIDADES DE FT3 EM ÁGUA.....	134
FIGURA 3.30. ISOTÉRMICAS DA PREPARAÇÃO DE FILMES DE FT3 CONTENDO GOX.	135
FIGURA 3.31. REPRESENTAÇÃO DOS ÂNGULOS DE CONTACTO DE UMA GOTA DE ÁGUA NA SUPERFÍCIE DE UMA MEMBRANA DE POLIÉSTER.....	137
FIGURA 3.32. REPRESENTAÇÃO DOS ÂNGULOS DE CONTACTO DE GOTAS DE ÁGUA SOB A SUPERFÍCIE DE UM GEL ORGÂNICO DE O-NPOE CONSTITUÍDO POR 1.8% DBS, 10 mM TOATPB E 5 mM PDT.....	139
FIGURA 3.33. REPRESENTAÇÃO DOS ÂNGULOS DE CONTACTO OBTIDAS PARA UMA GOTA DE SOLUÇÃO DE GOX SOB UMA SUPERFÍCIE DE POLIÉSTER.	139
FIGURA 3.34. REPRESENTAÇÃO DOS ÂNGULOS DE CONTACTO DE GOTAS DE ÁGUA SOBRE POLIÉSTER.	140

Índice de Tabelas

Capítulo 1

TABELA 1.1. RESUMO DAS VÁRIAS CLASSES DE BIOSSENSORES E BIOMOLÉCULAS.....	6
TABELA 1.2. TABELA DE MATERIAIS E REAGENTES UTILIZADOS.....	24
TABELA 1.3. DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE I_{MAX} E K_M , OBTIDOS POR AJUSTE NÃO-LINEAR DA EQUAÇÃO DE HILL.....	46
TABELA 1.4. DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE I_{MAX} , K_M E K_3 , OBTIDOS POR UM AJUSTE NÃO-LINEAR DA EQUAÇÃO DE HILL E DA EXPRESSÃO 1.24, PARA DIFERENTES TEMPERATURAS.....	48
TABELA 1.5. VALORES DOS PARÂMETROS DE ARRHENIUS.....	50

Capítulo 2

TABELA 2.1. RESUMO DOS ELEMENTOS PRESENTES EM CIRCUITOS ELÉCTRICOS EQUIVALENTES.....	60
TABELA 2.2. QUADRO RESUMO DAS APLICAÇÕES MAIS FREQUENTES EM BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS...	63
TABELA 2.3. RESUMO DOS MATERIAIS E REAGENTES UTILIZADOS.....	64
TABELA 2.4. VALORES PARA O DESVIO DA RESPOSTA DEVIDO À PRESENÇA DE ETANOL.....	77

Capítulo 3

TABELA 3.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS SOLVENTES ORGÂNICOS UTILIZADOS	89
TABELA 3.2. MATERIAIS E REAGENTES UTILIZADOS	101
TABELA 3.3. OPTIMIZAÇÃO DOS GÉIS ORGÂNICOS DE 1,6-DCH.....	116
TABELA 3.4. OPTIMIZAÇÃO DE GÉIS ORGÂNICOS DE BROMOALCANOS.....	117
TABELA 3.5. VALORES OBTIDOS POR EIE PARA DIFERENTES ESPESURAS DE GÉIS DE 1,6-DCH.....	125
TABELA 3.6. VALORES PARA OS COEFICIENTES DE DIFUSÃO DE ALGUNS IÕES ATRAVÉS DE UMA INTERFACE GELIFICADA ÁGUA 1,6-DCH.....	126
TABELA 3.7. VALORES DOS PARÂMETROS DIELECTRICOS DE SOLVENTES ORGÂNICOS PUROS.....	130
TABELA 3.8. VALORES DOS ÂNGULOS DE CONTACTO DE UMA GOTA DE ÁGUA EM VÁRIAS SUPERFÍCIES.....	138

Lista de Símbolos e Abreviaturas

a	Actividade da espécie
A	Área interfacial (cm^2)
A	Factor de Arrhenius ou factor pré-exponencial
AA	Ácido ascórbico
C	Capacidade
C_{dc}	Capacidade da dupla camada
CE	Contra Eléctrodo
C_r	Capacidade de relaxação dieléctrica
C_v	Capacidade no vazio
D	Coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)
E_a	Energia de activação
E_0	Potencial de polarização dc
E_{p+}	Potencial de pico anódico
E_{p-}	Potencial de pico catódico
F	Constante de Faraday
f_c	Frequência de condução
g_i	Factor característico do modo de relaxação dieléctrica
I	Intensidade de corrente
I_0	Intensidade de corrente de um dieléctrico ideal
I_c	Intensidade de corrente capacitiva
I_{cond}	Intensidade de corrente de condução de um dieléctrico
I_d	Intensidade de corrente de difusão
I_f	Intensidade de corrente faradaica
I_{max}	Intensidade de corrente máxima
I_p	Intensidade de corrente de pico
I_{p+}	Intensidade de corrente para a transferência iónica anódica
I_{p-}	Intensidade de corrente para a transferência iónica catódica
I_r	Intensidade de corrente de relaxação dieléctrica
j	Número imaginário
k	Constante de velocidade da reacção
K	Constante de equilíbrio
k_{cat}	Parâmetro da eficiência catalítica
kDa	KiloDalton

Lista de símbolos e abreviaturas

K_M	Constante de Michaelis-Menten
K_M^{app}	Constante de Michaelis-Menten aparente
n	Número de electrões
n	Número de moles
pH	$-\log [H^+]$
pK_a	$-\log K_a$
Q	Elemento de fase constante
r	Coefficiente de correlação
r	Raio
R	Constante dos gases
R_c	Resistência de condução dieléctrica
R_r	Resistência de relaxação dieléctrica
R_{sol}	Resistência da solução
R_{tc}	Resistência à transferência de carga
T	Temperatura
v	Velocidade de varrimento
V	Potencial
V	Volume da camada enzimática
V_{max}	Velocidade máxima
W	Warburg
Z	Impedância total
Z'	Componente real da impedância
Z''	Componente imaginária da impedância
Z_f	Impedância faradaica
Z_w	Impedância de Warburg
β	Parâmetro polidispersivo do sistema
ΔE	Campo eléctrico
$\Delta \epsilon$	Amplitude dieléctrica
ϵ	Constante dieléctrica
ϵ'	Componente real da constante dieléctrica
ϵ''	Componente imaginária da constante dieléctrica
ϵ_0	Constante dieléctrica no vazio
ϵ_r	Constante dieléctrica relativa
ϵ_∞	Constante dieléctrica para uma frequência infinita

ϕ	Ângulo de fase
γ	Tensão superficial
γ_c	Tensão superficial crítica
γ_{lv}	Tensão superficial líquido-vapor
γ_{sl}	Tensão superficial sólido-líquido
γ_{slv}	Tensão superficial sólido-líquido-vapor
γ_{sv}	Tensão superficial sólido-vapor
λ	Parâmetro relativo à dispersão dos tempos de condução dielétrica
v	Velocidade da reacção enzimática
Π	Pressão superficial
Π_T	Pressão superficial de transição
θ	Ângulo de contacto
θ_a	Ângulo de contacto de avanço
θ_h	Ângulo de contacto de histerese
θ_r	Ângulo de contacto de regresso
τ_c	Tempo de condução dielétrica
τ_r	Tempo de relaxação dielétrica
ω	Frequência angular
ω_c	Frequência de condução dielétrica
ω_r	Frequência de relaxação dielétrica

ADN	Ácido desoxirribonucleico
A. m. m.	Área média por molécula
ARF	Analizador de Resposta de Frequência
BTPPA ⁺	Catião bis(tetrapentilfenil)amónio
BTPPACl	Cloreto de bis(tetrapentilfenil)amónio
BTPPATPB	Tetrafenilborato de bis(tetrapentilfenil)amónio
BTPPATPBCl	Tetraquis(4-clorofenil)borato de bis(tetrapentilfenil)amónio
CAT	Complexação Aquosa seguida de Transferência
1,4-DBB	1,4-dibromobutano
DB18C6	Éter de dibenzo-18-coroa-6
1,6-DBH	1,6-dibromohexano
1,3-DBP	1,3-dibromopropano
DBS	1,3:2,4-dibenzilideno sorbitol

Lista de símbolos e abreviaturas

1,4-DCB	1,4-diclorobutano
1,2-DCE	1,2-dicloroetano
1,6-DCH	1,6-diclorohexano
1,3-DCP	1,3-dicloropropano
1,4-DIB	1,4-diiodobutano
E	Enzima
EDBS	1,3:2,4-etildibenzilideno sorbitol
EIE	Espectroscopia de Impedância Electroquímica
EPFL	Escola Politécnica Federal de Lausane
ES	Complexo enzima-substrato
ESI	Eléctrodo selectivo de iões
ET	Eléctrodo de trabalho
FAD	Dinucleótido flavoadenina
GOx	<i>Glucose oxidase</i>
ITIES	Interface entre duas soluções electrolíticas imiscíveis
ITO	Óxido de índio e estanho
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
KTPBCl	Tetraquis(4-clorofenil)borato de potássio
L	Indutância
LB	Langmuir-Blodgett
LC	Líquido condensado
LE	Líquido expandido
LCR METER	Medidor de Indutâncias, Capacitâncias e Resistências
macro-ITIES	Macrointerface entre duas soluções electrolíticas imiscíveis
MDBS	1,3:2,4-metildibenzilideno sorbitol
micro-ITIES	Microinterface entre duas soluções electrolíticas imiscíveis
NaTPB	Tetrafenilborato de sódio
NB	Nitrobenzeno
o-NPOE	Éter orto-nitrofeniloctílico
P	Produto
PDT	3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina
PE	Polietileno
PET	Polietilenoteraftalado
PFT	Poli(fenilenodiamina)
PI	Ponto isoeléctrico de enzimas
PMMA	Polimetilmetacrilato

PTFE	Politetrafluoretileno
PVC	Policloreto de vinilo
R	Resistência
RE	Eléctrodo de referência
S	Substrato
SAM's	Monocamadas automontadas
SCE	Eléctrodo selectivo de calomelanos
SECM	Microscopia electroquímica de varrimento
TCI	Transferência por Complexação Interfacial
TCO	Transferência seguida de Complexação em fase Orgânica
TDABr	Brometo de tetradodecilamónio
TDATPB	Tetrafenilborato de tetradodecilamónio
TDATPBCI	Tetraquis(4-clorofenil)borato de tetradodecilamónio
TDI	Transferência por Dissociação Interfacial
FTn (n=1-4)	9,9-difenilfluoreno oligotiofenos
THF	Tetraidrofurano
THpABr	Brometo de tetraheptilamónio
TOA ⁺	Catião tetraoctilamónio
TOABr	Brometo de tetraoctilamónio
TOATPB	Tetrafenilborato de tetraoctilamónio
TOATPBCI	Tetraquis(4-clorofenil)borato de tetraoctilamónio
UV	Ultravioleta
YSI	Yellow Spring Instruments

Nota do autor:

Devido à especificidade destas matérias existem muitos termos, designações e expressões em língua inglesa que ainda não reuniram o consenso para uma tradução em língua portuguesa. Assim, para se evitarem erros de má tradução, utilizam-se alguns termos em inglês para os quais não se encontrou tradução.

1 Desenvolvimento do biossensor

Neste capítulo é feita uma descrição do desenvolvimento dos biossensores ao longo das últimas décadas, em particular dos biossensores amperométricos para a determinação de glucose. É também realizada uma abordagem à evolução e desenvolvimento das interfaces líquido-líquido, como modelo principal do desenvolvimento deste tipo de biossensores. Finalmente descreve-se a preparação e modo de funcionamento deste biossensor para determinação de glucose.

1.1 BIOSSENSORES.....	3
1.1.1 EVOLUÇÃO DOS BIOSSENSORES DE GLUCOSE	4
1.1.2. CONSTITUIÇÃO DOS BIOSSENSORES: A ENZIMA	6
1.1.3. CINÉTICA ENZIMÁTICA	7
1.1.4. PROCESSOS DE IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS.	9
1.2. INTERFACES ENTRE DUAS SOLUÇÕES ELECTROLÍTICAS IMISCÍVEIS (ITIES).....	12
1.2.1. EVOLUÇÃO	12
1.2.2. DETERMINAÇÃO ANALÍTICA UTILIZANDO AS ITIES.....	13
1.2.3. MICRO-ITIES	14
1.2.4. POLARIZABILIDADE DAS ITIES	19
1.2.5. PROCESSOS DE TRANSPORTE DE MASSA NAS ITIES	20
1.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	23
1.3.1. PREPARAÇÃO DOS FILMES DE POLIÉSTER	24
1.3.2. PREPARAÇÃO DOS ELÉCTRODOS DE Ag/AgCl	24
1.3.3. SÍNTESE DO TETRAFENILBORATO DE TETRAOCTILAMÓNIO (TOATPB).....	25
1.3.4. PREPARAÇÃO DOS GÉIS	25
1.3.5. MONTAGEM DO SENSOR	26
1.3.6. TÉCNICA: VOLTAMETRIA CÍCLICA.....	28
1.4 DESENVOLVIMENTO DO BIOSSENSOR.....	31
1.4.1. DETECÇÃO DA D(+)-GLUCOSE	32
1.4.2. EFEITO DA VELOCIDADE DE VARRIMENTO	39
1.4.3. DETECÇÃO POTENCIOMÉTRICA VS. DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA	41
1.4.4. EFEITO DA TEMPERATURA	43
1.5 CONCLUSÃO	50

1.1 Biossensores

De uma forma simplificada podem-se considerar os biossensores como dispositivos que utilizam a capacidade de selectividade e sensibilidade das biomoléculas na detecção ou resposta a interacções específicas do meio ambiente¹. Segundo a IUPAC² um biossensor é definido como dispositivo integrado autónomo, capaz de proporcionar informação quantitativa utilizando um elemento de reconhecimento biológico, que se encontra em contacto com um elemento transdutor.

Como já referido, a característica marcante de um biossensor é a presença de um elemento biológico (anticorpo, enzima, células, ADN, etc.) em contacto com um transdutor físico-químico, como um eléctrodo, uma fibra óptica ou um elemento piezoeléctrico. Contudo, é possível dividir, genericamente, a constituição de um biossensor amperométrico em quatro partes fundamentais: um biocatalisador cujos produtos constituem normalmente as espécies a determinar, um transdutor que converte a espécie a estudar num sinal amperométrico, um potenciostato que controla a diferença de potencial necessária para que se possa verificar a resposta amperométrica e um microprocessador para interpretar e analisar os resultados. Assim, a interacção físico-química entre os produtos da reacção (resultantes da reacção enzimática) catalítica e o transdutor, conferem a especificidade e sensibilidade características dos biossensores. Embora sejam estas as propriedades que sobressaem nos biossensores, um biossensor para ser bem sucedido deverá conter outras características, tais como³:

- Resposta exacta, precisa e reprodutível;
- Biocompatibilidade;
- Tamanho reduzido;
- Estabilidade;
- Operacional em várias condições (de temperatura, agitação, pH, etc.);
- De fácil manuseamento;
- Baixo custo;

Os biossensores representam um caso de sucesso de evolução dos métodos de determinação analítica, não apenas nos meios clínicos^{4,5}, mas também a nível do ambiente e das indústrias alimentares devido às características que os definem, nomeadamente, a aplicabilidade, a portabilidade, a rapidez de amostra, o baixo volume de amostra, o baixo custo, etc.

1.1.1 Evolução dos biossensores de glucose

O primeiro biossensor para a determinação de glucose resultou do trabalho de Clark e Lyons⁶, publicado em 1962, no qual colocaram a enzima, junto a um eléctrodo de platina numa membrana em sanduíche. Este sistema para a determinação de glucose baseava-se na seguinte reacção, catalisada pela GOx:



Este tipo de eléctrodo foi posteriormente comercializado, em 1974, pela Yellow Springs Instrument (YSI)⁷ e encontra-se esquematizado na figura 1.1. Sendo extremamente fiável, ganhou grande aceitação nos laboratórios clínicos e hospitalares na determinação da concentração de glucose no sangue. Todavia o seu elevado preço e dimensões apreciáveis limitaram as suas utilizações como sensor portátil.

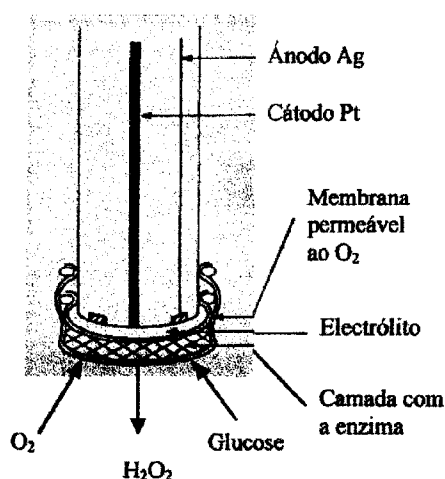


Figura 1.1. Representação esquemática do primeiro biossensor para a determinação de glucose: o eléctrodo enzimático de Clark.

Surge então em 1987 a primeira versão de um biossensor para a determinação de glucose desenhado para utilização caseira. Baseado no trabalho desenvolvido por Hill *et al.*⁸, nos laboratórios da Universidade de Oxford e publicado em 1984. Este sensor foi lançado comercialmente pela MediSense, Inc. e possui como característica a utilização um derivado do ferroceno (1,1'-dimetilferroceno etanolamina) como mediador para a oxidação da glucose oxidase e de dois eléctrodos de trabalho. Um dos eléctrodos é usado para quantificar a glucose e o segundo é usado para avaliar o nível de espécies

interferentes. A concentração da glucose é então obtida pela subtracção do valor da corrente de ambos os eléctrodos.

Seguidamente outros sensores apareceram, como os da Bayer e da Boehringer, baseados também na utilização de ferroceno como mediador, todavia, em termos de exactidão e precisão não rivalizavam com o sensor da YSI. Estas versões correspondem às denominadas “primeira geração”, para o caso do biossensor da YSI, e “segunda geração” para os restantes biossensores. Novos desenvolvimentos continuaram a surgir, denominados por uma “terceira geração” de biossensores, mas inúmeros avanços continuam a surgir actualmente conduzindo a novas gerações de biossensores com os mais diversos métodos de detecção e diferenciação, mantendo um elevado interesse nesta área. Alguns destes biossensores reúnem as características mínimas para uma aplicação como equipamento de detecção comercial^{9,10,11}.

A evolução observada no desenvolvimento de biossensores, e em particular os biossensores de glucose, foi realizada em paralelo, pela indústria farmacêutica e pela investigação científica. Estas duas vertentes conduziram a variadas metodologias e processos, mas com o mesmo objectivo final, uma fácil detecção analítica. Recentes artigos de revisão^{12,13}, revelam precisamente as duas metodologias que mais se têm destacado, nomeadamente, as dos sensores de fibra óptica e electroquímicos. Todavia, de entre estas diferentes metodologias, os biossensores baseados em enzimas continuam a ser os mais estudados. A tabela 1.1, resume as metodologias de maior aplicação.

Tabela 1.1. Resumo das várias classes de biossensores e biomoléculas.

Biossensores		Biomoléculas	
Térmicos		Cofactores	
Ópticos		Células	
Condutimétricos		Anticorpos	
Potenciométricos		ADN	
Amperométricos	Sais orgânicos condutores	Enzimas	<i>Álcool oxidase</i>
	Membranas lipídicas		<i>Peroxidase</i>
	Membranas de Nafion		<i>Urease</i>
	Microinterfaces líquido-gel		<i>Glucose oxidase</i>

1.1.2. Constituição dos biossensores: a enzima

A *glucose oxidase* (GOx), uma proteína globular da classe das enzimas oxirreductases, constituída por 20 aminoácidos diferentes e por duas sub-unidades idênticas de peso molecular 80 kDa, ligadas através de pontes dissulfureto, ligações iónicas e pontes de hidrogénio. A GOx contém também um grupo prostético por monómero, o dinucleótido flavoadenina (FAD), como representado na figura 1.2. Devido às suas propriedades oxirredutoras, o FAD é reduzido por duas transferências electrónicas de um único electrão¹⁴. Este grupo prostético não se encontra covalentemente ligado à proteína e pode ser facilmente libertado em condições de desnaturação, seguido da dissociação das duas sub-unidades¹⁵. Em soluções aquosas, cada monómero é um esferóide compacto de dimensões 60x52x37Å.



Figura 1.2. Imagem de uma estrutura de cristal da glucose oxidase de *Aspergillus niger* determinada a uma resolução de 2.3 Å¹⁶. Em que: 1. FAD; 2. Hélice α ; 3. Folha β .

Birss *et al*¹⁷, descreveram a importância biológica das flavoproteínas nas reacções de transferência electrónica dos sistemas vivos, especificando o arranjo espacial destas em ligações com superfícies de eléctrodos, para possíveis aplicações em sensores de glucose. Estes autores encontraram diferentes orientações do FAD, de acordo com o potencial aplicado.

A *glucose oxidase* catalisa a oxidação da β -D-glucose a D-glucono- δ -lactona que, subsequentemente, hidrolisa espontaneamente a ácido glucónico, em simultâneo com a redução do dioxigénio a peróxido de hidrogénio, como esquematizado na figura 1.3. Este modelo é consistente com o mecanismo do tipo "ping-pong", em que a β -D-glucose actua na redução da enzima, mais propriamente na redução do FAD, enquanto que o aceitador natural, o dioxigénio, actua como aceitador de dois electrões¹⁸.

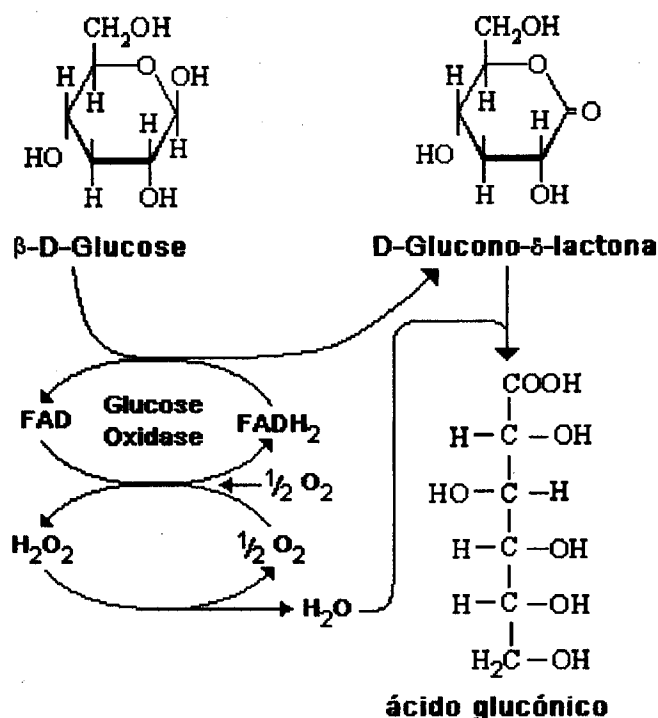


Figura 1.3. Esquema demonstrativo da reacção enzimática de decomposição da D(+)-glucose.

A glucose oxidase é a enzima mais utilizada nas aplicações em matrizes bioactivas para o desenvolvimento de equipamentos bioelectrónicos¹¹.

1.1.3. Cinética enzimática

O conceito de complexo enzima-substrato (denominado por ES) é fundamental para a compreensão das reacções enzimáticas, tendo este sido introduzido em 1913 por Michaelis e Menten¹⁹. A formação do complexo e a posterior separação deste podem ser resumidas pela equação:



A constante de dissociação do equilíbrio envolvendo o complexo ES é conhecida pela constante de Michaelis-Menten, K_M , em que:

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1 + k_4} \quad (1.2)$$

Todavia, o passo $E + P \longrightarrow ES$ é tão lento que pode ser negligenciado, assim, para o estado estacionário temos que:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1([E] - [ES]) - k_3[ES] - k_2[ES] = 0 \quad (1.3)$$

verifica-se então que:

$$\frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{([E] - [ES]) \times [S]}{[ES]} = K_M \quad (1.4)$$

rearranjando esta última expressão, vem que:

$$[ES] = \frac{[E] \times [S]}{K_M + [S]} \quad (1.5)$$

Por definição, a velocidade de formação de produto é proporcional à concentração do complexo ES.

$$v = k_3[S] \quad (1.6)$$

O que substituindo na equação 1.5, dá:

$$v = \frac{k_3[E] \times [S]}{K_M + [S]} \quad (1.7)$$

Para a condição em que $[S] \gg K_M$, atinge-se a velocidade máxima, $V_{\max}$. Em que:

$$V_{\max} = k_3[E]$$

O que substituindo na equação 1.6, dá:

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]} \quad (1.8)$$

Esta equação é conhecida como a equação de Michaelis-Menten. Através dela é possível obter o valor de K_M e a velocidade máxima, se utilizarmos concentrações de substrato relativamente elevadas. Verifica-se que para $V_{\max}/2$ o valor de K_M é numericamente igual à concentração de substrato correspondente.

A actividade catalítica é afectada por vários factores, como:

- Presença de inibidores;
- pH;
- Temperatura;

Estes factores podem aumentar, diminuir ou até mesmo suprimir a velocidade da reacção catalítica. Uma alteração destes parâmetros conduz a uma não linearidade da equação de Michaelis-Menten. Surge então uma variante que acrescenta um factor de correcção à equação, denominada de representação de Hill²⁰, descrita pela equação 1.9:

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \left(\frac{K_M^{app}}{[S]} \right)^\alpha} \quad (1.9)$$

em que α representa um desvio do comportamento ideal da equação de Michaelis-Menten, esta assim passa a ser representada por K_M^{app} , v é a velocidade da reacção enzimática, $V_{\max}$ é a velocidade máxima da reacção para uma determinada concentração de enzima, em que a enzima se encontra saturada com substrato.

1.1.4. Processos de imobilização de biomoléculas.

As enzimas em solução são normalmente utilizadas uma única vez. A utilização repetida, imposta pelos biossensores, conduz à procura de metodologias que favoreçam uma reutilização da enzima. Outros factores como a natureza da reacção enzimática, das espécies a determinar, do tipo de transdutor utilizado, ou das condições de

funcionamento do biossensor, conduzem à diversificação das técnicas de imobilização. A figura 1.4. apresenta um organograma que faz uma síntese das metodologias mais utilizadas¹⁴.

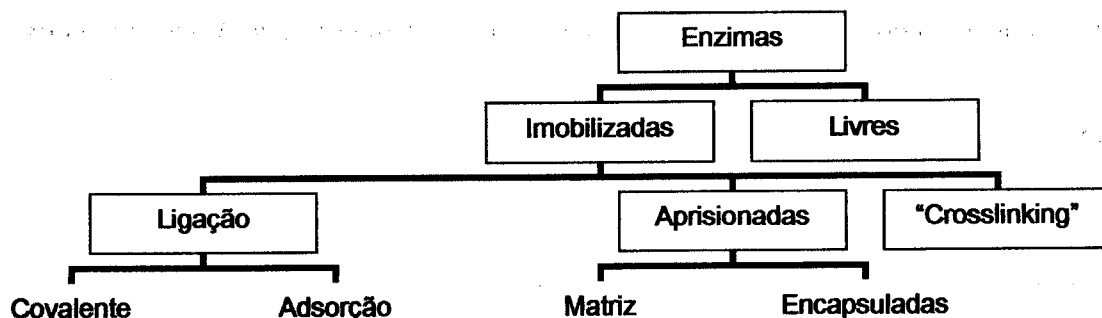


Figura 1.4. Organograma das técnicas de imobilização de enzimas mais utilizadas.

O objectivo de qualquer metodologia de imobilização é reter a máxima actividade da biomolécula na superfície do transdutor. Contudo, existem três parâmetros que condicionam ou melhoram a imobilização: cinética, pH e temperatura. Normalmente os processos de imobilização conduzem a uma diminuição da velocidade da reacção, o que conduz à necessidade de maiores concentrações de substrato para atingir o mesmo nível de resposta. A mesma situação é verificada quando se utilizam agentes funcionais, reflectindo-se na diminuição ou aumento da K_M^{app} , consoante a afinidade ou não do substrato com a matriz. A influência do pH traduz-se no deslocamento do pH óptimo da enzima para a região alcalina em grupos carregados negativamente, enquanto que grupos carregados positivamente induzem valores de pH mais baixos. Quanto à temperatura, enzimas aprisionadas e ligadas a grupos funcionais são, normalmente, termicamente mais estáveis.

Analisando os factores que influenciam as biomoléculas, como as condições do meio ou o procedimento de imobilização, é possível definir a técnica que possui as condições adequadas ao sistema em estudo. As técnicas de imobilização de maior utilização são as de ligação covalente e adsorção. A adsorção física da biomolécula baseia-se na formação de forças atractivas de Van der Waals entre as biomoléculas e o eléctrodo. Este método, não exige qualquer modificação química e possui a vantagem da simplicidade, requerendo apenas uma solução contendo a enzima a utilizar. Todavia, facilmente poderá ocorrer uma perda da enzima adsorbida se ocorrerem alterações do meio durante as medições como, variações de pH, força iónica ou temperatura²¹. Relativamente à ligação covalente, esta técnica baseia-se na reacção entre grupos

funcionais terminais da enzima, não essenciais à actividade catalítica, e grupos reactivos da superfície. Embora a técnica da ligação covalente possua a vantagem de dificilmente a enzima se desprender da matriz de suporte, durante a utilização, a eficiência relativa da ligação de uma quantidade de enzima no estado imobilizado deve ser sempre comparada com a actividade de uma quantidade idêntica de enzima em solução. Vários métodos são apontados para a formação da ligação covalente, como por exemplo, via a ligação por grupos acilo, diazónio e tióis²².

A técnica de aprisionamento é mais utilizada em enzimas de elevada massa molecular, em que estas são aprisionadas, por exemplo em géis em contacto directo com a superfície de um eléctrodo selectivo de iões (ESI). Usualmente esta camada é separada da solução teste por uma membrana semipermeável, de forma a retardar a lixiviação da enzima. Todavia, para enzimas de baixo peso molecular o comportamento não se encontra próximo do desejado. Ogawa e colaboradores descrevem, por exemplo, no seu trabalho o aprisionamento da urease em um novo sistema de microgéis²³ e a co-imobilização de duas enzimas (gluconolactonase e glucose oxidase) para a melhoria da cinética de géis de polielelectrólitos²⁴.

Quanto à técnica de "crosslinking", esta baseia-se na formação de partículas como resultado da reacção da enzima com o agente bifuncional. A metodologia mais utilizada na aplicação é a de mergulho em que o eléctrodo é imerso numa solução activa contendo a enzima e o agente bifuncional (p. ex. glutaraldeído, carbodiimida, etc.) de forma a cobrir toda a superfície.

Novas técnicas continuam a surgir com o avanço tecnológico, como a utilização de filmes de monocamadas. Esta metodologia será desenvolvida com maior pormenor no capítulo três com o objectivo de optimização da técnica de imobilização utilizada neste biossensor.

1.2. Interfaces Entre Duas Soluções Electrolíticas Imiscíveis (ITIES)

A electroquímica das ITIES (Interface between Two Immiscible Electrolyte Solutions) é uma temática que tem suscitado elevado interesse devido ao elevado número de aplicações. Em particular irá dar-se especial relevo às suas aplicações analíticas. Apesar de serem estudadas, há já algum tempo, só num passado recente o estudo electroquímico das duplas camadas nas interfaces líquido-líquido e líquido-gel se traduziram em algumas aplicações^{25,26,27,28,29}, em grande parte devido às dificuldades experimentais no manuseamento destas interfaces. A investigação desenvolvida actualmente nesta temática visa a compreensão dos mecanismos de transferência de carga nas microinterfaces líquido-líquido e líquido-gel, juntamente com a procura de aplicações práticas das ITIES, temática esta subjacente a este trabalho.

1.2.1. Evolução

A primeira referência ao estudo electroquímico das interfaces líquido-líquido reporta a 1902, no trabalho desenvolvido por Nernst e Riesenfeld³⁰, em que se estudaram os fenómenos de difusão e de migração na passagem de uma intensidade de corrente constante através de uma interface líquido-líquido. Surge, posteriormente, em 1939 o primeiro modelo para a estrutura na interface formada entre dois líquidos imiscíveis, através do estudo realizado a diferentes sistemas por Verwey e Niessen³¹. Estes sugeriram que a dupla camada era constituída por duas camadas de difusão paralelas, mas só uns anos mais tarde, em 1968, com o trabalho desenvolvido por Gavach e colaboradores³², em interfaces polarizáveis, é que se clarificaram alguns aspectos dos fenómenos de transporte de massa nas interfaces líquido-líquido.

Mas a grande revolução, em termos electroquímicos, surge em 1976 com o trabalho realizado por Koryta e colaboradores³³ em que estes demonstraram a possibilidade de utilização das ITIES como modelos simplificados de membranas biológicas, abrindo assim a porta para inúmeras aplicações. Esta possibilidade foi abordada, em 1848 por Du Bois-Reymond³⁴, em que este sugere que as superfícies de sistemas biológicos teriam propriedades semelhantes às de um eléctrodo de uma célula galvânica. Recentemente,

Volkov³⁵ no seu livro refere a utilização da transferência iónica nas ITIES como base ou modelo de vários sistemas importantes como as biomembranas, os industriais e os analíticos.

1.2.2. Determinação analítica utilizando as ITIES

Samec *et al*³⁶, em 1977 introduziram a utilização do potenciostato de quatro eléctrodos com compensação óhmica no estudo das ITIES. Este trabalho conduziu à aplicação de várias técnicas electroquímicas, entre as quais, a voltametria cíclica^{37,38,39}, a cronoamperometria⁴⁰, a espectroscopia de impedância electroquímica⁴¹ e a voltametria diferencial de impulsos, sendo esta utilizada na determinação do catião acetilcolínio, no primeiro artigo de utilização das ITIES com fins analíticos, publicado em 1981 por Mareček *et al*^{25,42}.

O primeiro trabalho que descreve uma aplicação das ITIES em biossensores foi relatado por Osakai *et al*⁴³ e mostra o desenvolvimento de um biossensor baseado na detecção do catião amónio proveniente da decomposição da ureia. A transferência assistida deste catião através das ITIES origina um sinal amperométrico, proporcional à concentração de ureia (1 a 2000 μM).

A utilização das ITIES em estudos analíticos encerra ainda alguns problemas, essencialmente devido à dificuldade experimental no manuseamento da interface líquido-líquido e a outras limitações, como:

- Natureza tóxica dos solventes orgânicos;
- Queda óhmica elevada;
- Instabilidade da interface;

Estas dificuldades experimentais na preparação das células electroquímicas traduzem-se, sobretudo, na falta de reprodutibilidade das áreas interfaciais e com a elevada resistência observada no sistema electroquímico.

1.2.3. Micro-ITIES

Desde final dos anos setenta que se tem desenvolvido grande investigação na área dos microelectrodos, nomeadamente do estudo de processos de electrodo, cinética de reacção e desenvolvimento de sensores com fim analítico e clínico. Estes podem ser definidos como electrodos de dimensão reduzida, de tal forma que as suas propriedades, tais como o transporte de massa, são uma função do seu tamanho. Podem-se então enumerar as principais vantagens dos microelectrodos como sendo⁴⁴:

- Realce do transporte de massa;
- Redução da capacitância da dupla camada (devido à menor área do electrodo);
- Diminuição das perdas óhmicas (permitindo a investigação de reacções de transferência de carga);
- Análise dos resultados relativamente simples;

Todas estas vantagens podem transpor-se para os sistemas constituídos por micro-ITIES.

Uma outra vantagem da utilização das microinterfaces, relaciona-se com a utilização de apenas 2 electrodos nas determinações electroquímicas. Isto sucede porque a elevada área interfacial das macrointerfaces (da ordem dos cm^2) implica a utilização de 4 electrodos de forma a minimizar a diferença de potencial devida à resistividade dos solventes orgânicos⁴⁵. Tal já não se sucede nas micro-ITIES devido às suas menores dimensões (da ordem das décimas de mm^2).

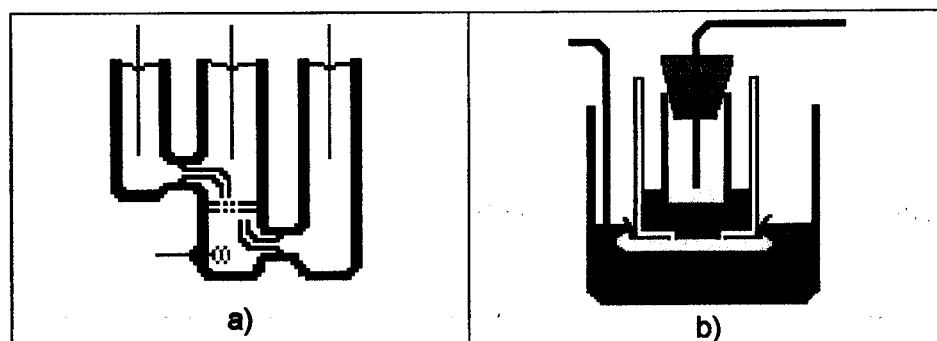


Figura 1.5. Representação esquemática das células utilizadas em estudos de ITIES, utilizando a voltametria cíclica: a) Macro-ITIES em 4 electrodos; b) Micro-ITIES em 2 electrodos.

Micro-ITIES suportadas em pontas de micropipeta

Face às limitações evidenciadas para as ITIES, surge uma revolução com a introdução do novo conceito de micro-ITIES suportadas em pontas de micropipeta, desenvolvido por Taylor e Girault⁴⁶. A sua utilização, devido à área reduzida das interfaces, diminui bastante o efeito da resistência do sistema electroquímico. Surgiram de seguida vários estudos utilizando as micropipetas^{47,48,49,50}, nomeadamente na utilização de micro-ITIES para a determinação das espécies iónicas limitativas da janela de potencial em interfaces líquido-líquido⁵¹. Mais recentemente, no trabalho de Shao *et al*⁵², estes demonstraram também a possibilidade de utilizar micropipetas, cuja parede interior é previamente silanizada de forma a tornar essa superfície hidrofóbica, em medições voltamétricas quantitativas de reacções de transferência electrónica e iónica. Todavia, uma das características principais destas interfaces é a difusão assimétrica que existe em ambos os lados da interface. Identificam-se deste modo dois comportamentos diferentes de transferência iónica: a difusão linear que ocorre na transferência do interior da micropipeta para a interface e a difusão esférica que ocorre quando o transporte de iões é realizado do meio exterior para a interface, como descreve a referência 51. Beattie *et al*⁵³ demonstraram, posteriormente, que uma interface suportada em pontas de micropipeta revela um comportamento entre o de uma microesfera e uma microhemisfera, definido por:

$$I_d = 3.35\pi nFDc^*r \quad (1.10)$$

em que, I_d é a difusão da corrente limite, em amperes, r o raio da micropipeta em cm, c^* a concentração em solução das espécies limitantes em mol.cm⁻³ e D os coeficientes de difusão em cm².s⁻¹.

Micro-ITIES suportadas em microorifícios

Apesar de se diminuir o efeito da resistência do sistema electroquímico utilizando as micro-ITIES suportadas em micropipetas, outras limitações apareceram através da evidência de que as pontas bloqueavam com o decurso da experiência, aumentando os valores da corrente. Surge então o desenvolvimento de uma nova microinterface constituída por um único microorifício ou conjunto de microorifícios produzidos em filme de poliéster, nomeadamente polietilenoteraftalado (PET), pela aplicação do processo de

fotoablação laser por UV. Este trabalho pioneiro foi desenvolvido por Campbell e Girault⁵⁴ que utilizaram um filme de PET microperfurado com um único orifício de 20 µm de diâmetro para o estudo da transferência iónica do catião acetilcolínio através de uma interface água|1,2-DCE.

A utilização destas ITIES suportadas em microorifícios ultrapassa as ligeiras desvantagens das micropipetas referidas acima, e comparativamente, Osborne *et al*⁵⁵, demonstraram a que estas últimas possuem um comportamento análogo a um eléctrodo de microdisco de dimensões idênticas, cujo comportamento é descrito por:

$$I_d = 4nFDc^*r \quad (1.11)$$

em que os símbolos se encontram descritos na equação 1.10.

À mesma conclusão chegaram Pereira e Silva⁵⁶, que aplicaram a voltametria de onda quadrada em micro-ITIES, formadas em conjuntos de microorifícios perfurados em filmes de poliéster, cujos resultados experimentais obtidos para a transferência do anião perclorato eram idênticos aos obtidos em transferências electrónicas reversíveis em microeléctrodos.

Uma das aplicações possíveis das interfaces microperfuradas é a integração em sensores cuja resposta permitirá a detecção amperométrica das espécies que atravessam as micro-ITIES^{55,57}. Embora exista um vasto trabalho realizado nesta temática^{58,59,60} o processo ainda não se encontra completamente optimizado, dado que existem características específicas de cada sistema que influenciam o comportamento destas microinterfaces. Podem-se enumerar algumas dessas propriedades como, a posição da interface no orifício, o diâmetro dos orifícios, a distância entre os orifícios, a espessura do filme e outras propriedades da fase orgânica, como a viscosidade e resistência do gel. Este conjunto de factores podem alternar o regime de transporte de carga entre simétrico e assimétrico. A figura 1.6 esquematiza o processo de alteração do transporte de carga resultante da variação da distância entre dois microorifícios.

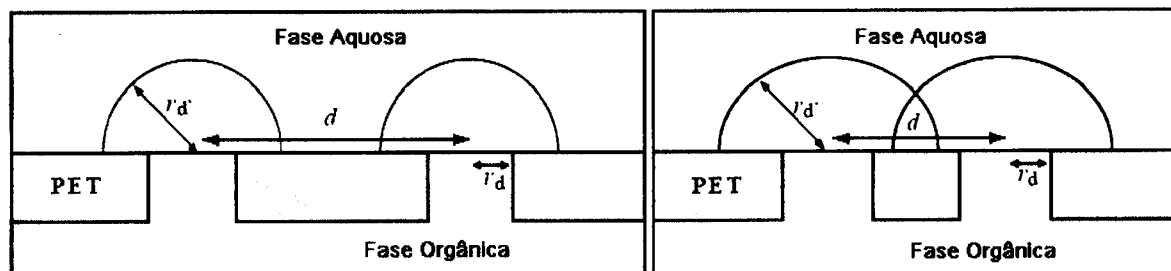


Figura 1.6. Camada de difusão em microorifícios: distanciados entre si e próximos⁴⁴.

Micro-ITIES gelificadas

A utilização das micro-ITIES diminuiu bastante o problema da queda ôhmica associada às ITIES e melhorou a estabilidade das interfaces, todavia o problema da formação de interfaces mecanicamente estáveis ainda não se encontrava completamente resolvido. Surge então uma nova aproximação com a gelificação das fases, obtendo-se assim uma nova variante das microinterfaces líquido-líquido, as microinterfaces líquido-gel. Estas ultrapassam o problema da instabilidade mecânica das interfaces líquido-líquido, pela gelificação tanto da fase orgânica como da fase aquosa, apesar de pequeno aumento dos valores da resistência na interface. Esta limitação, apesar de diminuir os coeficientes de difusão dos íons no gel, continua a permitir que se utilizem as reacções de transferência iónica nestes sistemas de detecção amperométrica⁶¹.

A interface solidificada líquido-gel, assemelha-se assim a um ESI fabricado com uma membrana polimérica gelificada. A primeira tentativa de utilizar uma fase orgânica polimérica e electrolítica para a monitorização da concentração de alguns íons foi realizada por Kakutani *et al*⁶², que solidificaram uma solução electrolítica de nitrobenzeno pela adição de PVC. Num trabalho posterior Dvořák *et al*⁶³, acompanharam a transferência iónica (íons tetrametilamónio, colina, perclorato e picrato) através de uma interface gel-líquido utilizando a impedância faradaica e verificaram que esta transferência era tão rápida quanto nas interfaces líquido-líquido.

Como agente gelificante da fase aquosa utiliza-se com sucesso o agár, enquanto que o policloreto de vinilo é o mais utilizado na gelificação das fases orgânicas. Uma outra possibilidade tem sido utilizada por este grupo de investigação na qual se combinam as micro-ITIES suportadas em microorifícios com a gelificação da fase orgânica por adição de 1,3:2,4-dibenzilideno sorbitol (DBS)⁶¹.

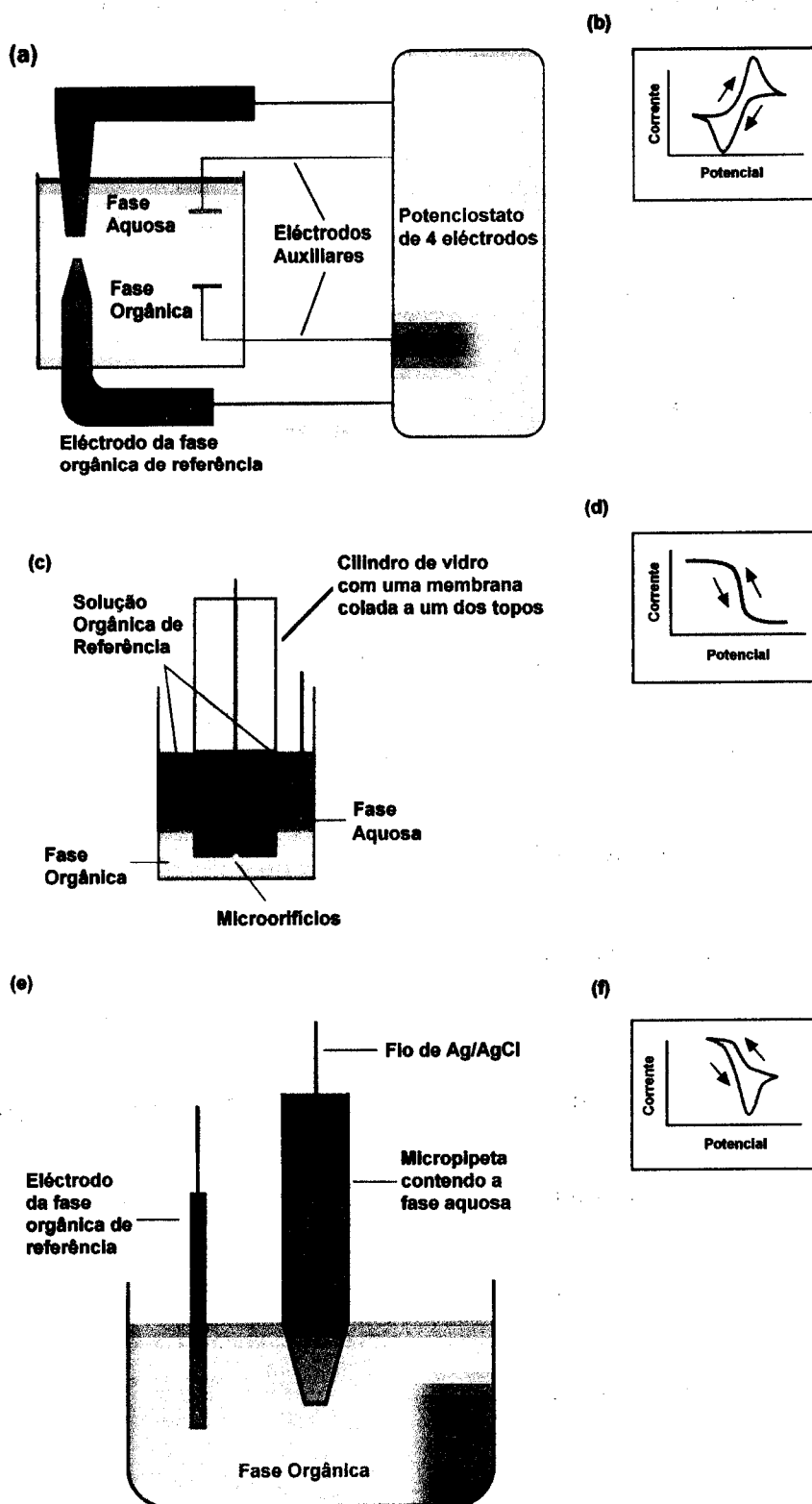


Figura 1.7. Esquema das determinações voltamétricas em (a) macro e micro-ITIES suportadas em (c) microorifícios (e) micropipetas. Sendo (b, d e f) os voltamogramas cíclicos correspondentes. Adaptada da referência 45.

Resumindo, o desenvolvimento deste tipo de transdutores (microinterfaces suportadas em pontas de micropipeta e em microorifícios), em sintonia com a gelificação das fases, permitiu a eliminação das duas grandes dificuldades que se apresentavam às ITIES: a natureza resistiva do solvente orgânico (pela utilização das micro-ITIES) e a instabilidade mecânica das interfaces (pela gelificação das fases). Apesar de ocorrer um pequeno aumento da resistividade, este não impediu o acompanhamento das reacções de transferência iónica por técnicas electroquímicas.

1.2.4. Polarizabilidade das ITIES

Quando uma diferença de potencial é aplicada através de uma interface líquido-líquido, é possível distinguir dois comportamentos distintos das interfaces electrificadas: as interfaces *idealmente polarizáveis* e as interfaces *idealmente não polarizáveis*. A diferença reside na aplicação de uma grande diferença de potencial gerar uma pequena corrente através da interface, nas interfaces polarizáveis, enquanto que nas idealmente não polarizáveis, uma corrente elevada pode ser obtida pela aplicação de uma pequena diferença de potencial. Esta polarizabilidade das ITIES está directamente relacionada com a energia de Gibbs de transferência dos sais electrolíticos⁶⁴.

Para o caso em que um sal hidrofílico é dissolvido na fase aquosa e um sal hidrofóbico na fase orgânica (casos em que se verifica que a concentração dos respectivos sais nas fases opostas é negligenciável comparativamente à concentração do sal da respectiva fase), considera-se a interface como *idealmente polarizável*. Nesta situação é possível polarizar a interface através de uma fonte de potencial exterior, sem modificar quimicamente a composição química das fases adjacentes. Assim, é possível estabelecer a denominada "janela de potencial", possibilitando a polarização da interface para um ponto em que a diferença de potencial galvânica aplicada é suficiente para a transferência do ião através da interface.

Resumindo, define-se "janela de potencial" como o intervalo onde a interface se comporta como idealmente polarizável. A amplitude da janela de potencial é então determinada pela transferência dos iões dos electrolitos de suporte. A figura 1.8 delimita claramente este intervalo, assim como as transferências iónicas que ocorrem com a alteração do potencial.

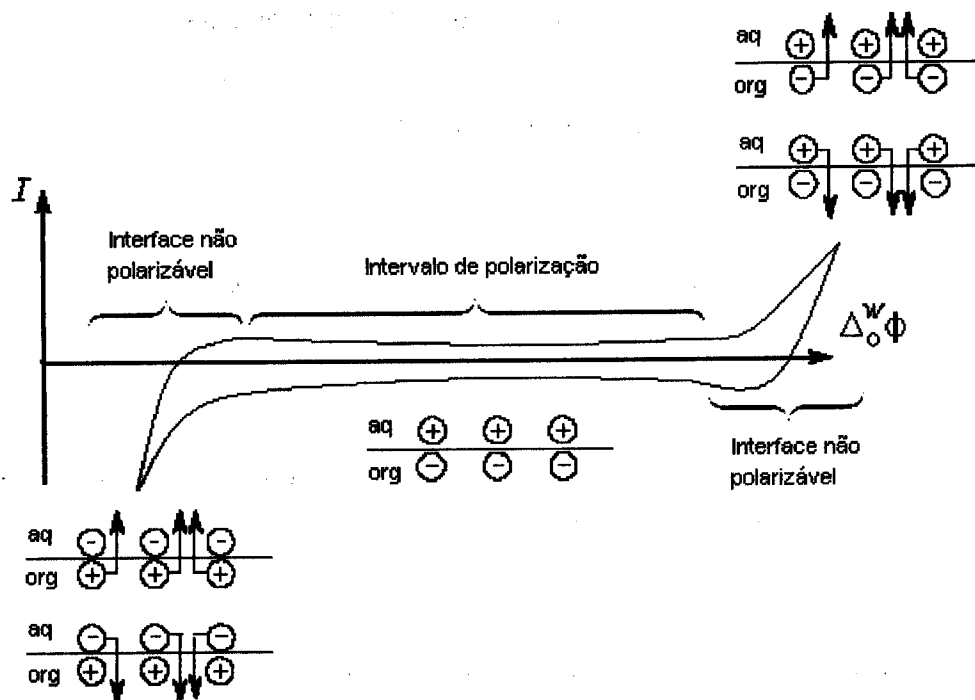


Figura 1.8. Esquema do processo interfacial dentro da janela de potencial. Adaptado da referência 64.

1.2.5. Processos de transporte de massa nas ITIES

Através das ITIES podem ser considerados quatro processos de transferência diferentes:

- Transferência electrónica através das ITIES;
- Transferência electrónica fotoinduzida por uma reacção;
- Transferência iónica através das ITIES;
- Transferência iónica assistida por ligandos;

As reacções de transferência iónica assistida por ligandos foram primeiro estudadas por Koryta⁶⁵, contudo a dificuldade de se encontrarem ligandos apropriados para a transferência no intervalo de polarizabilidade da interface e o desconhecimento do mecanismo pelo qual estas reacções se desenrolam, conduziram a que se realizassem vários estudos^{66,67}. Mais tarde, Shao *et al*⁴⁷, propuseram que a transferência assistida por ligandos pode ocorrer por quatro mecanismos diferentes:

- CAT (Complexação em fase Aquosa seguido de Transferência)
- TCO (Transferência seguida de Complexação em fase Orgânica)
- TCI (Transferência por Complexação Interfacial)
- TDI (Transferência por Dissociação Interfacial)

Sendo que o mecanismo de transferência iónica pelo qual a reacção decorre é variável e depende de factores como a razão entre a concentração do ião e do ligando e as respectivas constantes de complexação. A figura 1.9 ilustra os mecanismos pelos quais as reacções de transferência iónica assistida por ligandos podem ocorrer, onde é possível identificar a espécie a transferir através da interface, numa tonalidade amarela, enquanto que o ligando é representado esquematicamente por um C e o complexo por um C que envolve a espécie.

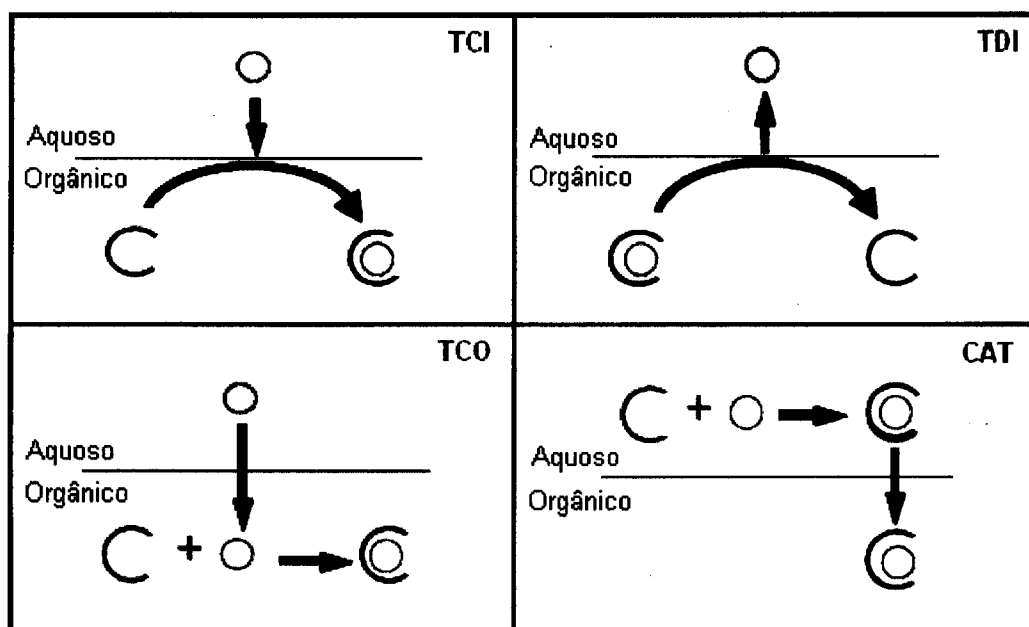


Figura 1.9. Representação esquemática dos quatro tipos de mecanismos de reacção de transferência iónica assistida por ligandos. Adaptado da referência 64.

Nas reacções de transferência iónica directa, cineticamente bastante rápidas e electroquimicamente reversíveis, cujo transporte de massa do iões é limitado por difusão, assume-se que as concentrações superficiais em ambos os lados da interface obedecem à equação de Nernst, que pode ser descrita por:

$$\Delta_{\beta}^{\alpha} \Phi = \Delta_{\beta}^{\alpha} \Phi_i^{\circ} + \frac{RT}{z_i F} \ln \left(\frac{a_i^{\beta}}{a_i^{\alpha}} \right) \quad (1.12)$$

em que, α e β representam as fases aquosa e orgânica e a a actividade da espécie i em cada uma das fases.

Neste trabalho aplicar-se-ão apenas duas das metodologias indicadas. No desenvolvimento do biossensor utilizar-se-á a transferência iónica do protão assistida pelo PDT. Para a detecção de outras espécies, assunto a abordar no capítulo 3, utilizar-se-á como metodologia a transferência iónica directa através das micro-ITIES.

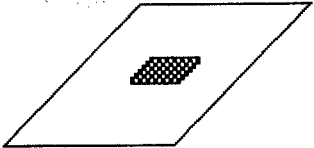
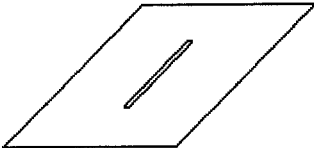
1.3 Procedimento Experimental

De seguida apresenta-se uma tabela com o resumo de todos os materiais e reagentes utilizados na realização das diferentes determinações experimentais.

Tabela 1.2. Tabela de materiais e reagentes utilizados.

Material	Reagentes
- Filme poliéster Millinex	- Água ultra pura Millipore
- Gobelés	- Acetona Pronalab
- Agitador magnético Magnestir, Lab-line Instrum. Inc.	- Fios de prata, Aldrich
- Placa aquecimento MR3001 Heidolph	- Cloreto de sódio (NaCl), 99,5%, Merck
- Fonte de tensão $\pm 15V$, CFUP	- Tetrafenilborato de sódio (NaTPB), 99,5%, Merck
- Balança AG245, Mettler Toledo	- Brometo de tetraoctilamónio (TOABr), 98%, Fluka
- Saco de luvas	- Éter o-nitrofeniloctílico (o-NPOE), Fluka
- Tubo teflon	- 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina (PDT), Sigma
- Tubo de vidro	- Agár Bacto, DIFCO Lab.
- Microespátula	- 1,3:2,4-dibenzilideno sorbitol (DBS), Milliken
- Secador ar quente	- D(+)-glucose monohidratada, 99,5%, Fluka
- Potenciostato SI 1287 – Solartron Instrum.	- Glucose oxidase, 23 U de <i>aspergillus niger</i> , Fluka
- Potenciostato EG&G Model 273	- Parafilme M [®]
- pH Meter Crison-MicropH 2000	- Silicone Bricobi
- Banho termostatzado type SU5 – Grant Instrum.	- Solução tampão, Crison, pH=4,01
	- Solução tampão, Crison, pH=7,02

1.3.1. Preparação dos filmes de poliéster

Na preparação dos filmes de poliéster microperfurados, realizada nos laboratórios da EPFL em Lausane, utilizou-se a técnica de perfuração e fotoablação laser de um filme de poliéster com 12 μm de espessura. A fotoablação consiste, basicamente, num impulso localizado do laser sobre o polímero provocando a ejeção do poliéster correspondente à área do microorifício (0.0052 mm^2).	 Figura 1.10. Membrana de 66 microorifícios de 10 μm de diâmetro
Na preparação dos filmes microperfurados com microlinhas, o procedimento é idêntico ao descrito anteriormente. A diferença reside no deslocamento linear dos impulsos sob o filme, resultando numa microlinha. Esta possui uma área de 0.13 mm^2 (130 μm de largura por 1000 μm de comprimento).	 Figura 1.11. Membrana com microlinha de 130/1000 μm

1.3.2. Preparação dos eléctrodos de Ag/AgCl

Após se soldar um fio de prata a um fio de cobre revestido, une-se este último pela extremidade a uma resistência de 85 $\text{k}\Omega$ que se encontra ligada ao pólo positivo da fonte. Mergulha-se o fio de prata num gobelé contendo uma solução concentrada de cloreto de sódio à qual se adicionam umas gotas de ácido clorídrico concentrado, para evitar a formação de hidróxidos. A solução é colocada sob agitação contínua, e coloca-se um outro fio de prata ligado ao pólo negativo da fonte. Aplica-se então uma diferença de potencial de 10 V durante algumas horas. Quando o fio de prata se encontrar revestido por uma camada cinzenta, considera-se que o eléctrodo de Ag/AgCl está pronto a ser utilizado.

1.3.3. Síntese do tetrafenilborato de tetraoctilamônio (TOATPB)

O TOATPB utilizado nas diferentes experiências electroquímicas foi sintetizado de acordo com o procedimento utilizado neste grupo de investigação, relatado por Pereira *et al*⁶⁸, de acordo com o descrito a seguir:

- Prepara-se uma solução de NaTPB em água/etanol 50% (v/v), sendo que a quantidade de NaTPB depende apenas da quantidade de TOATPB que se pretende prepara.
- Prepara-se uma outra solução de TOABr em água/etanol 50% (v/v).
- Misturam-se bem estas duas soluções, observando-se a precipitação do TOATPB.
- Deixa-se a solução precipitar durante 4 horas e filtra-se o precipitado usando vácuo.
- Purifica-se o TOATPB por cristalização com acetona, solubiliza-se bem todo o composto e remove-se a acetona por evaporação à temperatura ambiente com arejamento, formando-se os respectivos cristais de TOATPB.

1.3.4. Preparação dos géis

Gel orgânico

Transfere-se uma dada quantidade ($\cong 10$ ml) de o-NPOE para um gobelé, em atmosfera de azoto, pela utilização de um saco de luvas. Pesa-se a quantidade de o-NPOE e calculam-se as massas de DBS, PDT e TOATPB a pesar correspondentes, respectivamente, 1.8%, 5 e 10 mM. Após pesagem, estas são adicionadas à solução de o-NPOE e coloca-se o gobelé sobre uma placa de aquecimento a 150 °C. Agita-se a solução até que todos os compostos se dissolvam completamente e deixa-se arrefecer, formando-se o respectivo gel.

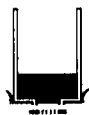
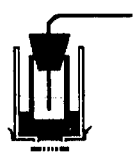
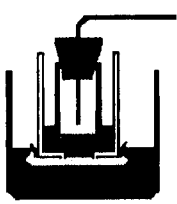
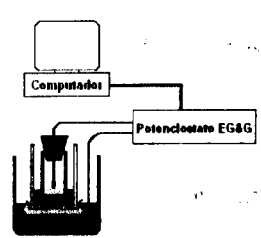
Gel orgânico de referência

Pesam-se 0.2 g de agár Bacto para um gobelé e adicionam-se 10 ml de solução aquosa de referência 10 mM NaCl e 10 mM NaTPB. Coloca-se o gobelé sobre uma placa de aquecimento a uma temperatura de 90 °C e agita-se até que o agár se encontre completamente dissolvido e deixa-se arrefecer.

1.3.5. Montagem do Sensor

De seguida descreve-se todo o procedimento de preparação do biossensor. Para uma melhor compreensão todo o processo encontra-se ilustrado pelas figuras 1.12 a 1.20.

- O tubo de teflon[®] é limpo utilizando, repetidamente, água Millipore e acetona Pronalab. Com a ajuda de uma espátula e papel absorvente, é seco e realiza-se nova passagem por água e acetona. Seca-se utilizando um secador de ar quente.	 Figura 1.12. Tubo de teflon.
- Após secagem, espalha-se uma camada de pasta de silicone branca Bricobi na extremidade do tubo, utilizando uma microespátula. Coloca-se então o filme de poliéster, previamente perfurando por fotoablação laser.	 Figura 1.13. Colocação do filme microperfurado.
- Uniformiza-se e nivela-se o contacto do filme com a camada de silicone e colocar-se o anel de teflon de forma a fixar definitivamente o filme. Deixa-se secar o tubo à temperatura ambiente para o dia seguinte.	 Figura 1.14. Colocação do anel de teflon de fixação.
- Veda-se uma das extremidades do tubo (depois de limpo com água e acetona) com Parafilm[®] e verifica-se se não existem pontos de ruptura de modo a que o gel liquidificado não consiga escapar.	 Figura 1.15. Colocação de Parafilm na extremidade.
- Após liquidificação do gel orgânico de referência a uma temperatura de cerca de 90 °C, coloca-se este no interior do tubo com a ajuda de uma pipeta de Pasteur. De imediato, aplica-se o eléctrodo de Ag/AgCl de tal modo que este fique o mais próximo possível na interface. Tapa-se o tubo com papel de alumínio e deixa-se repousar umas horas antes de utilizar.	 Figura 1.16. Colocação gel orgânico de referência.

- Deixa-se o gel orgânico liquidificar bem, a cerca de 150 °C, e coloca-se no tubo utilizando uma pipeta de Pasteur previamente aquecida. Este procedimento é bastante importante para que o gel atravesse os microorifícios, preenchendo-os completamente após secagem. Tapa-se e deixa-se a repousar.	 Figura 1.17. Colocação do gel orgânico.
- Envolve-se a parte superior do tubo de vidro com Parafilm® de forma a aumentar a espessura e assim entrar no tubo de teflon sob pressão. Pressiona-se a fase de referência observando-se o contacto das fases através do filme de poliéster.	 Figura 1.18. Montagem dos géis das fases orgânicas.
- Lava-se a superfície do filme com água Millipore e seca-se utilizando papel absorvente de forma a remover algum vestígio de gel orgânico. Prepara-se uma solução aquosa contendo 10 mM NaCl e a GOx 10 nM e o biossensor é imerso, tendo cuidado para que não existam bolhas de ar junto à interface.	 Figura 1.19. Imersão do sensor na fase aquosa
- Liga-se o eléctrodo da fase orgânica de referência ao contra-eléctrodo e à referência do potenciostato, ficando o eléctrodo da solução aquosa ligado ao eléctrodo de trabalho. Adicionam-se os diferentes volumes de solução aquosa de glucose, preparada previamente e mantida no frigorífico ao abrigo da luz, realizando-se finalmente as determinações amperométricas.	 Figura 1.20. Biossensor com os sistemas de detecção e amplificação.

A figura 1.21 representa esquematicamente a célula electroquímica utilizada na determinação amperométrica da glucose, acima descrita.

Célula electroquímica I

	10 mM NaTPB	10 mM TOATPB	10 mM NaCl	
	10 mM NaCl	5 mM PDT	10 nM GOx	
Ag/AgCl	agar 2%	DBS 1.8 %	x mM D(+)-glucose	AgCl/Ag'
		(o-NPOE)	(Aq.)	

Figura 1.21. Representação esquemática da célula electroquímica utilizada no biossensor. Utiliza-se uma velocidade de varrimento de 50mV.s^{-1} , excepto se especificado.

Realizam-se as determinações amperométricas, após montagem da célula electroquímica I, ligando os 2 eléctrodos ao potenciostato. Os voltamogramas cíclicos foram determinados numa janela de potencial de intervalo situado entre os -0.8 e 0 V, com uma velocidade de varrimento de 50mV.s^{-1} , excepto quando indicado. Todas as experiências, à excepção do estudo do efeito da temperatura, realizaram-se a uma temperatura ambiente de aproximadamente $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

1.3.6. Técnica: Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica voltamétrica que pode ser considerada como uma variação, mais elaborada, da voltametria linear. Embora possa ser aplicada com fins quantitativos, é mais utilizada como técnica qualitativa. Nesta técnica aplica-se uma rampa de potencial a um eléctrodo de trabalho, variando esta de um valor máximo e mínimo de potencial que correspondem ao início e término do varrimento, em cada um dos sentidos no potencial. Esta rampa apresenta a forma descrita na figura 1.22:

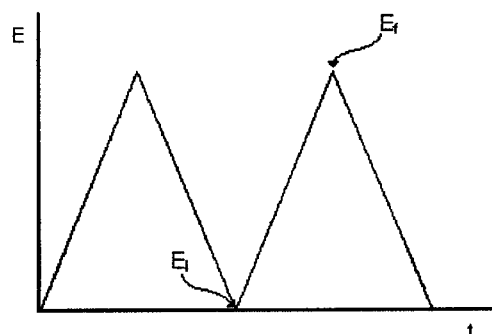


Figura 1.22. Relação potencial-tempo em voltametria cíclica⁶⁹.

Durante o varrimento do potencial, o potenciostato, para além de controlar o potencial do eléctrodo de trabalho (relativamente ao do eléctrodo de referência), mede a intensidade de corrente resultante dos fenómenos que ocorrem através da interface. A figura 1.23 apresenta um voltamograma típico de transferência iónica em interfaces líquido-líquido. A partir deste obtém-se os parâmetros mais importantes, como os valores da intensidade de corrente para a transferência iónica (I_{p+} e I_{p-}) e o potencial de pico (E_{p+} e E_{p-}). Esta intensidade de corrente sob a forma de pico surge quando os processos de difusão são predominantemente lineares. Para processos de difusão predominantemente não-lineares a intensidade de corrente apresenta a forma de patamares.

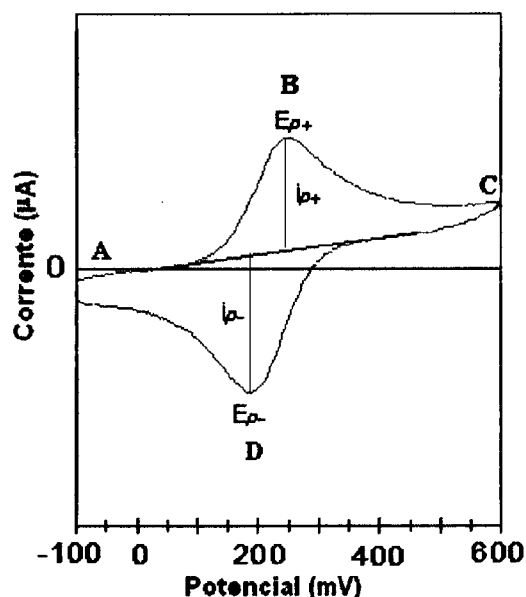


Figura 1.23. Voltamograma cíclico teórico para uma transferência iónica. (A) a espécie não se encontra transferida; (B) Transferência de um catião Aq-Org ou anião Org-Aq; (C) inversão do sentido do potencial; (D) Transferência de um anião Aq-Org ou catião Org-Aq;

É possível relacionar a intensidade de corrente de pico para reacções de transferência iónica directa de iões, reversíveis e controladas por difusão linear, através da equação de Randles-Sevcik:

$$I_p = 0,4463 z_i F A c_i^b \left(\frac{z_i F}{RT} \right)^{\frac{1}{2}} D_i^{\frac{1}{2}} \nu^{\frac{1}{2}} \quad (1.13)$$

em que I_p corresponde à corrente de pico em amperes, A a área interfacial em cm^2 , ν é a velocidade de varrimento em V.s^{-1} , c_i^b é a concentração do ião na solução em mol.cm^{-3} e D_i é o coeficiente de difusão do ião em $\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$.

No entanto para que esta relação seja válida é necessário que se satisfaçam as seguintes condições:

- Os potenciais de transferência sejam independentes da velocidade de varrimento;
- A diferença entre os potenciais de pico seja igual a $59/z$ mV, a 25 °C, em que z representa a carga da espécie iônica que se transfere através da interface;
- A relação entre a intensidade de corrente de pico e a raiz quadrada da velocidade de varrimento apresente uma relação linear;

Para o caso em que o voltamograma cíclico apresenta a forma de patamares, a intensidade de corrente relaciona-se com a transferência iônica através da relação definida pela equação 1.11.

1.4 Desenvolvimento do biossensor

Na última década existiu um interesse crescente em utilizar as micro-ITIES, também pela sua velocidade de transferência iónica, que se verificou ser bastante rápida⁶⁰, para a monitorização de reacções enzimáticas e, conseqüentemente, para a construção de biossensores amperométricos⁷⁰.

Aproveitando as vantagens das micro-ITIES gelificadas suportadas em microorifícios, juntamente com as características de selectividade e especificidade atribuídas pela utilização da GOx, torna-se possível determinar a concentração de glucose em solução. A utilização das ITIES na determinação da glucose pode parecer numa primeira análise uma tarefa impossível, dado que a molécula de glucose é uma espécie neutra e um sistema de detecção baseado nas ITIES baseia-se na transferência de espécies carregadas através da interfaces líquido-líquido. Todavia a utilização da GOx permite uma decomposição enzimática da glucose gerando, além de outros, ácido glucónico como produto da reacção. Torna-se então possível acompanhar a formação deste pela transferência assistida do protão através da interface gelificada água|NPOE, utilizando como ligando na fase orgânica o PDT, ocorrendo como resultado um sinal amperométrico, proporcional à quantidade de glucose, possível de ser acompanhado por voltametria cíclica. A figura 1.24 esquematiza o processo descrito, evidenciando a zona preferencial de adsorção da GOx.

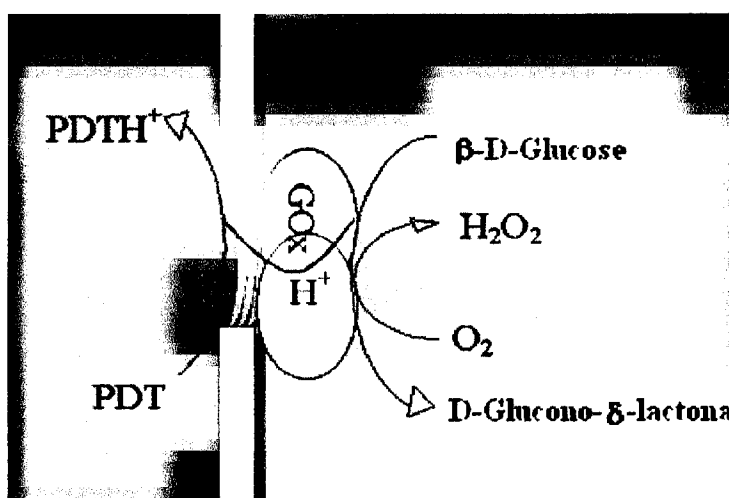


Figura 1.24. Representação esquemática do princípio de funcionamento do biossensor.

1.4.1. Detecção da D(+)-glucose

A utilização das ITIES como eléctrodo selectivo de iões (ESI) amperométrico⁷¹ tem-se vulgarizado pelas características já evidenciadas em pontos anteriores. Este processo, baseado na transferência de espécies iónicas, não permite a monitorização de espécies neutras, como a glucose, através da interface. Como referido anteriormente, na constituição de um biossensor, existente dois aspectos fundamentais para o seu funcionamento: o biocatalisador e o transdutor. A presença da GOx torna-se imprescindível para o funcionamento do biossensor. Também para se estabelecer a utilização das micro-ITIES como um transdutor da glucose a presença do PDT, como agente complexante, representa uma outra variável a dimensionar. Convém referir que a ausência de um destes factores, impede o funcionamento do biossensor. Trabalho realizado neste grupo de investigação⁷², relativamente a estes aspectos, demonstrou que, quando estão presentes a GOx e o PDT se verifica um aumento da intensidade de corrente, com um aumento da concentração da glucose, a potenciais mais positivos. Este aumento da intensidade de corrente corresponde à transferência assistida do H^+ pelo PDT da fase aquosa para a fase orgânica através da microinterface.

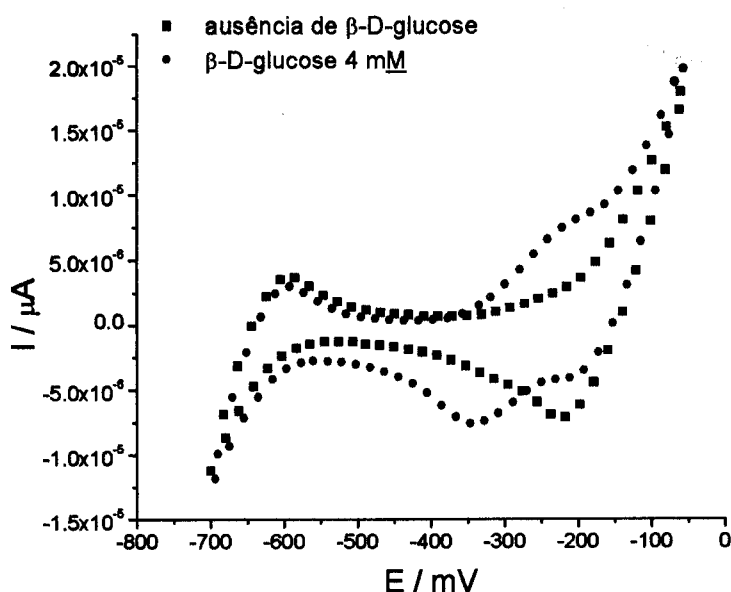


Figura 1.25. Voltamograma cíclico da determinação da glucose, descrito pela célula electroquímica I apresentada na figura 1.21.

Verifica-se que o pico formado a potenciais mais positivos, correspondente à transferência do protão da fase aquosa para o gel orgânico, confirmando a possibilidade

de utilização da voltametria cíclica no acompanhamento da reacção catalítica. Verifica-se também que a transferência iónica ocorre num intervalo de potencial entre -0.3 e -0.1 V, o que se torna uma grande vantagem, pois assim eliminam-se algumas interferências devidas à oxidação de espécies electroactivas a potenciais próximos de +0.7 V vs. Ag/AgCl⁷³, que ocorre em outros biossensores para a determinação da glucose que se baseiam na detecção amperométrica de um outro produto da reacção enzimática, o peróxido de hidrogénio. Esta temática das interferências encontra-se desenvolvida de uma forma mais extensiva no capítulo seguinte.

Subtraindo os valores da intensidade de corrente da linha de base aos valores de intensidade de corrente obtidos pela adição de D(+)-glucose voltamogramas, obtém-se os valores de intensidade de corrente correspondentes à adição de D(+)-glucose. Na figura 1.26, encontram-se representados os voltamogramas cíclicos, com correcção da linha de base, para diferentes concentrações de D(+)-glucose. Também é apresentada no canto inferior direito da figura a curva amperométrica que descreve a resposta amperométrica da célula electroquímica perante a transferência assistida do catião hidrogénio resultante da adição de β -glucose. O comportamento que a curva apresenta é característico das respostas amperométricas limitadas pela cinética de reacções enzimáticas.

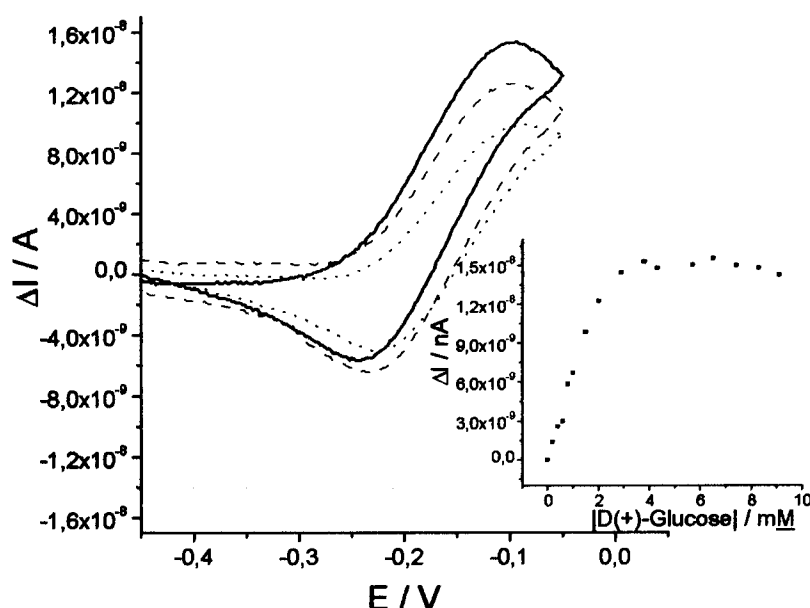


Figura 1.26. Voltamogramas cíclicos determinados na presença de 1.5 mM (.....), 2.4 mM (---) e 3.8 mM (—) de D(+)-glucose, com correcção da linha de base. No canto inferior direito encontra-se representada a respectiva curva de calibração.

Considerando que os processos de convecção e migração se encontram controlados, quer pela ausência de agitação nas medições quer pela existência de electrólito de suporte, sendo portanto o transporte de massa controlado por difusão, é possível concluir que o valor de intensidade de corrente obtido na determinação amperométrica se deve essencialmente ao transporte de H^+ através da microinterface.

A figura 1.27 apresenta a curva de calibração formada pela média de quatro determinações experimentais, com o respectivo desvio de padrão.

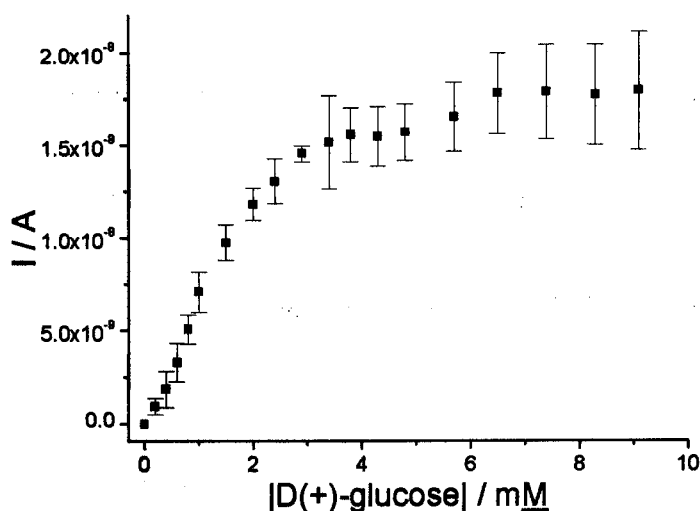


Figura 1.27. Curva de calibração para a determinação da glucose e desvio de padrão associado, obtida a partir de quatro determinações experimentais a um potencial de -0.010 V.

Analisando a curva facilmente se distinguem duas regiões: a de aumento linear com a concentração de glucose e a de comportamento aproximadamente constante. Este comportamento é característico dos eléctrodos enzimáticos, cujo modelo matemático simplificado se pode representar esquematicamente como na figura 1.28:

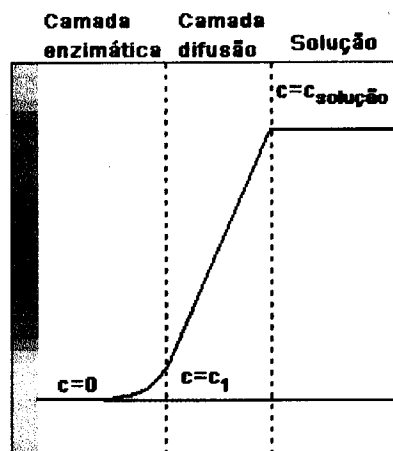


Figura 1.28. Modelo esquemático do comportamento de electrodos enzimáticos.

Este simples modelo permite explicar o comportamento da intensidade de corrente de electrodos enzimáticos com uma camada enzimática imobilizada na superfície. Este é válido para uma camada uniformemente distribuída pela superfície e para um excesso de substrato⁷⁴:

A partir da utilização das transformadas de Laplace e posterior derivação para as condições fronteira da segunda Lei de Fick da difusão, dada na pela equação 1.14:

$$\frac{\partial[C_0(x,t)]}{\partial t} = D_0 \frac{\partial^2[C_0(x,t)]}{\partial x^2} \quad (1.14)$$

obtém-se a seguinte expressão:

$$\left(\frac{dc}{dx}\right)_{x=0} = \frac{C}{\sqrt{\pi Dt}} \quad (1.15)$$

substituindo pela equação de Cottrell,

$$I = nFAC_0 \sqrt{\frac{D}{\pi t}} \quad (1.16)$$

obtém-se a expressão que permite exprimir o gradiente de difusão na superfície do electrodo em função da intensidade de corrente:

$$I = nFAD \left(\frac{dc}{dx} \right) \quad (1.17)$$

esta variação é descrita, para sistemas enzimáticos, pela equação de Michaelis-Menten:

$$\left(\frac{dc}{dx} \right) = v = \frac{k_3 [E] \times [S]}{K_M + [S]} \quad (1.18)$$

substituindo na equação anterior e considerando, como hipótese simplificativa, que $[S] \gg K_M$, obtém-se a equação para a corrente máxima para o processo:

$$I_{\max} = \frac{nFAdk_3 [E]}{2} \quad (1.19)$$

em que d é a espessura da camada enzimática. A partir das equações 1.17 a 1.19 obtém-se que:

$$I = \frac{2D}{d} \times \frac{I_{\max} \times [S]}{K_M + [S]} \quad (1.20)$$

Esta equação é análoga à equação de Michaelis-Menten:

$$I = \frac{I_{\max} \times [S]}{K_M + [S]} \quad (1.21)$$

Esta equação descreve o comportamento da resposta amperométrica em função dos parâmetros relativos ao processo enzimático (K , $I_{\max}$). Verifica-se que, na curva amperométrica apresentada, o valor da intensidade de corrente apresenta um comportamento linear, proporcional à concentração de D(+)-glucose entre 0.2 e 3 mM com uma sensibilidade de detecção de 7.9 nA.mol⁻¹.dm³. Um outro resultado interessante que se obtém relaciona-se com a repetibilidade da curva amperométrica, dada pelas barras do desvio de padrão. Verifica-se para a segunda região da curva, de concentrações de D(+)-glucose superiores, que o desvio de padrão associado às quatro determinações experimentais apresenta valores de aproximadamente 12%, enquanto que para a região linear, de menores concentrações de D(+)-glucose, apesar da quantidade de catiões hidrogénio que atravessam a interface ser bastante menor, os valores de

desvio padrão são em média inferiores a 5%. Estes resultados demonstram que este biossensor para a determinação de glucose deverá ser utilizado para a determinação de concentrações de D(+)-glucose entre 0.2 e 3 mM, não só pela linearidade da resposta amperométrica, mas também pelos menores valores de desvio padrão que este intervalo apresenta.

Para se avaliar o efeito que a espessura da membrana de poliéster introduz na resposta amperométrica, prepararam-se simultaneamente dois biossensores em que estes apenas diferiam entre si na espessura da membrana (12 e 23 μm). Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 1.29:

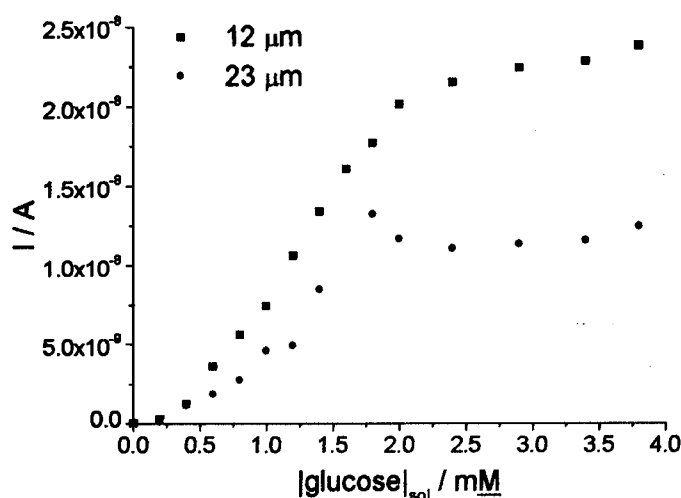


Figura 1.29. Representação das curvas de calibração para diferentes espessuras da membrana de poliéster.

Pela análise das curvas verifica-se que a resposta amperométrica para a transferência do H^+ através de membranas de poliéster de 12 μm de espessura apresenta simultaneamente maiores valores de intensidade de corrente, melhor linearidade e maior sensibilidade. Este efeito relaciona-se com a alteração das características de difusão no microorifício. A figura 1.30 é adaptada do trabalho de Lee⁴⁴, em que este relaciona o efeito da alteração da geometria e parâmetros físicos na caracterização do transporte de massa através do microorifício, com a evolução do potencial de meia onda. Conclui-se que para espessuras mais elevadas o regime de difusão das espécies alterna entre os regimes não-linear/linear/não-linear, descrito na equação 1.10, enquanto que para menores espessuras o comportamento através da interface é predominantemente não-linear semelhante ao que se passa nas interfaces descritas pela equação 1.11.

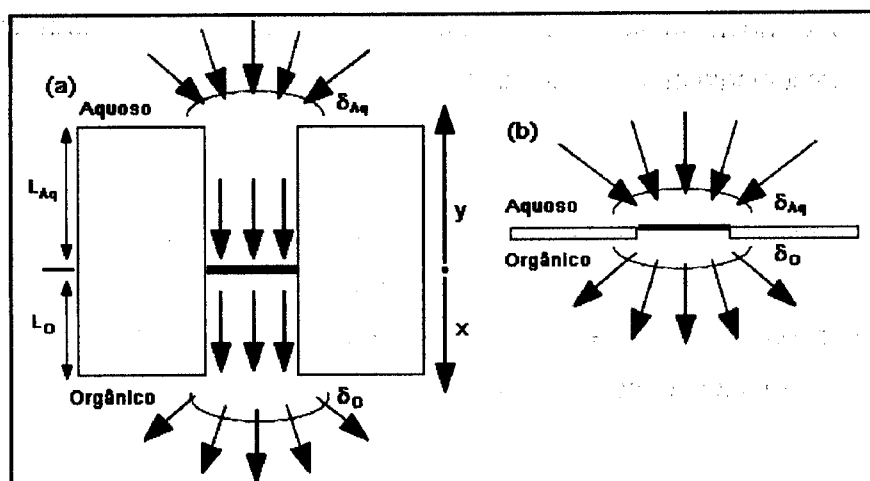


Figura 1.30. Representação esquemática do efeito da espessura do filme nas micro-ITIES suportadas em microorifícios: a) Interfaces de microdiscos rebaxados; b) Interfaces de microdiscos embutidos.

Osborne *et al*⁷⁵ estudaram a possibilidade de aplicação das interfaces formadas por microorifícios na detecção amperométrica do catião amónio através de transferência iónica assistida pelo éter de dibenzo-18-coroa-6 (DB18C6) para uma interface água|1,2-DCE e verificaram que quanto menor o tamanho do orifício, mais rapidamente a corrente do estado estacionário é atingida, tomando o valor mínimo de 5 s para um orifício de 11 μm de diâmetro.

Embora a possibilidade de aumentar o número e o tamanho dos microorifícios como forma de optimização destes sensores se encontrar bem caracterizada^{58,59,60}, verifica-se no entanto que os trabalhos já realizados mostram a existência de alguns problemas na reprodutibilidade do biossensor (ver figura 1.27), talvez pelo pequeno valor do sinal analítico ou por eventuais entupimentos dos próprios microorifícios, alterando de modo significativo a área da interface. Na sequência deste trabalho testou-se uma nova possibilidade, baseada na utilização de membranas perfuradas por microlinhas em detrimento das membranas de microorifícios, exemplificadas na figura 1.11.

A figura 1.31 apresenta a comparação entre as duas metodologias e facilmente se detectam dois aspectos que as diferenciam, de bastante relevo para o desempenho do biossensor: a existência de um aumento da intensidade da corrente (para as mesmas condições experimentais) e uma maior linearidade da própria resposta amperométrica. Este efeito parece estar relacionado não só com o aumento da área interfacial (0.0052

para 0.13 mm^2), mas sobretudo pelos diferentes processos de difusão na transferência das espécies que induz, muito embora exista um aumento considerável da área da interface esta metodologia mantém as características das microinterfaces.

A utilização das microlinhas para o desenvolvimento de biossensores baseados em membranas microperfuradas torna-se uma excelente possibilidade, infelizmente não foi possível reunir as condições técnicas e financeiras para se preparar uma montagem adequada à sua preparação, pelo que a aplicação desta metodologia torna-se uma possibilidade em trabalhos futuros.

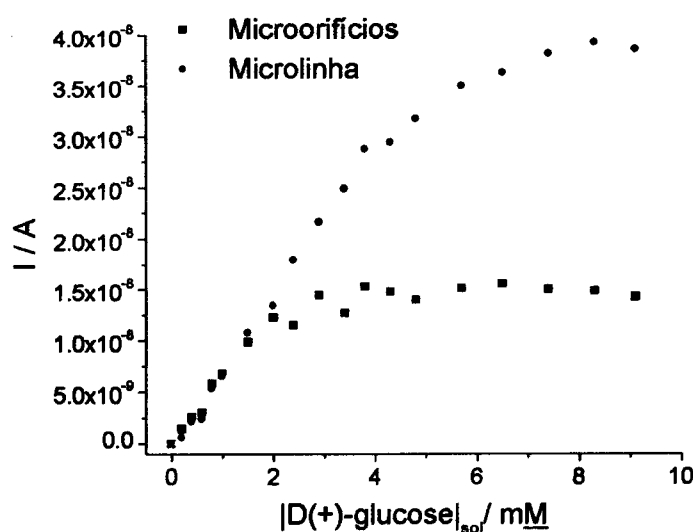


Figura 1.31. Representação de duas curvas de calibração baseadas em microorifícios e microlinhas.

1.4.2. Efeito da velocidade de varrimento

O estudo do efeito da velocidade de varrimento na determinação amperométrica permitiu verificar dois comportamentos diferentes para as intensidades de corrente capacitiva e de pico, como indicado na figura 1.32. A representação da intensidade de corrente capacitiva, determinada a um potencial do intervalo polarizável da interface, em função da velocidade de varrimento, permitiu verificar a existência de uma relação linear ($r = 0.997$) entre estas duas variáveis, evidenciando o efeito esperado pelo aumento da velocidade de varrimento. Este comportamento indica que para velocidades de varrimento elevadas obtém-se elevadas intensidades de corrente capacitiva,

influenciando de forma significativa a intensidade de corrente de pico, conduzindo a uma menor sensibilidade na detecção.

Na representação da intensidade de corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varrimento é possível verificar, como representado na figura 1.32 b), um comportamento praticamente constante da intensidade de corrente de pico para velocidades de varrimento até 50 mV.s^{-1} . Todavia para velocidades de varrimento superiores factores como coeficientes de difusão dos iões e velocidades de transferência, limitados pela pequena área da interface e da resistência do gel orgânico, influenciam os resultados experimentais de forma significativa. Estes são acrescidos da contribuição da intensidade capacitiva, que aumenta a sua influência com o aumento das velocidades de varrimento como observado anteriormente.

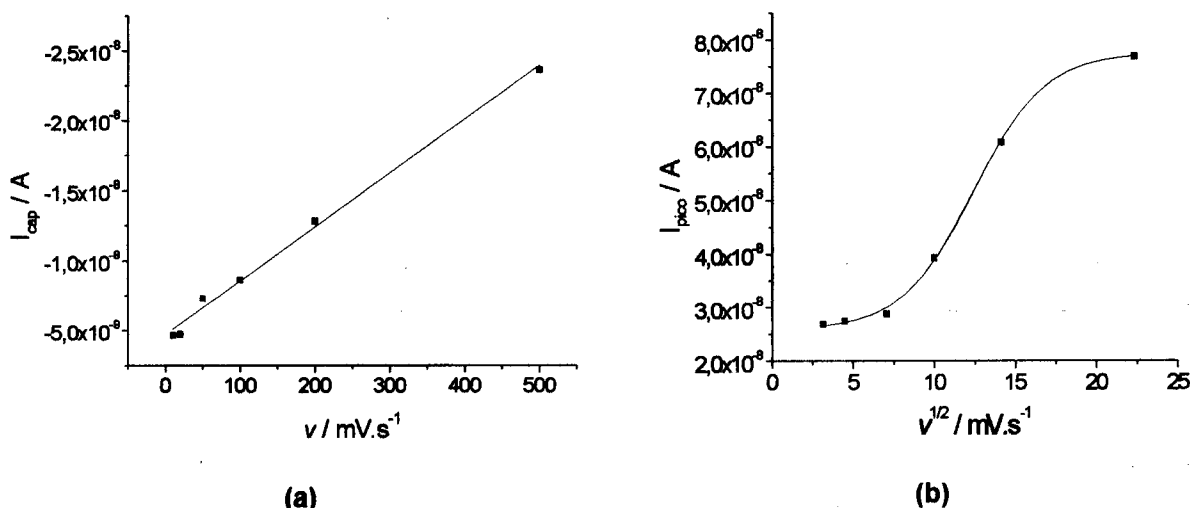


Figura 1.32. Representação do efeito da velocidade de varrimento nas determinações amperométricas: a) corrente capacitiva (determinada a $-0.5 \text{ V vs. Ag/AgCl}$); b) corrente de pico (determinada a $-0.18 \text{ V vs. Ag/AgCl}$). O estudo realizou-se a uma temperatura temostatizada de 35°C .

Estes resultados permitiram verificar a necessidade de utilizar velocidades de varrimento baixas (50 mV.s^{-1}) nas determinações, de forma a minimizar a contribuição da intensidade de corrente capacitiva e restantes factores que ocorrem a velocidades de varrimento superiores, permitindo a detecção de pequenas variações da intensidade de corrente de pico devida à transferência das espécies.

De acordo com a equação de Randles-Sevcik (ver ponto 1.3.5.), uma representação de $I_p = f(v^{1/2})$ deverá conduzir a uma relação linear, caso se tratem de transferências iónicas

reversíveis limitadas por difusão linear. Verifica-se, portanto, que o comportamento obtido se desvia da linearidade indicando a existência de processos de difusão predominantemente não-lineares. Este resultado foi também verificado por Lee⁴⁴ que obteve também um comportamento não linear para o processo de difusão das espécies nas micro-ITIES gelificadas de PVC-oNPOE suportadas em microorifícios, como esquematiza a figura 1.33:

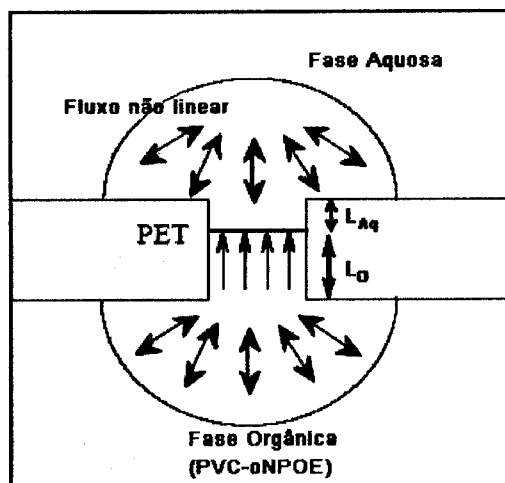


Figura 1.33. Representação esquemática do comportamento de difusão assimétrico característico das micro-ITIES gelificadas suportadas em microorifícios, em que L representam as distâncias entre as fases e o interior da interface. Adaptado da referência 44.

1.4.3. Detecção potenciométrica vs. Detecção amperométrica

A grande vantagem que o sistema amperométrico possui sobre o ESI potenciométrico, reside na possibilidade de no primeiro ser possível regular a selectividade, pela alteração do potencial de polarização, ou da janela de potencial⁴⁵. Existem, no entanto, outras propriedades que favorecem a utilização deste biossensor amperométrico, como a maior rapidez, sensibilidade²¹ e linearidade da resposta amperométrica do biossensor. Para se avaliar correctamente qual o melhor sensor para a detecção do catião hidrogénio, aplicaram-se as duas metodologias nas determinações, sendo que as determinações amperométricas foram realizadas após as determinações potenciométricas, apenas desfasadas de um pequeno espaço de tempo necessário para retirar o eléctrodo de vidro da solução aquosa, de modo a evitar possíveis interferências nas determinações. A figura 1.34 apresenta duas curvas amperométricas correspondentes às diferentes metodologias de detecção aplicadas.

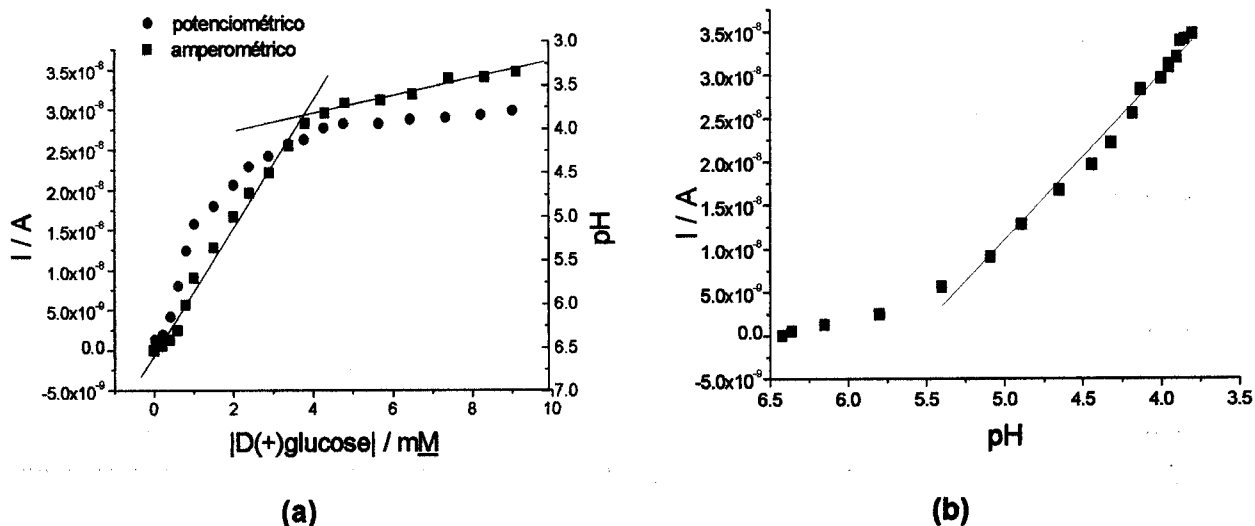


Figura 1.34. Comparação entre a resposta potenciométrica e a resposta amperométrica: a) Gráfico comparativo; b) Relação entre o pH e a intensidade de corrente. As determinações foram realizadas a um potencial de -0.030V .

Como se pode observar pelo gráfico a), a intensidade de corrente de estado estacionário, possui uma região linear, observada anteriormente, para concentrações inferiores a 3.5 mM . Este comportamento não é acompanhado pela determinação potenciométrica que apresenta uma curvatura dos valores de corrente, assim como saturação mais precoce deste intervalo. Para concentrações de glucose superiores a 3.5 mM obtém-se uma região limitante em ambos os sensores, demonstrando que a partir de determinadas concentrações de glucose, as limitações que os afectam são comuns.

Comparando as respostas relativamente ao valor pH, observa-se que a linearidade do sinal amperométrico se situa no intervalo entre 5.5 e 3.7, impossibilitando qualquer determinação fora deste. O valor superior prende-se com a sensibilidade da detecção, todavia o valor inferior, embora sofra influências da transferência do ligando parece estar mais relacionado com a transferência do ácido glucónico. Assim, determinou-se experimentalmente este valor, através de titulação de uma solução de ácido glucónico contendo $\text{LiCl } 100 \text{ mM}$ de forma a reproduzir as condições experimentais. Obteve-se, nestas condições e à temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ \text{C}$), um valor de pK_a para o ácido glucónico de 3.60. Este valor é próximo do pK_a termodinâmico referido na literatura (3.86)⁷⁶.

1.4.4. Efeito da temperatura

É do conhecimento comum a temperatura introduz diferenças significativas na resposta do biossensor, mas que também pode conduzir a fenómenos como a inactividade da enzima ou até mesmo a uma total desnaturação desta, de forma irreversível, como reportam Georganopoulou *et al*¹⁵.

Relativamente à resposta amperométrica deste biossensor para determinação da glucose esta apresenta a forma característica dos processos controlados pela cinética enzimática, como se pode constatar no ponto 1.4.1., sendo descrita pela equação de Michaelis-Menten. Esta relação entre a velocidade da reacção e temperatura pode ser descrita segundo a equação de Arrhenius:

$$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (1.22)$$

em que k é a constante de velocidade da reacção, A o factor de Arrhenius, E_a a energia de activação, R a constante dos gases e T a temperatura⁷⁷.

Verifica-se que a velocidade da reacção deverá aumentar com o aumento da temperatura. Todavia, as reacções que conduzem à perda de actividade catalítica também se regem pelas mesmas leis⁷⁸. Assim um aumento na temperatura deverá aumentar também a velocidade de desnaturação da enzima com a perda das estruturas secundária (hélice α e folha β) e terciária. Desta forma, o efeito da temperatura nas reacções catalíticas pode ser representado esquematicamente como na figura 1.35, em que a curva A representa o aumento da velocidade da reacção química com a temperatura, a curva B a diminuição da proporção de enzima activa, devido à desnaturação e a curva C representa a resultante dos dois comportamentos anteriores, correspondendo assim à curva característica do comportamento de uma enzima com a temperatura.

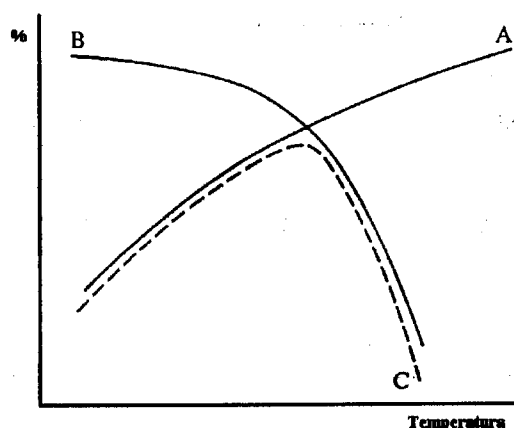


Figura 1.35. Efeito da temperatura nas reacções catalíticas. A) Aumento da velocidade da reacção química com a temperatura; B) Diminuição da actividade da enzima com a temperatura devida à desnaturação; C) Estes dois processos resultam na curva característica da temperatura de uma enzima¹⁹;

Torna-se pois, importante estimar o valor de K_M para melhor se avaliar o comportamento do processo enzimático, mas também os efeitos que a temperatura introduz. Devido ao erro associado às curvas de calibração amperométricas, a constante foi determinada pela aplicação da representação electroquímica da variante da equação de Michaelis-Menten, a equação de Hill (1.9). Os valores de I_{max} e K_M obtiveram-se através de um ajuste não-linear, em que o valor de α foi fixado para um valor de 1, que corresponde a um comportamento ideal. Esta simplificação não introduziu erros significativos, dado que se testou uma iteração oposta, em que o valor de I_{max} foi fixo, mas que os desvios ao factor de correcção não diferiram, significativamente, da unidade.

A tabela 1.3 resume os valores dos parâmetros cinéticos obtidos aplicando a equação de Hill a três curvas de calibração diferentes. Os valores obtidos para a K_M são ligeiramente inferiores dos valores obtidos para a enzima livre em solução (6.2 mM)⁷⁹. A literatura refere também valores para outros tipos de imobilização, por exemplo, Gregg *et al*⁸⁰ encontraram um valor de $K_M = 7.3 \text{ mM}$ para géis redox "crosslinked" com a GOx, enquanto que Sugawara *et al*⁸¹ obtiveram um valor de $K_M = 9.6 \text{ mM}$ em eléctrodos de platina revestidos por um filme de quitina/GOx, por sua vez Lowry *et al*⁸² indicaram um valor de $K_M = 29 \text{ mM}$ também em eléctrodos de platina mas revestidos por um filme altamente ordenado de poli(fenilenodiamina) (PFT), no entanto todos estes valores situam-se na mesma ordem de grandeza dos valores obtidos quando a GOx se encontra imobilizada em gel ($\leq 10 \text{ mM}$), como refere Pierce¹⁸. Verifica-se que as características da camada adsorbida e estabilização da enzima, devidas ao processo de imobilização da

enzima, influenciam de forma significativa o valor de K_M , sendo que valores superiores da constante indicam um maior ordenamento da enzima na superfície do eléctrodo. Gouda *et al*⁸² verificaram que a estabilização da GOx pela lisosima permitiu um aumento do valor de K_M de 7.6 para 36.4 mM. Embora este ordenamento introduza uma maior reprodutibilidade nas determinações há que analisar as consequências que se introduzem na determinação da actividade enzimática.

Tabela 1.3. Determinação dos valores de I_{max} e K_M , obtidos por ajuste não-linear da equação de Hill.

Experiências	I_{max} / nA	K_M / mM
1	22.6 ± 1.6	2.1 ± 0.4
2	23.0 ± 1.6	2.1 ± 0.4
3	18.8 ± 1.1	1.5 ± 0.3

Pierce *et al*¹⁸ utilizaram a técnica de SECM para a determinação da cinética aparente da catálise enzimática da glucose oxidase imobilizada em alguns substratos, na presença de vários mediadores, em concentrações elevadas de D(+)-glucose. Eles derivaram a equação da velocidade para a catálise da glucose oxidase, de acordo com o mecanismo de “ping-pong” actualmente aceite, no qual o oxigénio natural é o oxidante de dois electrões. Calcularam um valor de 0.15 s^{-1} para a constante de velocidade da reacção, que designaram como termo de eficiência catalítica, k_{cat} . Este termo é intrínseco de cada enzima e quantifica a eficiência com que a enzima catalisa toda a reacção, relacionando-se assim, com a concentração total de enzima presente em solução e com o valor da corrente máxima da curva amperométrica, ou seja, de acordo com o definido na equação 1.19.

Para se avaliar o efeito da temperatura e da cinética no desempenho do biossensor, realizaram-se várias curvas de calibração a diferentes temperaturas, no intervalo entre 10 e 40 °C. Os resultados encontram-se sistematizados na representação gráfica da figura 1.36 e verifica-se que um aumento da temperatura não introduz qualquer alteração na resposta amperométrica para além do esperado aumento de corrente relacionado com o aumento da cinética da reacção.

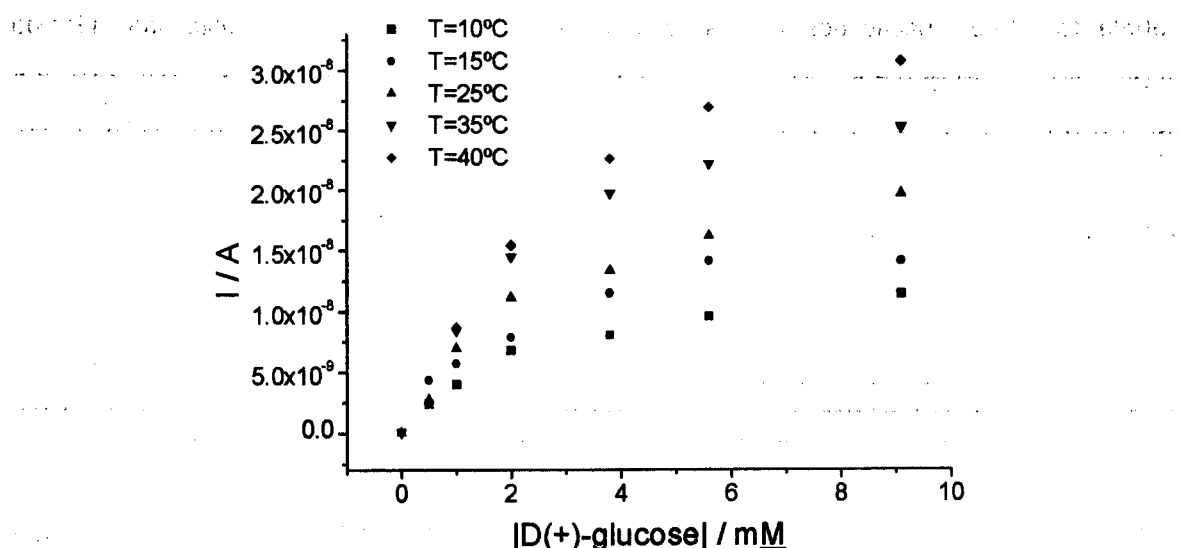


Figura 1.36. Representação das curvas amperométricas determinadas a diferentes temperaturas.

Na sequência do procedimento realizado acima, calcularam-se os valores de $I_{\max}$, K_M , para as diferentes temperaturas, sistematizados na tabela 1.4. A partir da equação para a $I_{\max}$ (1.19) foi possível calcular a constante de velocidade, k_3 , considerando que a concentração da enzima na superfície dos microorifícios se deve a uma única camada. Obtém-se assim que:

$$I_{\max} = \frac{nFA dk_3}{2} \left(\frac{n}{V} \right) \quad (1.23)$$

em que n é o número de moles e V o volume da camada enzimática. Considerando que V é dado por $V = Axd$, obtém-se por simplificação a expressão utilizada para o cálculo de k_3 :

$$k_3 = \frac{I_{\max}}{Fn} \quad (1.24)$$

Segundo o descrito por Weibel e Bright⁸³, para a molécula de GOx o empacotamento superficial é de aproximadamente 10 nm^2 . A partir deste valor e do valor da área dos microorifícios (0.0052 mm^2) é possível determinar o número de moles de GOx na camada superficial ($8.635 \times 10^{-13} \text{ mol}$). Os valores de k_3 para diferentes temperaturas encontram-se esquematizados na tabela 1.4.

Tabela 1.4. Determinação dos valores de $I_{\max}$, K_M e k_3 , obtidos por um ajuste não-linear da equação de Hill e da expressão 1.24, para diferentes temperaturas.

Temperatura / °C	$I_{\max}$ / nA	K_M^{app} / mM	k_3 / s ⁻¹
10	14.1 ± 0.8	2.5 ± 0.4	0.169
15	17.9 ± 1.4	2.1 ± 0.5	0.215
25	25.3 ± 2.0	3.0 ± 0.6	0.304
35	32.6 ± 1.0	2.6 ± 0.2	0.391
40	45.9 ± 4.4	4.2 ± 0.9	0.551

Analizando a tabela é possível observar dois comportamentos distintos: uma proporcionalidade entre o aumento da temperatura e a corrente máxima, produzindo como consequência uma proporcionalidade com a constante de velocidade e uma alteração aleatória dos valores da constante de Michaelis-Menten. Este último resultado vem de encontro ao descrito acima e portanto é possível concluir que esta constante deverá estar apenas relacionada com os aspectos de imobilização da enzima.

Relativamente aos valores obtidos para a constante de velocidade da reacção, k_3 , verifica-se que estes são da mesma ordem de grandeza dos obtidos para a eficiência catalítica por Pierce *et al* ($k_{\text{cat}} = 0.15 \text{ s}^{-1}$)¹⁸. Assim de acordo com o descrito verifica-se que este biossensor apresenta valores baixos para a constante de Michaelis-Menten relacionados com a imobilização e estabilidade da enzima, mas apresenta valores para a constante de velocidade próximos dos definidos na literatura para um sistema idêntico.

Na figura 1.37, apresenta-se uma relação de proporcionalidade entre a intensidade de corrente máxima e a temperatura. Embora não se encontre na literatura alguma referência a esta relação, os valores experimentais quantificam claramente ($r=1.000$) a relação de proporcionalidade que existe entre a temperatura e a corrente máxima, para o intervalo de temperaturas de maior actividade da enzima. Esta relação é de extrema importância para permitir a operacionalidade do biossensor num amplo intervalo de temperaturas.

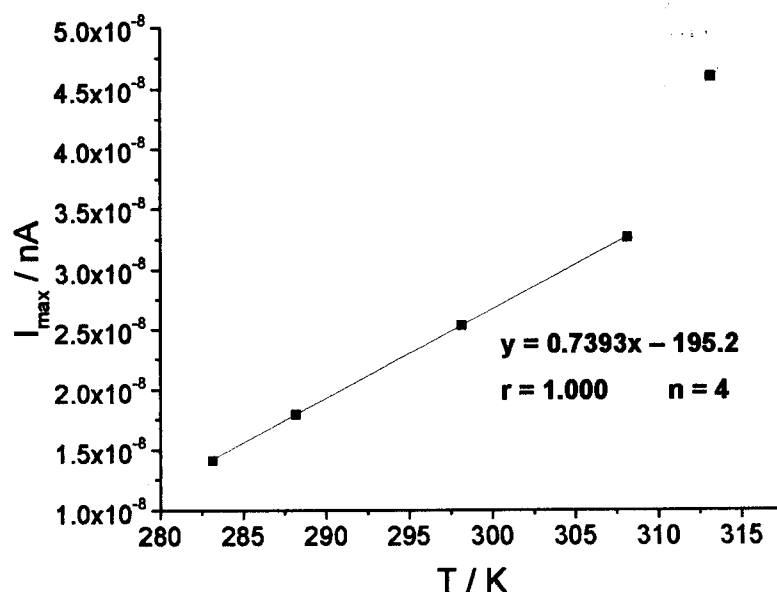


Figura 1.37. Representação da relação linear entre a temperatura e corrente máxima.

Para temperaturas mais elevadas, próximas dos valores de desnaturação da enzima, surgem outros factores que, embora permitam a detecção, provocam desvios à linearidade verificada.

Como indica a figura 1.35, um factor que se relaciona com a temperatura é o aumento da velocidade da reacção química, cuja relação com a temperatura é dada pela equação de Arrhenius (1.18). Logaritmicando esta equação é possível representar o logaritmo da velocidade da reacção em função do inverso da temperatura, como representado na figura 1.38, em que se utiliza o factor de eficiência catalítica como factor de relação da velocidade de reacção.

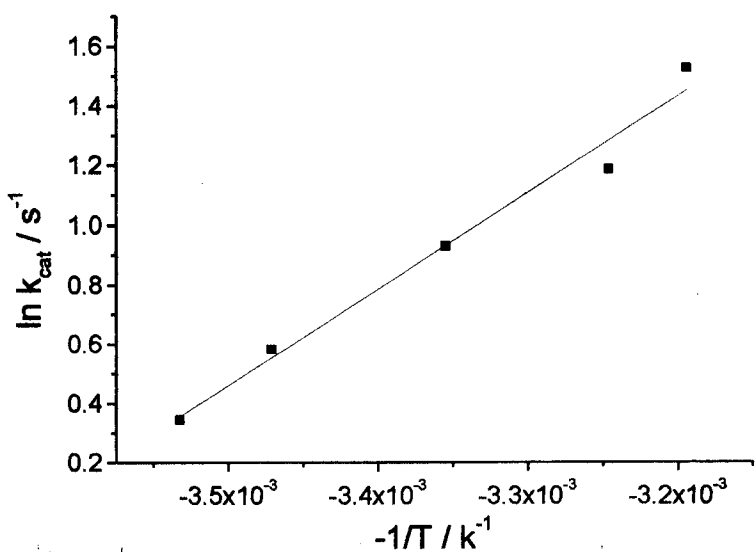


Figura 1.38. Representação da forma linear da equação de Arrhenius ao sistema em estudo.

Obtém-se, por regressão linear da equação de Arrhenius os valores representados na tabela seguinte:

Tabela 1.5. Valores dos parâmetros de Arrhenius.

Declive	Ordenada origem	r	A / s ⁻¹	E _a / kcal.mol ⁻¹
3.23x10 ³	11.76	0.9906	1.55x10 ⁴	6.42

Obtém-se um valor de $1.55 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ para o factor pré-exponencial (A) que representa a frequência das colisões entre as moléculas ocorrem e um valor de $6.42 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para a energia de activação (E_a). Comparativamente, obtiveram valores da E_a num estudo da estabilização térmica da glucose oxidase (*A. niger*) utilizando aditivos, de 72.9, 76.1 e 88.3 kcal.mol^{-1} para a lisozima, 0.2 M K_2SO_4 e 1 M NaCl , respectivamente⁸². Um outro trabalho de Eremin *et al*⁸⁴ apresenta valores da E_a de 48.0, 66.9 e 79.1 kcal.mol^{-1} para a GOx (*A. niger*) a pH=5 (40-75 °C), GOx (*A. niger*) altamente purificada (62 °C) e GOx (*P. adametzii*) entre 50-70 °C, respectivamente. Verifica-se que aspectos como a presença de aditivos, valores de pH, temperatura e a origem da enzima alteram significativamente os valores da energia de activação.

1.5 Conclusão

Os resultados experimentais indicam a possibilidade de determinar, amperometricamente, a concentração de D(+)-glucose numa solução aquosa, através do acompanhamento da reacção de transferência iónica, assistida pelo PDT, do catião hidrogénio resultante da decomposição enzimática da D(+)-glucose pela *glucose oxidase*.

Pela combinação de um gel orgânico de DBS/o-NPOE com o ligando PDT desenvolveu-se um biossensor baseado numa micro-ITIES gelificada, suportada em microorifícios realizados em membranas de poliéster, por fotoablação laser. Pela combinação destes elementos é possível acompanhar a reacção de decomposição enzimática da D(+)-glucose, obtendo-se uma curva amperométrica com o comportamento característico dos eléctrodos enzima, a qual apresenta um intervalo de detecção linear entre 0.2 e 3.5 mM, com uma sensibilidade de 7.9 nA.mol⁻¹.

Conclui-se que a resposta do biossensor é favorecida pela utilização de menores espessuras de membrana de poliéster (12µm), pela utilização de microlinhas em detrimento dos microorifícios e pela utilização de velocidades de varrimento baixas na detecção, pois tal como verificado por Lee⁴⁴, estas microinterfaces gelificadas apresentam processos de difusão das espécies não-lineares.

Verifica-se uma melhor aproximação na utilização da detecção amperométrica em detrimento da detecção potenciométrica, não só pela possibilidade de no sistema amperométrico ser possível regular a selectividade pela alteração da janela de potencial, mas, como evidenciam os resultados experimentais, pelo maior intervalo de linearidade na detecção entre 0.2 a 3.5 mM de D(+)-glucose.

Relativamente aos parâmetros enzimáticos obteve-se um valor de K_M de 2.1 mM, inferior ao valor da enzima livre em solução e ao obtido por outros autores como descrito no ponto 1.4.3. Este facto pode dever-se ao processo de imobilização e estabilidade da enzima. Para a I_{max} obteve-se um valor de aproximadamente 25.3 nA, a partir do qual se obteve um valor de 0.304 s⁻¹ para a constante de velocidade (k_3) a 25°C.

O efeito da temperatura é um parâmetro que influencia significativamente os parâmetros cinéticos associados às reacções enzimáticas. O estudo realizado permitiu obter uma relação linear entre a $I_{\max}$ e a temperatura. Esta linearidade possibilita uma maior operacionalidade do biossensor no intervalo de temperaturas entre 10 e 35 °C.

Este intervalo de temperaturas introduz por consequência um aumento da cinética da reacção que neste caso é descrito segundo a equação de Arrhenius. Obtiveram-se assim os valores de 6.42 kcal.mol⁻¹ e 1.55x10⁴ s⁻¹ para a energia de activação e factor de Arrhenius, respectivamente.

2

Caracterização do biossensor

Neste capítulo descrevem-se os estudos dos parâmetros que afectam o funcionamento do biossensor, nomeadamente, a presença do ligando e da enzima e a interacção entre estes. Também são estudados os parâmetros que afectam a resposta amperométrica, como o pH e presença de interferentes. Todos estes efeitos serão avaliados utilizando técnicas electroquímicas, nomeadamente, a voltametria cíclica e a espectroscopia de impedância electroquímica.

2.1 INTRODUÇÃO	55
2.1.1. A ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELECTROQUÍMICA NO ESTUDO DAS ITIES	55
2.1.2. INTERFERÊNCIAS	59
2.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	63
2.2.1. PREPARAÇÃO DA CÉLULA ELECTROQUÍMICA DE 4 ELÉCTRODOS.....	63
2.2.2. TÉCNICA: ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELECTROQUÍMICA.....	65
2.2.3. INTERFERÊNCIAS	65
2.3. CARACTERIZAÇÃO.....	67
2.3.1. TRANSFERÊNCIA ASSISTIDA DO H^+	67
2.3.2. INTERFERÊNCIAS	73
2.4 CONCLUSÃO	79

2.1 Introdução

Neste capítulo é realizada a caracterização de um biossensor amperométrico para a determinação de glucose baseado na combinação de uma membrana de poliéster microperfurada com uma microinterface água|o-NPOE gelificada.

2.1.1. A Espectroscopia de Impedância Electroquímica no estudo das ITIES

A Espectroscopia de Impedância Electroquímica (EIE) é uma técnica poderosa na caracterização de sistemas electroquímicos, bastante utilizada na investigação de reacções de transferência de espécies através de membranas lipídicas⁸⁵, nos estudos de interfaces de semicondutores⁸⁶, de transferência iónica em interfaces água|1,2-DCE⁸⁷, na caracterização da natureza e propriedades de filmes óxido⁸⁸ ou em biossensores para a determinação de glucose baseados em células eucarióticas⁸⁹. Um artigo de revisão recente⁹⁰, descreve os avanços que continuam a surgir nas aplicações da espectroscopia de impedância, não só na caracterização da estrutura e funcionalidade de vários tipos de biossensores, tais como, imunossensores, sensores de ADN e biossensores biocatalíticos baseados em enzimas, mas também no acompanhamento da construção de estruturas biológicas em suportes condutores multicamadas, na observação da afinidade das interacções de biomoléculas e na monitorização de reacções biocatalíticas.

Beattie *et al*⁹¹ utilizaram também a técnica de impedância ac no estudo da cinética de reacções de transferência iónica assistida por ligandos, suportadas em micropipetas ou em microorifícios. Samec e colaboradores⁴¹ utilizaram também a EIE no estudo da capacidade da dupla camada nas ITIES.

A aplicação da EIE no estudo da capacidade diferencial da dupla camada, relaciona-se com a possibilidade de o comportamento das ITIES relativamente a uma perturbação sinusoidal poder ser descrita por um circuito eléctrico equivalente. Na figura 2.1, encontra-se a representação do circuito equivalente mais utilizado no ajuste dos resultados experimentais de reacções de transferência de carga, o circuito de Randles, em que C_d é a capacidade da interface, Z_f a impedância faradaica e R_s a resistência da solução entre as pontas dos capilares de Luggin.

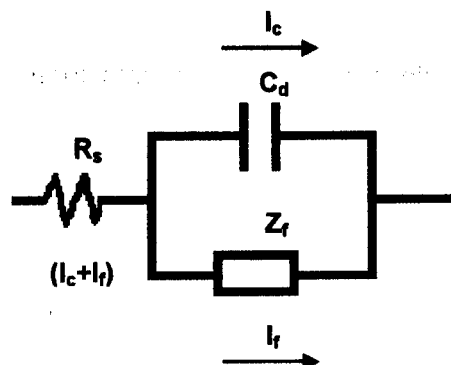


Figura 2.1. Circuito equivalente representativo das ITIES, denominado de circuito de Randles.

Os elementos Z_f e C_d são introduzidos em paralelo porque a corrente total através da interface é a soma de uma parcela faradaica, I_f , devida à transferência de iões e de uma parcela capacitiva, relativa ao processo de carga da dupla camada. Para sistemas em que as reacções de transferência podem ser consideradas relativamente rápidas, a impedância faradaica transforma-se na impedância de Warburg Z_w , particularmente para baixos valores de frequência.

A caracterização de um sistema electroquímico através da EIE pressupõe, portanto, a interpretação dos resultados por meios de modelos adequados. O modelo descrito por um circuito equivalente é então ajustado aos resultados experimentais para se que possa prever o comportamento do sistema em várias condições. Um circuito eléctrico equivalente, denominado normalmente por apenas circuito equivalente, não é mais que um circuito constituído por vários componentes eléctricos, nomeadamente, resistências, condensadores, indutores e por outros elementos como o elemento de fase constante (Q) e a impedância de Warburg que simulam o comportamento da interface. A combinação destes elementos em série ou em paralelo entre si dá origem aos referidos circuitos equivalentes aos quais se atribui um determinado significado físico. Teoricamente, é possível representar qualquer sistema em que apenas ocorram processos químicos utilizando resistências e capacitâncias. Sendo que para outros sistemas é necessária a introdução da componente da indutância na sua representação.

O princípio da EIE, ou impedância electroquímica como é por vezes conhecida, baseia-se na aplicação de uma perturbação sinusoidal de pequena amplitude e na determinação da resposta do sistema a essa perturbação, quando este se encontra em estado estacionário.

Se for sobreposta uma onda sinusoidal de baixa amplitude $\Delta E \text{ sen}(\omega t)$, a uma dada frequência angular ω , ao potencial de polarização dc E_0 , deverá ocorrer como resposta uma onda sinusoidal $\Delta I \text{ sen}(\omega t + \phi)$, que pode ser relacionada com o potencial aplicado, em que ϕ representa o ângulo de fase. A resposta à perturbação pode sofrer efeitos na sua amplitude e no ângulo da fase, dependendo das características e dos processos que ocorrem no sistema em estudo. Na figura seguinte representa-se a curva de resposta a sistema electroquímico teórico.

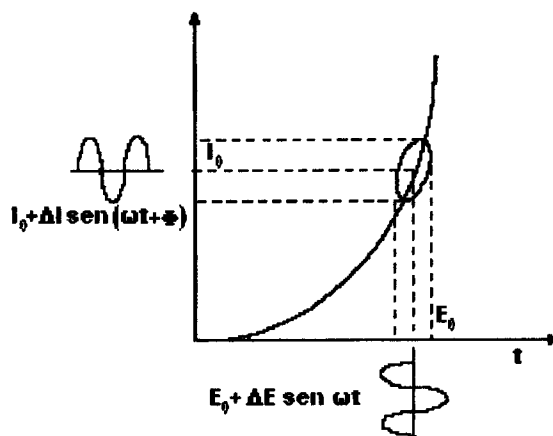


Figura 2.2. Representação da resposta de um sistema electroquímico teórico a uma perturbação sinusoidal⁸⁶.

Esta relação difere de acordo com o potencial aplicado: ac ou dc. Na teoria dc, caso especial da teoria ac em que a frequência é igual a 0 Hz, é possível utilizar a lei de Ohm para se obter relação entre o potencial (V) e a corrente (I).

$$R = \frac{V}{I} \quad (2.1)$$

Na teoria ac, na qual a frequência difere de 0 Hz, esta relação é definida por:

$$Z = \frac{V_{ac}}{I_{ac}} \quad (2.2)$$

em que Z é definido como sendo a impedância, o equivalente ac da resistência (R).

Existem, no entanto, duas formas de representar a impedância:

- Através da utilização de números complexos, em que a impedância é definida por:

$$Z = Z' - iZ'' \quad (2.3)$$

em que Z' e Z'' são, respectivamente, as componentes real e imaginária;

- Através de uma representação vectorial, utilizando coordenadas Cartesianas:

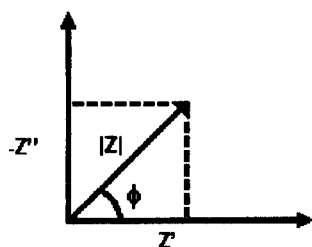


Figura 2.3. Representação vectorial da impedância de um sistema.

Neste sistema de eixos a projecção da impedância sobre o eixo das coordenadas dá origem à componente imaginária, enquanto que a projecção sobre o eixo das abcissas corresponde à componente real da impedância.

A impedância total de um sistema é assim resultado da adição vectorial da impedância de cada um dos componentes que compõe o sistema. A tabela 2.1 sistematiza as impedâncias associadas aos elementos que compõem os circuitos equivalentes:

Tabela 2.1. Resumo dos elementos presentes em circuitos eléctricos equivalentes^{92,93}.

Componentes	Impedância	$\Phi / ^\circ$
R, Resistência	R	0
C, Capacitância	$\frac{1}{j\omega C}$	90
L, Indutância	$j\omega L$	
Q, Elemento de Fase Constante	$\frac{1}{(j\omega C)^n}$	
W, Warburg (Camada de difusão infinita)	$\frac{R}{\sqrt{j\omega}}$	
W, Warburg (camada de difusão finita)	$R \frac{\tanh \sqrt{j\omega \tau}}{\sqrt{\tau}}$	

Experimentalmente, as determinações são efectuadas a vários potenciais d.c. e a frequência da perturbação sinusoidal é variada num intervalo definido, por isso é que a impedância electroquímica é denominada normalmente de espectroscopia de impedância electroquímica.

Contudo, a impedância que se obtém é a impedância global da interface, devida às contribuições dos vários componentes presentes, cuja relação com a respectiva impedância é conhecida (ver tabela 2.1). É então possível pela análise da forma como a impedância total, Z, varia com a frequência angular ω obter os valores dos componentes presentes no circuito equivalente. Esta análise é determinada pela representação no plano complexo de $-Z''$ vs. Z' para diferentes frequências angulares ω e é denominada de diagrama de Nyquist.

2.1.2. Interferências

Os biossensores ainda continuam a ser uma das mais importantes áreas de investigação, apesar dos quarenta anos de intenso estudo. De entre os vários tipos de sensores, os biossensores amperométricos para a determinação de glucose continuam a ser uns dos

mais estudados e várias gerações com diferentes metodologias apareceram desde o aparecimento do primeiro eléctrodo enzimático amperométrico para a determinação de glucose desenvolvido por Clark e Lyons em 1962, descrito no capítulo anterior^{94,95}. Este biossensor deu origem à “primeira geração” de biossensores para a determinação de glucose, cuja metodologia se baseia na detecção amperométrica do peróxido de hidrogénio. Contudo estes dispositivos necessitam de um potencial elevado (+0.5 V vs. SCE)⁹⁶ para a detecção do electroactivo peróxido de hidrogénio devido à presença do oxigénio em solução, conduzindo a interferências introduzidas pela oxidação de espécies electroactivas, como o ácido ascórbico^{97,98}.

Na tentativa de se resolverem estas limitações introduzidas pelo elevado sobrepotencial, uma “segunda geração” de biossensores apareceu, em que a utilização do oxigénio dissolvido como oxidante, foi substituída pela escolha apropriada de mediadores como o ferroceno⁹⁹, hidroquinona¹⁰⁰ ou complexos de ósmio⁹⁷. Novamente a resposta do biossensor voltou a ser afectada, não só pela oxidação dos interferentes promovida pelos mediadores¹⁰¹, mas também pela presença do oxigénio nas amostras que compete com o mediador no “turn over” da enzima⁹⁸. Como resultado, uma tentativa de exclusão dos mediadores do mecanismo da reacção foi realizada pela utilização de sais orgânicos condutores, originando a “terceira geração” de biossensores amperométricos para a determinação de glucose¹⁰².

De entre as várias interferências, frequentemente encontradas nos meios fisiológicos e na indústria alimentar é possível citar espécies como o ácido ascórbico, o ácido úrico e o acetaminofeno como interferências electroactivas, mas também espécies menos frequentes como o etanol, ácido cítrico e outros solventes que podem inibir a cinética enzimática.

Várias tentativas para a solução, ou pelo menos minimização, do problema das interferências têm sido investigadas nas sucessivas gerações de biossensores. Mas principalmente têm sido utilizadas três estratégias:

- Utilização de mediadores;
- Utilização de membranas permeáveis selectivas;
- Imobilização

Todavia estas estratégias introduzem novos problemas. A utilização de mediadores requer um procedimento experimental elaborado, para além de que a transferência

electrónica do mediador pode ser afectada pela reacção entre este e o oxigénio no processo de redução do ciclo enzimático, o que provoca uma diminuição do valor da corrente⁹⁸.

Quanto à utilização de membranas permeavelmente selectivas, a sua permeabilidade relaciona-se com a eliminação das interferências por:

- Exclusão por tamanho¹⁰³;
- Decomposição enzimática¹⁰⁴;
- Repulsão electrostática¹⁰⁵;

O que limita esta aproximação pela possibilidade de algumas das interferências presentes apresentem propriedades idênticas às propriedades de exclusão.

Novas abordagens continuam a surgir na tentativa de solução destes problemas, através de vários processos de imobilização na superfície do eléctrodo. Por exemplo pela utilização de múltiplas camadas enzimáticas para decomposição das interferências electroactivas em espécies neutras¹⁰⁴ ou pela remoção electroquímica dos interferentes antes que estes alcancem o transdutor. Esta é realizada pela utilização de camadas de pré-oxidação, como descrito por Zhang *et al*¹⁰⁶ para uma camada de pré-oxidação de PbO₂ ou pela utilização de canais de pré-oxidação, como demonstrado por Zhao *et al*⁹⁸, com os canais de fluxo.

Muitas outras estratégias continuam a surgir com aplicações na construção de biossensores para a determinação de glucose, mas a procura do biossensor ideal persiste. Através do melhoramento da metodologia da primeira geração de biossensores¹⁰⁷ e com o aparecimento recente de novas tecnologias e de novos materiais, cujas propriedades só agora se começam a compreender, como os eléctrodos quimicamente modificados¹⁰⁸, os fulerenos¹⁰⁹, os hidrogéis¹¹⁰ e os organogéis⁷². Apresenta-se de seguida um quadro resumo das aproximações normalmente utilizadas em biossensores amperométricos:

Tabela 2.2. Quadro resumo das aplicações mais frequentes em biossensores amperométricos.

Deteção H_2O_2	
Mediadores	Ferroceno ^{8,111}
	Azul da Prússia ¹⁰⁷
	Tetratiafulvaleno ^{102,112}
Sais orgânicos condutores¹¹³	
Enzimas	Sistemas multi-enzimáticos ¹⁰⁴
Membranas	Nafion ^{®114}
	Filmes de polipirrólicos ⁹⁶
	Duplas camadas lipídicas ¹¹⁵
	Camadas de pré-oxidação ¹⁰⁶
	Multicamadas de polielectrólitos ^{116,117}

Uma nova aproximação surgiu com a possibilidade de utilização das micro-ITIES baseadas em membranas de poliéster microperfuradas. A evolução desta metodologia, descrita em pormenor no capítulo anterior, demonstrou possuir excelentes propriedades como transdutor na monitorização de reacções enzimáticas, sendo utilizada com sucesso na construção de biossensores de ureia¹¹⁸, de creatinina¹¹⁹ e, com este trabalho, de glucose.

2.2 Procedimento Experimental

Tabela 2. 3. Resumo dos materiais e reagentes utilizados.

Material	Reagentes
- Célula de vidro de 4 eléctrodos	- 1,2-dicloroetano (1,2-DCE), 99%, Aldrich
- Eléctrodos de Ag/AgCl	- Cloreto de lítio (LiCl), 99%, Merck
- Eléctrodos de platina	- Hidróxido de lítio (LiOH), 98%, Merck
- Potenciostato SI 1287 – Solartron Instrum.	- Etanol, 99.8%, Merck
- Analisador da Resposta de Frequência (ARF) SI 1250 – Solartron Instrum.	- L-ácido ascórbico, 99%, Aldrich
	- Citrato de sódio, 99%, Merck

2.2.1. Preparação da célula electroquímica de 4 eléctrodos

A utilização destas células de vidro no estudo das ITIES prende-se com a facilidade da montagem experimental, maior rapidez na sua preparação, pela reprodutibilidade do valor da área da interface e pelos pequenos volumes de solventes presentes nas diferentes fases. Todavia, a utilização destas células electroquímicas introduz uma elevada queda óhmica na interface entre as duas fases imiscíveis, como descrito no capítulo anterior para as macrointerfaces. A utilização de quatro eléctrodos vem suprimir esse efeito facilitando o estudo da interface formada. Na figura 2.4 descreve-se em pormenor os constituintes da célula de vidro usada para as medições electroquímicas de interfaces líquido-líquido.

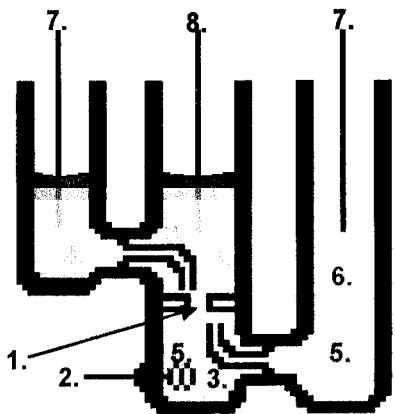


Figura 2.4. Representação esquemática da célula de vidro de 4 eléctrodos utilizada nas determinações de impedância. 1. Interface de área interna igual a 0.28 cm²; 2. Eléctrodo de platina; 3. Capilares de Luggin; 4. Fase aquosa; 5. Fase orgânica; 6. Fase orgânica de referência; 7. Eléctrodos de Ag/AgCl; 8. Eléctrodo de platina.

Para a preparação da célula representada utilizou-se o seguinte procedimento:

- Lava-se a célula muito bem utilizando, alternadamente, etanol, água e acetona e seca-se a célula com a ajuda de um secador de ar quente durante cerca de 5 minutos e deixa-se arrefecer;
- Prende-se a célula num suporte no interior da hotte e com a ajuda de uma pipeta de Pasteur coloca-se um volume de solvente orgânico suficiente para atingir a interface.
- Adiciona-se fase orgânica de referência até a fase orgânica ultrapassar ligeiramente a interface e adiciona-se fase aquosa até a fase orgânica se separar, mas sem que a fase aquosa atravesse o limite inferior da interface.
- Adiciona-se, alternadamente, fase orgânica de referência e fase aquosa até perfazer os volumes pretendidos e mergulham-se os eléctrodos.
- Deixa-se a célula em repouso durante cerca de 30 minutos antes de se dar início às determinações de impedância, de modo a permitir que as espécies em estudo tenham a possibilidade de adsorverem na interface.

A figura 2.5 representa, esquematicamente, a célula electroquímica utilizada nas determinações de impedância electroquímica nos estudos dos efeitos da concentração de PDT e da concentração de GOx.

Célula electroquímica II

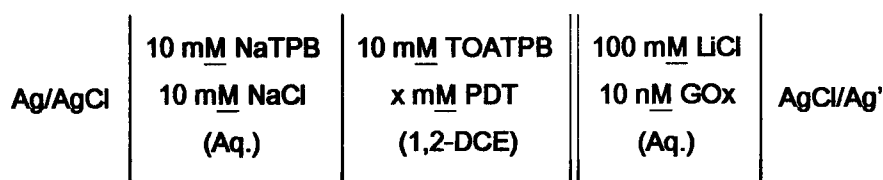


Figura 2.5. Representação esquemática da célula electroquímica II, utilizada na célula de 4 eléctrodos. Utiliza-se uma velocidade de varrimento de 50 mV.s⁻¹.

2.2.2. Técnica: Espectroscopia de Impedância Electroquímica

Nas experiências de impedância electroquímica é necessária a utilização de um potenciostato e de um analisador de resposta da frequência (FRA). Numa primeira fase aplica-se uma rampa de potencial ao sistema electroquímico com o objectivo de se obter o intervalo de potencial no qual a interface apresenta o comportamento indicado para as determinações da capacidade (C_{dc}) por Espectroscopia de Impedância Electroquímica, isto é, no intervalo onde a interface se comporta como idealmente polarizável, a chamada “janela de potencial”.

Após a determinação do voltamograma cíclico para se definir o intervalo de potencial, acciona-se o FRA e aplica-se um varrimento de frequência entre 1 e 300 Hz, a vários potenciais d.c. cujos limites são determinados pela rampa de potencial aplicada anteriormente, no intervalo correspondente à “janela de potencial”.

A interpretação dos resultados da EIE é realizada pela representação do diagrama de Nyquist, à qual se ajustam os circuitos equivalentes possíveis de descrever o comportamento da curva experimental, utilizando o programa Equivalent Circuit desenvolvido por B.A. Boukamp, versão 3.97 de 1989. A figura 2.6 esquematiza o circuito equivalente utilizado no ajuste das curvas experimentais da célula electroquímica II.

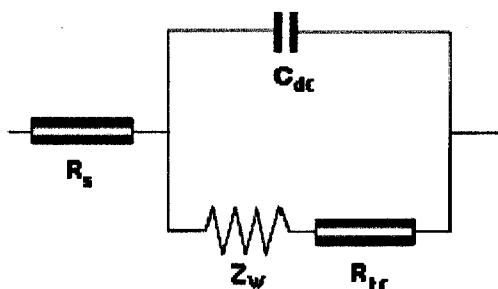


Figura 2.6. Circuito equivalente utilizado no ajuste da célula electroquímica II: $R(C(RW))$.

2.2.3. Interferências

Para o estudo das interferências todo o procedimento é idêntico à determinação amperométrica descrita no ponto 1.3.4. A excepção prende-se com a preparação da fase aquosa à qual são adicionadas previamente as interferências a avaliar e só

posteriormente é realizada a determinação, sem que haja qualquer alteração deste meio aquoso, como esquematizado na célula electroquímica III.

Célula electroquímica III

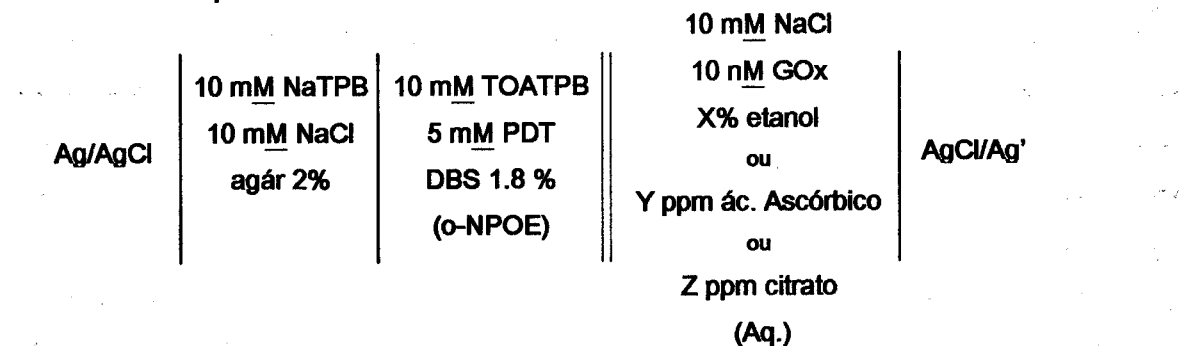


Figura 2.7. Representação esquemática da célula electroquímica III, utilizada para o estudo das interferências. Utiliza-se uma velocidade de varrimento de 50 mV.s^{-1} .

2.3. Caracterização

2.3.1. Transferência assistida do H^+

Como descrito no ponto 1.4.1. o mecanismo de transferência iónica deste biossensor ocorre através da reacção de transferência do H^+ através da micro-ITIES assistida pelo PDT, suportada em membranas de poliéster microperfuradas a presença do ligando surge como um aspecto importante a considerar. De forma a avaliar o efeito do PDT na transferência assistida preparou-se um biossensor, de acordo com o descrito, e mergulhou-se numa solução contendo 10 mM de LiCl como electrólito e 0.1 mM de LiOH para se realizar o acerto de valor de pH, de forma a permitir uma correcta avaliação do desempenho do biossensor com a evolução do valor de pH. Adicionaram-se volumes sucessivos de uma solução de cloreto de hidrogénio e realizou-se uma determinação amperométrica em paralelo com uma determinação potenciométrica, cujos resultados se encontram esquematizados na figura 2.8.

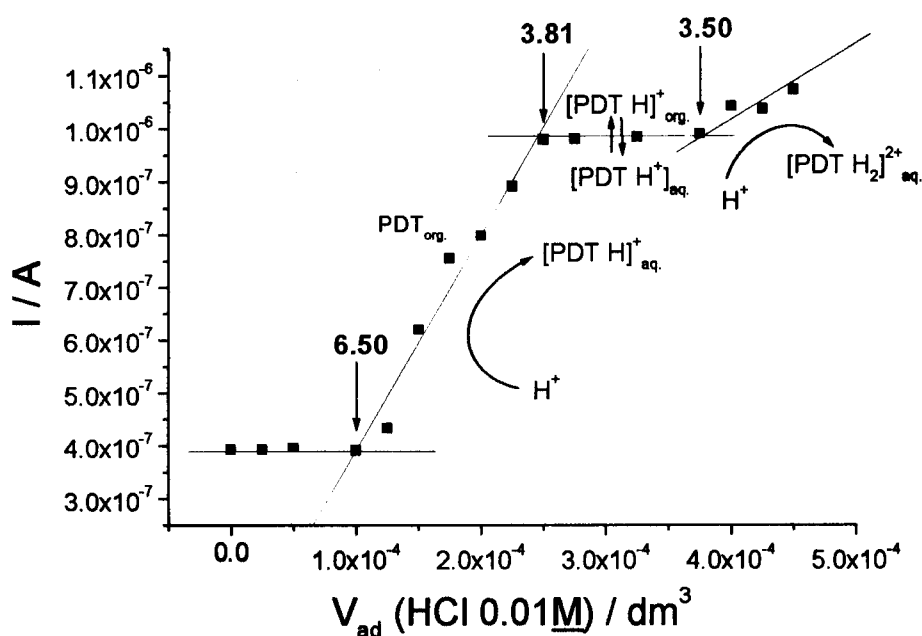


Figura 2.8. Curva amperométrica da adição de diferentes volumes de HCl 10mM. Encontram-se representados a azul os valores do pH para os volumes indicados.

Acompanhando a evolução da intensidade de corrente com a adição de ácido, verificam-se vários comportamentos distintos ao longo da curva, nomeadamente intervalos de

estabilidade da corrente e intervalos de aumento linear da corrente. A interpretação destes resultados pode ser feita tendo em conta a protonação do PDT, como sistematizado na figura 2.8. Os resultados experimentais indicam que a transferência assistida pelo ligando deverá ser do tipo CAT (Complexação Aquosa seguida de Transferência). Esta possibilidade é comprovada pela ligeira solubilidade do PDT em água, embora seja extremamente solúvel em solventes orgânicos, e pela ausência de resposta amperométrica quando o PDT não se encontra presente na fase orgânica, como verificado em trabalho anterior¹²⁰, comprovando que a transferência do catião hidrogénio através da interface não ocorre no intervalo de polarização determinado.

De acordo com o mecanismo definido, verifica-se que a reacção de transferência começa a ocorrer a partir de valores de pH=6.50 com a protonação do PDT em fase aquosa até que se atinja um equilíbrio do PDT protonado em ambas as fases, o que acontece para valores de pH inferiores a 3.81. Contudo, a diminuição do pH para valores inferiores a 3.50 conduz à segunda reacção de protonação do PDT em fase aquosa. Uma curva de titulação realizada posteriormente, em que se prolongou o intervalo da adição, apenas introduziu indícios de existir uma terceira protonação do PDT para valores de pH inferiores a 3.37, todavia o erro experimental associado não permite confirmar completamente essa conclusão. De acordo com a literatura o valor de pK_a do PDT é de 2.95 (25°C)¹²¹ o que associado à estrutura do PDT, representada na figura 2.9, verifica-se a possibilidade de ocorrerem quatro protonações, todavia a sensibilidade da detecção amperométrica não permite verificar estas disposições.

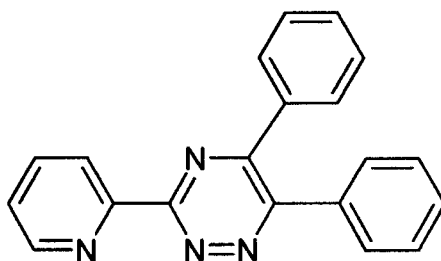


Figura 2.9. Representação da estrutura do PDT.

Na tentativa de esclarecer outros aspectos induzidos pela presença do PDT, aspectos como a adsorção na interface, transferência iónica ou eventual acumulação de carga à superfície, determinaram-se as curvas de capacidade da dupla camada para diferentes concentrações de PDT numa macrointerface líquido-líquido. Para tal utilizou-se uma célula de vidro de 4 eléctrodos (esquematizada na figura 2.4) com uma macrointerface

água|1,2-DCE de 0.28 cm^2 de diâmetro, descrita pela célula electroquímica II. As soluções aquosa e de referência foram calibradas, respectivamente, com $\text{LiOH } 0.1 \text{ M}$ e $\text{NaOH } 0.1 \text{ M}$ de modo a obter um $\text{pH}=8$ para garantir a ausência de protonação. A utilização deste tipo de célula electroquímica prende-se não só com a maior rapidez e facilidade da preparação da montagem experimental, mas também por permitir uma melhor avaliação e comparação dos resultados experimentais, dado que existe uma vasta experiência no estudo das ITIES com esta metodologia. Para o cálculo dos valores de capacidade, o ajuste de um circuito equivalente do tipo $R(C(RW))$, como representado na figura 2.6, foi o mais adequado à curva experimental. De acordo com este resultado é possível atribuir a este sistema electroquímico um significado físico para os vários elementos. Verifica-se a existência uma resistência R_{sol} devida à resistência da solução entre as pontas dos capilares de Luggin, da capacidade da interface C_{dc} pela acumulação de carga na dupla camada interfacial e devido à transferência de iões através da interface a presença de uma impedância de Warburg e de uma resistência à transferência de carga R_{tc} . A representação de $C_{\text{dc}}=f(E)$ dá-nos as curvas de capacidade, como representadas na figura 2.10 para diferentes concentrações de PDT.

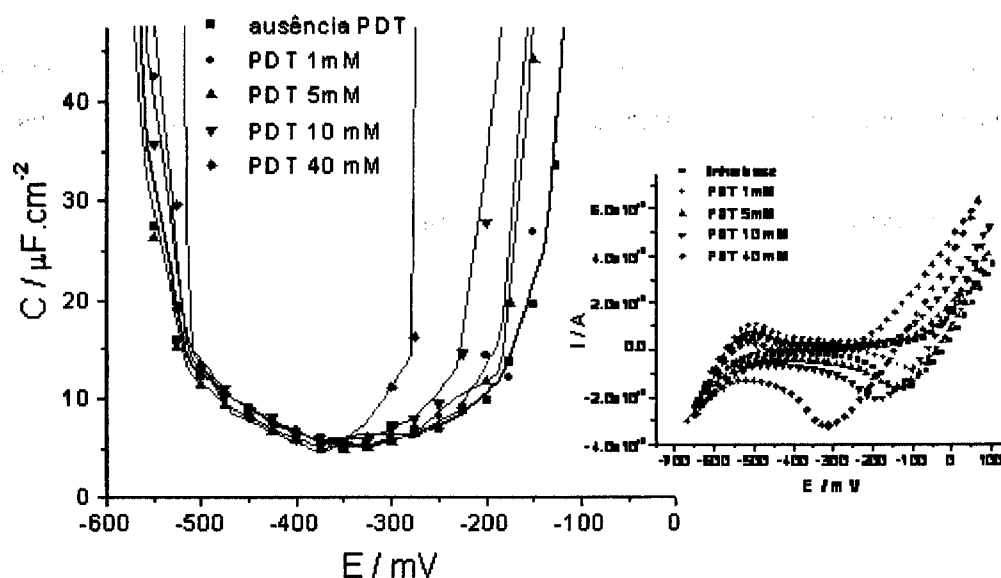


Figura 2.10. Representação das curvas de capacidade para uma macrointerface água|1,2-DCE para diferentes concentrações de PDT.

Analisando a figura é possível verificar que o comportamento das várias curvas se sobrepõem mantendo-se praticamente constante no intervalo de polarização, indicando a inexistência de qualquer fenómeno de adsorção do PDT na interface. A excepção prende-se o aumento prematuro dos valores de capacidade da curva proporcionalmente

ao aumento de concentração de ligando, para valores mais positivos do potencial. Este efeito relaciona-se pelo consequente aumento da concentração de PDT na fase orgânica, que favorece uma maior protonação de PDT e portanto um aumento da intensidade de corrente. A representação, no canto inferior direito da figura 2.10, dos voltamogramas cíclicos realizados antes do início das determinações de impedância electroquímica comprova que o efeito do aumento prematuro dos valores de capacidade se deve ao aumento da transferência do PDT protonado através da interface.

O estudo prévio do efeito do PDT na transferência do protão havia sido realizado por Pereira *et al*⁷², em que se demonstra a importância do ionóforo na operacionalidade do biossensor. Utilizando a voltametria cíclica, numa célula de 2 eléctrodos, verificaram que a transferência assistida do protão pelo PDT depende da concentração deste, mas que se obtém-se uma maior sensibilidade, em termos de detecção amperométrica, para menores concentrações de ligando. Como não se verificaram quaisquer alterações a nível dos valores de capacidade, utilizou-se uma concentração de 5 mM em PDT nas determinações amperométricas para se favorecer o aspecto da sensibilidade da detecção uma vez que se demonstrou a inexistência de quaisquer outros condicionantes.

Um outro aspecto que condiciona o desempenho da transferência iónica é a presença da enzima na interface. Assim, a caracterização da adsorção da GOx na presença de PDT torna-se necessária para uma melhor compreensão do mecanismo de transferência iónica e da própria interacção da enzima com a superfície do eléctrodo. Presume-se que a GOx se encontre preferencialmente adsorvida na superfície do gel orgânico dos microorifícios da membrana de poliéster, como esquematizado na figura 1.24.

Georganopoulou *et al*¹⁵ demonstraram no seu trabalho que a GOx adsorbe na interface DCE|água, permitindo a determinação da reactividade desta enzima através da electroquímica da interface líquido-líquido. Deste modo, pela aplicação da impedância electroquímica à célula electroquímica II, esquematizada na figura 2.5, determinaram-se as curvas de capacidade representadas na figura 2.11 para diferentes concentrações de GOx. De notar que após montagem da célula, aguardaram-se 30 minutos antes de realizar as determinações para permitir a adsorção da enzima na interface.

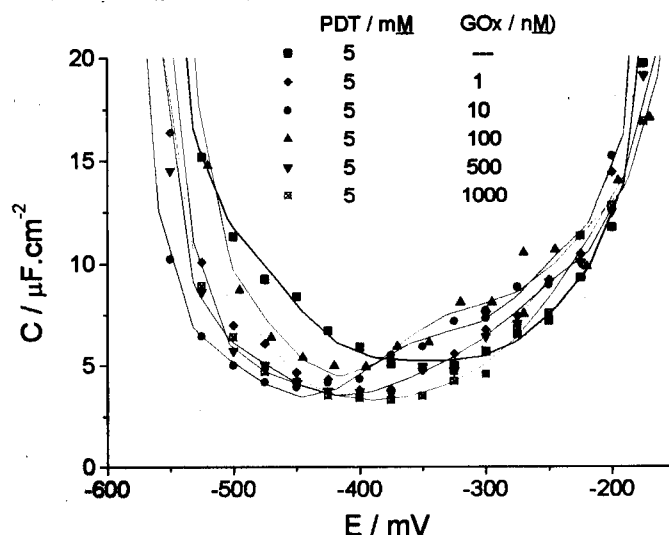


Figura 2.11. Representação das curvas de capacidade para uma macrointerface água|1,2-DCE para diferentes concentrações de GOx.

Analisando a figura 2.11 verifica-se que a presença do PDT parece não introduzir qualquer efeito no comportamento da GOx. Contudo, as diferentes concentrações de GOx alteram significativamente as curvas de capacidade. Observa-se, tal como havia verificado Oliveira¹²² e também Georganopoulou¹⁵, que a adsorção da GOx na interface ocorre para potenciais mais negativos, indicada pela diminuição da capacidade interfacial. Verifica-se que esta diminuição da capacidade é mais pronunciada para valores extremos da concentração de GOx (10 e 1000 nM). Para potenciais mais positivos ocorre um aumento da capacidade para baixas concentrações de GOx, que poderá ser uma consequência da prévia transferência assistida do protão para a fase orgânica de modo a compensar a acumulação de cargas negativas na interface, introduzidas pela enzima adsorvida.

A figura 2.12 esquematiza os valores de capacidade para os potenciais onde ocorrem os fenómenos de adsorção e desadsorção, o que corresponde, respectivamente, a potenciais inferiores a -350 mV e superiores a -450 mV.

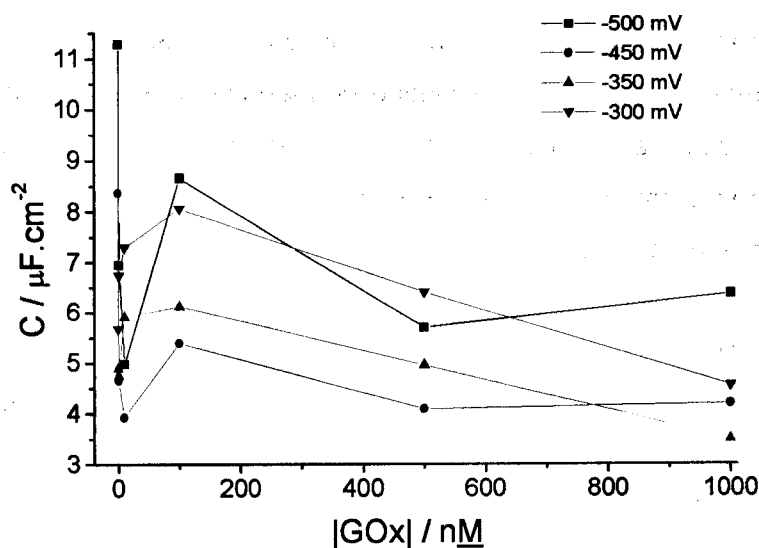


Figura 2.12. Representação da capacidade interfacial com a concentração de GOx a potenciais fixos.

Com o objectivo de compreender o comportamento da GOx na interface no decorrer da reacção enzimática, determinaram-se os valores da capacidade da dupla camada na interface, utilizando uma concentração de 10 nM de GOx na presença de diferentes concentrações de D(+)-glucose, a 5 potenciais diferentes seleccionados pela observação do comportamento obtido nas curvas de capacidade para as diferentes concentrações de GOx.

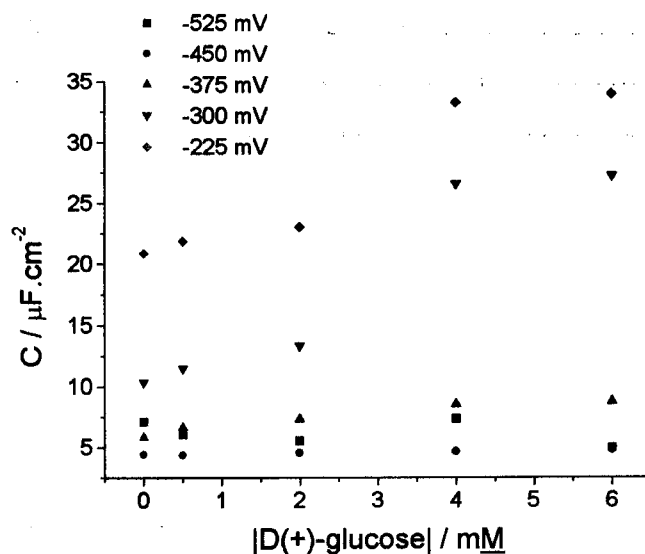


Figura 2.13. Representação dos valores de capacidade para diferentes concentrações de D(+)-glucose.

A representação da figura 2.13 comprova a existência de dois comportamentos distintos, obtidos anteriormente, para potenciais mais negativos e mais positivos. Verifica-se que para potenciais mais negativos a capacidade permanece constante com o aumento da concentração de glucose, demonstrando que a presença de substrato não altera o comportamento de adsorção da enzima. Pelo contrário, para os potenciais de -225 e -300 mV a capacidade varia com a concentração de glucose, revelando dois comportamentos distintos, idênticos ao verificado nas curvas de determinação amperométrica (ver figura 1.27). Estes valores de capacidade, bastante superiores aos obtidos a potenciais mais negativos, podem ser explicados para concentrações de glucose mais baixas, pelo aumento da concentração de glucose que conduz ao aumento da concentração do protão e portanto a um aumento da transferência de espécies carregadas através da interface, com o consequente aumento da capacidade. Para concentrações de glucose mais elevadas ocorre um aumento abrupto da capacidade seguido de um comportamento quase constante que indica uma maior acumulação de carga na interface em detrimento de um transporte de carga efectivo.

Santos¹²³ verificou que a adsorção da GOx nas interfaces estudadas não parece ser afectada pela natureza do solvente, dado que obteve um valor de ΔG_{ads}^o de -21 e -22 kJ.mol⁻¹, respectivamente, para a interface água|1,2-DCE e água|o-NPOE. Este resultado permite assumir que os comportamentos obtidos nestes estudos para a interface água|1,2-DCE possam ser transpostos para a interface utilizada neste biossensor.

Verificou também que a capacidade interfacial foi afectada pelo pH da fase aquosa na presença de GOx, sendo este efeito mais pronunciado a pH inferior ao ponto isoelectrico (PI) da enzima, que de acordo com a literatura se situa entre 4.2¹²⁴ e 4.3¹²⁵.

2.3.2. Interferências

Recentemente, um artigo de revisão sobre a utilização dos biossensores na indústria alimentar e das bebidas²¹, veio demonstrar que as características dos biossensores, como a especificidade e selectividade, baixo custo de construção, miniaturização, portabilidade, torna-os uma excelente metodologia para a sua aplicação em amostras reais. Demonstraram ainda que a comercialização dos biossensores na indústria alimentar é maioritariamente relacionada com os biossensores de glucose, mais

propriamente com os biossensores amperométricos para a determinação de glucose. A esta utilização estão inerentes as interferências de espécies utilizadas nesta indústria associadas ao teor alcoólico, conservantes, antioxidantes, etc.

Dado que uma das possíveis aplicações deste biossensor se relaciona com a utilização na indústria das bebidas, foram avaliadas três das interferências mais frequentes nesta indústria: etanol, ácido ascórbico e ácido cítrico (neste caso a base conjugada citrato). Para se quantificar o efeito da presença de interferentes na resposta do biossensor, utiliza-se a metodologia introduzida por Brahim *et al*⁷³, que não é mais que uma determinação relativa do desvio da resposta amperométrica na presença e ausência do interferente, neste caso o etanol, dada pela seguinte equação:

$$\text{desvio da resposta (\%)} = \left[\frac{(I_p - I_a)}{I_a} \right] \times 100 \quad (2.4)$$

em que I_p e I_a representam, respectivamente, a resposta amperométrica para uma determinada concentração de substrato na presença e ausência de interferências.

Etanol

Vários autores avaliaram o efeito da presença do etanol. Kröger *et al*¹²⁶, estudaram o comportamento da GOx na presença de soluções etílicas e verificaram que o grau com que o etanol influencia o valor da actividade determinada dependia da quantidade de enzima imobilizada. Também demonstraram que, para concentrações elevadas de enzima imobilizada, existe um aumento aparente da actividade enzimática na presença de etanol, sobretudo para concentrações de etanol de 20% (v/v). Por sua vez, Eremin *et al*⁸⁴ verificaram, num estudo de estabilidade térmica da GOx extraída de *penicillium adametzii*, que a actividade desta enzima na presença de etanol a 7% diminuía 16.5% enquanto que para concentrações de etanol de 20% a diminuição atingia valores de 34%.

Neste trabalho preparou-se uma célula electroquímica, esquematizada na figura 2.7, para a qual se determinaram as curvas amperométricas na ausência e presença de etanol nas percentagens de 1,2 e 5% em volume. Os resultados destas determinações encontram-se esquematizados na representação gráfica da figura 2.14:

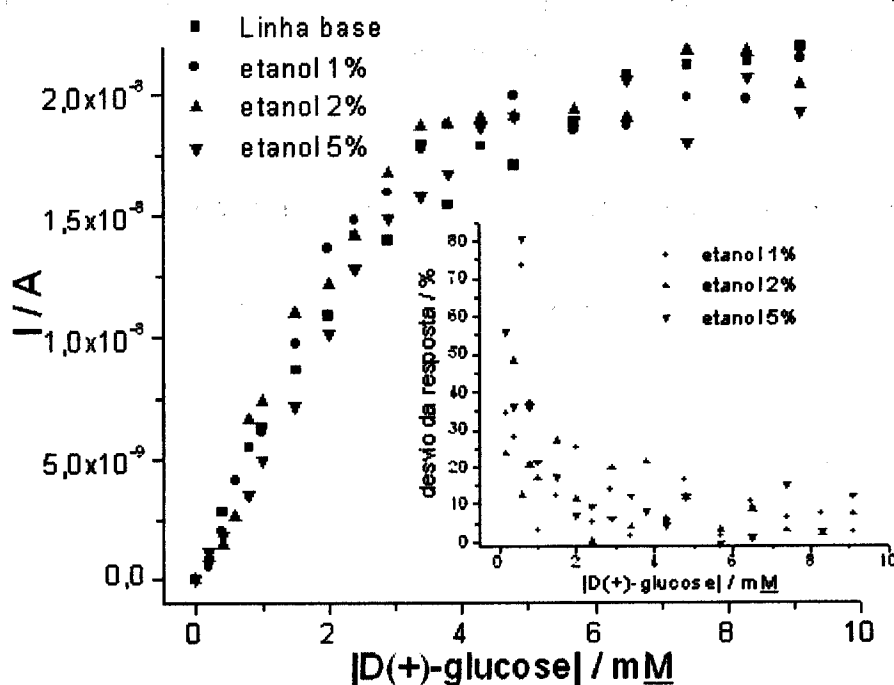


Figura 2.14. Representação do efeito da presença de etanol na resposta do biossensor.

Uma primeira observação das curvas amperométricas evidencia a inexistência de qualquer efeito devido à presença de etanol na fase aquosa. Contudo, analisando o gráfico do desvio da resposta, é possível observar a existência de enormes desvios para as concentrações mais baixas de glucose, que tendem para valores da ordem de grandeza do erro associado a este biossensor à medida que a concentração de glucose aumenta.

Na tabela 2.4 encontram-se representados os valores médios da sensibilidade para a região linear da curva calibração, assim como os valores médios para o desvio da resposta para a presença de etanol. Apesar de o desvio médio da resposta indicar uma pequena contribuição da presença de etanol nas soluções, a comparação entre as médias da linha de base e as de cada uma das concentrações de etanol, utilizando o teste t^{127} , permite verificar que, para um grau de confiança de 95%, as médias diferem estatisticamente entre si (t crítico de 2.10), comprovando a interferência do etanol.

Contudo este comportamento para as menores concentrações de D(+)-glucose foi também observado para na própria curva de calibração. Neste caso, este aumento do desvio da resposta poderá estar relacionado com uma resistência inicial à difusão do

protão, introduzida pela maior viscosidade da solução aquosa introduzida pela presença de etanol, como referem Dremel e colaboradores¹²⁸. Para concentrações superiores de glucose este efeito não é tão pronunciado e portanto o desvio da resposta médio para a interferência é dissipado à medida que a concentração de substrato vai aumentando.

Tabela 2.4. Valores para o desvio da resposta devido à presença de etanol.
Intervalo linear (0,2 a 3,8 mM D(+)-glucose)

	Sensibilidade / nA.mM ⁻¹	Desvio padrão / nA.mM ⁻¹	r	Desvio da resposta / %	Teste t
Linha base	5.117	0.8561	0.9912	0	-
Etanol 1%	5.656	1.200	0.9850	10.5	1.04 (15)
Etanol 2%	5.688	1.217	0.9847	11.2	1.09 (16)
Etanol 5%	4.940	0.5661	0.9958	3.5	0.757 (17)

Nota: os números entre parêntesis na coluna do teste t representam os graus de liberdade de t.

Ácido ascórbico

O ácido ascórbico é possivelmente a espécie interferente mais estudada pelo facto de estar presente a nível fisiológico e na indústria alimentar, mas também por ser uma espécie bastante electroactiva, com um potencial de oxidação padrão de -0,180 v (vs. Ag/AgCl)¹¹¹. O ácido ascórbico está presente não apenas a nível fisiológico, com uma concentração no cérebro de 500 μM¹²⁹ e no sangue de 0.1 mM¹⁰⁴, mas também na indústria alimentar e das bebidas, com concentrações inferiores a 5x10⁻⁴ M¹³⁰.

Neste estudo da interferência do ácido ascórbico utilizam-se as concentrações de 1, 10 e 100 ppm, sendo que 1 ppm corresponde a uma concentração de 57 mM. Na figura 2.15 apresentam-se as curvas amperométricas para a presença de ácido ascórbico, determinadas de acordo com o esquematizado na célula electroquímica III, sem que fosse realizado qualquer acerto de pH. É possível verificar pela análise da figura um desvio significativo da resposta amperométrica para as concentrações de ácido ascórbico de 10 e 100 ppm.

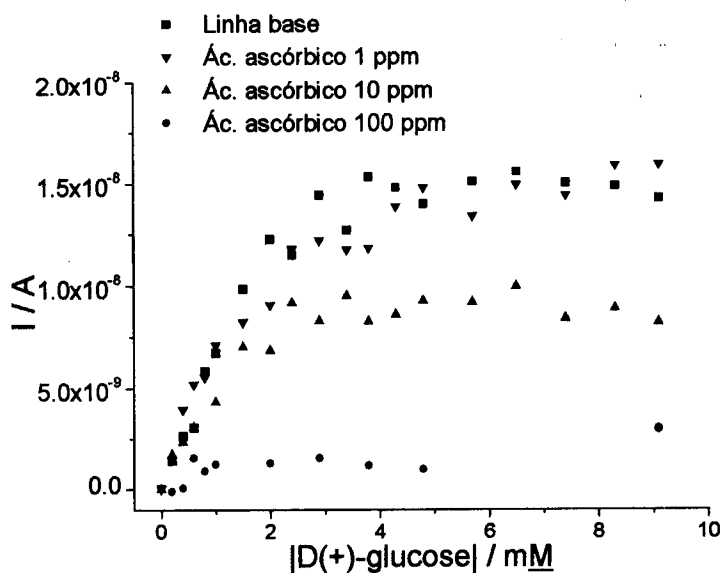


Figura 2.15. Representação do efeito da presença de ácido ascórbico na resposta do biossensor

Aplicando a equação 2.4 obtiveram-se os valores para o desvio da resposta de 7.45, 33.8 e 91.0 para as concentrações de 1, 10 e 100 ppm, respectivamente. Estes valores demonstram a interferência do ácido ascórbico quando presente em concentrações de 10 e 100 ppm. Contudo, como o intervalo de linearidade da D(+)-glucose se situa entre 0.2 e 3.5 mM, a que correspondem, respectivamente, concentrações de 36 e 634 ppm e como a concentração de D(+)-glucose em amostras reais se situa entre 150 e 52500 ppm, para os vinhos¹²⁸, e entre 20800 e 56800 ppm para os sumos de fruta e refrigerantes (como a Fanta®)¹⁰¹, surge a necessidade de diluir as amostras reais para que seja possível a detecção amperométrica. Esta necessidade de diluir as amostras reais em factores da ordem de 1:100, conduz necessariamente a uma diminuição da concentração das espécies interferentes na mesma razão. Deste modo, apesar de existir interferência pelo ácido ascórbico para concentrações de 10 e 100 ppm, a diluição das amostras reais origina concentrações de ácido ascórbico nas bebidas inferiores a 1 ppm, não existindo desta forma interferência na determinação.

Citrato

Relativamente ao ácido cítrico, embora seja uma espécie interferente pouco estudada, este está presente em muitas bebidas como agente antioxidante, por exemplo nos sumos de fruta concentrados Um Bongo® (embora na tabela nutricional se indique a presença de

ácido cítrico, não é referida a concentração deste). Neste trabalho foi realizado um estudo da interferência da sua base conjugada o citrato, devido a dificuldades experimentais na determinação com ácido cítrico relacionadas com a saturação da resposta do biossensor. Novamente as determinações foram realizadas de acordo com o esquematizado na célula electroquímica III e também não se realizou qualquer acerto de pH.

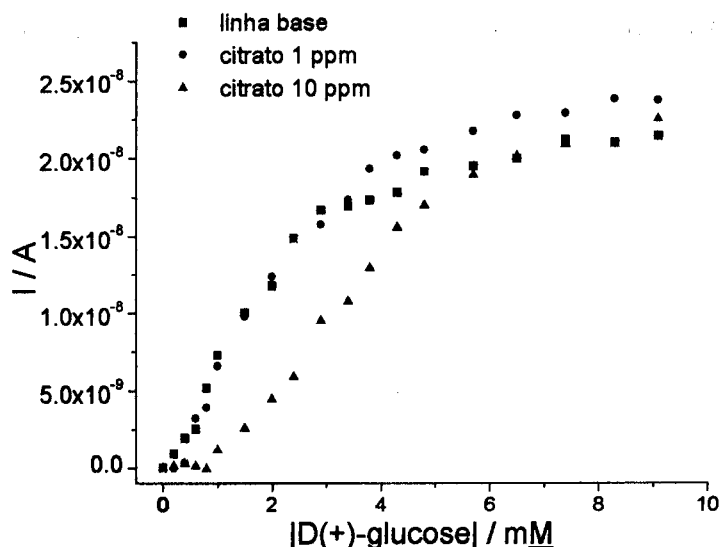


Figura 2.16. Representação do efeito da presença de citrato na resposta do biossensor.

Pela análise da figura 2.16, verifica-se que ocorre interferência por parte do citrato para a concentração de 10 ppm. Contudo o comportamento da curva, à excepção da fase inicial, é semelhante à linha de base sobrepondo-se com esta para as concentrações mais elevadas de glucose. Este resultado é facilmente explicado pela ocorrência de uma reacção de ácido-base entre o ácido glucónico e o citrato, que consome os catiões hidrogénio inicialmente produzidos e que só após a neutralização da base é que se inicia a transferência assistida do protão.

De acordo com a literatura¹³⁰, a concentração de ácido cítrico nas bebidas situa-se no intervalo 1×10^{-3} a 1×10^{-2} M, o que equivale a concentrações de citrato entre 198 e 1980 ppm. Verifica-se, tal como no caso do ácido ascórbico, que apesar de existir interferência do citrato para estas concentrações, a necessidade de diluição da amostra de, modo a que a concentração de D(+)-glucose se enquadre no intervalo de detecção, conduz a uma concentrações inferiores a 1 ppm, sendo então possível considerar que o citrato não causa interferência à determinação para estas condições.

2.4 Conclusão

Pelo comportamento da intensidade de corrente perante a adição de ácido clorídrico 0,01 M, foi possível acompanhar a protonação do PDT. Os resultados experimentais indicam que a transferência assistida pelo ligando deverá ser do tipo CAT (Complexação Aquosa seguida de Transferência). Permitiram também verificar que devido às reacções de protonação do PDT o intervalo de pH em que se torna possível acompanhar a transferência do protão, sem que ocorra interferência por parte do PDT, se situa entre 6,5 e 3,8.

Na caracterização dos aspectos associados a uma eventual adsorção do PDT na interface, verifica-se, de acordo com os resultados obtidos pelas curvas de capacidade e pelos voltamogramas cíclicos para diferentes concentrações de PDT, que não existe qualquer fenómeno de adsorção do PDT na interface, mas apenas um aumento da capacidade interfacial devido ao aumento da protonação do PDT associado à presença de concentrações mais elevadas em solução.

A utilização da impedância electroquímica permitiu determinar as curvas da capacidade interfacial para diferentes concentrações de GOx, numa interface água|1,2-DCE. Tal como demonstram outros autores^{15,123}, torna-se possível transpor os comportamentos obtidos nesta interface para interface gelificada água|o-NPOE utilizada neste biossensor. Depreende-se que a adsorção da enzima na interface é superior para os valores extremos de concentração de GOx (10 e 1000 nM) e para potenciais aplicados mais negativos. Para potenciais mais positivos observa-se um aumento da capacidade, relacionado com a acumulação de cargas na interface (devidas à adsorção da GOx).

A possibilidade de utilização deste biossensor na indústria das bebidas, acarreta a possibilidade de ocorrer interferência à determinação por parte de espécies presentes neste tipo de soluções como o etanol, o ácido ascórbico e o ácido cítrico. O estudo realizado demonstra que existe interferência por parte do ácido ascórbico e do citrato para concentrações superiores a 1 ppm. Normalmente, nas amostras reais, a concentração destas espécies é superior, contudo, a necessidade de realizar uma diluição da amostra de modo a que concentração de D(+)-glucose se situe no intervalo de detecção, faz com que a interferência destas espécies seja minimizada. No caso do

etanol, apesar do desvio médio da resposta ser da mesma ordem de grandeza do desvio de padrão, verifica-se que existe interferência na detecção nas concentrações analisadas. Observa-se, no entanto, que este resultado é hiperbolizado pelos desvios significativos nas concentrações de D(+)-glucose inferiores a 2 mM, possivelmente relacionados com uma alteração dos processos de difusão das espécies devido ao aumento da viscosidade da solução pela presença de etanol.

3

Optimização do biossensor

Neste capítulo são avaliadas novas possibilidades de optimização do biossensor pelo desenvolvimento e caracterização de novos géis orgânicos, pela determinação das propriedades dieléctricas que lhes estão associadas e pela aplicação de filmes de Langmuir-Blodgett de 9,9-difenilfluoreno oligotiofeno (FT3) como método de imobilização da enzima. Para o estudo das propriedades dos géis utilizam-se técnicas como a voltametria cíclica e a espectroscopia de impedância electroquímica, para a determinação das propriedades dieléctricas realizam-se determinações de Cole-Cole, enquanto que para os estudos de imobilização e de superfície utiliza-se a técnica de Langmuir-Blodgett e a goniometria, respectivamente.

3.1 OPTIMIZAÇÃO.....	83
3.1.1. EFEITO DOS SOLVENTES ORGÂNICOS	83
3.1.2. EFEITO DO AGENTE GELIFICANTE	84
3.1.3. DETERMINAÇÃO DE CONSTANTES DIELECTRICAS E DE RELAXAÇÃO DIELECTRICA.....	88
3.1.4. APLICAÇÃO DE FILMES LANGMUIR-BLODGETT DE POLITIOFENOS SUBSTITUÍDOS EM BIOSSENSORES ..	91
3.1.5. CARACTERIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES	96
3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	99
3.2.1. MATERIAL E REAGENTES.....	99
3.2.2. PURIFICAÇÃO DO 1,6-DICLOROHEXANO (1,6-DCH).....	100
3.2.3. PREPARAÇÃO DE GÉIS ORGÂNICOS	101
3.2.3.1. Policloreto de vinilo – PVC.....	101
3.2.3.2. 1,3:2,4-dibenzilideno sorbitol – DBS.....	102
3.2.4. PREPARAÇÃO DE SAIS ORGÂNICOS LIPOFÍLICOS.....	103
3.2.5. DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CAPACIDADE.....	105
3.2.5.1. Interface Líquido-Líquido.....	105
3.2.5.2. Interface Gel-Líquido.....	106
3.2.6. DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA DOS GÉIS ORGÂNICOS.....	108
3.2.7. TÉCNICAS	108
3.2.7.1. Langmuir-Blodgett (LB)	108
3.2.7.2. Goniometria.....	110
3.2.7.3. Determinação dos parâmetros associados às propriedades dieléctricas.....	112
3.3. ANÁLISE DE RESULTADOS.....	114
3.3.1 OPTIMIZAÇÃO DOS GÉIS ORGÂNICOS	114
3.3.2. CARACTERIZAÇÃO DE SOLVENTES E GÉIS ORGÂNICOS	115
3.3.2.1. Efeito do electrólito da fase orgânica	116
3.3.2.2. Efeito do solvente orgânico	117
3.3.2.3. Efeito do electrólito da fase aquosa.....	119
3.3.2.4. Efeito da gelificação da fase orgânica.....	120
3.3.2.5. Resistência dos géis orgânicos	122
3.3.2.6. Transferência iónica através de uma microinterface gelificada água 1,6-DCH	124
3.3.3. ESTUDO DAS PROPRIEDADES DIELECTRICAS DE GÉIS ORGÂNICOS	125
3.3.4. PREPARAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE GLUCOSE OXIDASE EM FILMES DE LANGMUIR-BLODGETT DE 9,9-DIFENILFLUORENO OLIGOTIOFENO (FT3)	131
3.3.5. CARACTERIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES POR DETERMINAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTACTO DE GOTAS DE ÁGUA	134
3.3.5.1. Poliéster (PET)	134
3.3.5.2. Gel orgânico o-NPOE.....	136
3.3.5.3. 9,9-Difenilfluoreno oligotiofeno (FT3).....	138
3.4 CONCLUSÃO	139

3.1 Optimização

3.1.1. Efeito dos solventes orgânicos

Como demonstrado anteriormente, um dos factores que contribui para a versatilidade e aplicabilidade de um biossensor amperométrico baseado em μ ITIES líquido-gel é o comportamento do solvente orgânico que serve de base à formação do gel, não só pelas alterações que introduz a nível da janela de potencial do sistema, mas também pelos aspectos relacionados com o impacto ambiental, com a sua toxicidade, com as suas propriedades físico-químicas ou até mesmo com o custo do próprio solvente. A grande maioria dos trabalhos realizados para o estudo das ITIES utilizam normalmente, como solvente da fase orgânica, o 1,2-dicloroetano (1,2-DCE)^{131,132,133} e o nitrobenzeno^{134,135,136} (NB) pelo facto de estes formarem uma interface líquido-líquido estável. Todavia o 1,2-dicloroetano¹³⁷ (CAS 107-06-2) e o nitrobenzeno¹³⁸ (CAS 98-95-3) apresentam elevada toxicidade, o que limita a utilização destes solventes em biossensores devido aos aspectos ambientais, de saúde e de manuseamento que introduzem.

Segundo Vanýsek^{139,140} um solvente adequado para os estudos em líquido-líquido deverá obedecer a determinados requisitos:

- A solubilidade do solvente orgânico na água e desta no solvente orgânico deverá ser mínima;
- O solvente deve ser suficientemente polar, para que possa ocorrer a dissociação do electrólito e assim assegurar a condutividade eléctrica da solução. Considera-se neste aspecto um bom solvente, aquele que apresentar um valor mínimo de 10 para a constante dieléctrica;
- A densidade do solvente deve ser significativamente diferente da solução aquosa, para que a interface líquido-líquido seja estável.

Vários solventes orgânicos têm sido estudados na tentativa de encontrar um que reúna o maior número de requisitos. Foram estudados solventes como o clorofórmio¹⁴¹, o o-nitrotolueno¹⁴², o-diclorobenzeno e a metilciclohexanona¹⁴³, o nitroetano¹⁴⁴ e também misturas de solventes, como por exemplo a mistura de o-diclorobenzeno e clorobenzeno¹⁴³. Todavia estes solventes apresentam toxicidades elevadas, limitando a sua utilização, pelo que foram estudados, recentemente, outros solventes de toxicidade mais reduzida. Cheng e Schiffrin¹⁴⁵ estudaram a possibilidade de utilizar solventes como

a 2-heptanona e a 2-octanona no estudo dos processos de transferência iónica nas ITIES. Um estudo idêntico foi realizado por Samec^{146,147} e seus colaboradores que utilizaram o éter o-nitrofeniloctílico (o-NPOE). Este solvente revelou ser bastante interessante, não só pela sua baixa toxicidade, mas pelas suas propriedades para os estudos de interfaces líquido-líquido, como uma constante dielétrica relativamente elevada uma baixa solubilidade em água (ver tabela 3.1) e também por apresentar outras propriedades excelentes como o facto de ser um bom plasticizante. Estes factores levaram a que o nosso grupo de investigação tenha utilizado as suas propriedades para a criação de um gel orgânico capaz de ser utilizado em estudos de microinterfaces líquido-gel e no desenvolvimento de biossensores. O trabalho desenvolvido na preparação e utilização deste gel orgânico é descrito no capítulo um, no desenvolvimento do biossensor amperométrico para a determinação de glucose, cuja interface é constituída pelo gel orgânico de DBS/o-NPOE.

Apesar do excelente desempenho na detecção do catião hidrogénio, a janela de potencial que introduz não é suficiente alargada para permitir a detecção de outras espécies iónicas. Um estudo recente de Katano¹⁴⁸ introduziu a possibilidade de utilização do 1,6-diclorohexano nos estudos de interfaces líquido-líquido. Interessantemente, a janela de potencial da interface 1,6-DCH|água é bem mais alargada que as das correspondentes interfaces de 1,2-DCE e nitrobenzeno, bastante utilizadas. Novamente, um trabalho de Samec¹⁴⁹ e colaboradores atribui a este solvente orgânico a possibilidade de se utilizarem as suas propriedades gelificantes no desenvolvimento de microinterfaces líquido-gel. O seu estudo descreve a utilização de uma interface entre uma membrana plastificada de PVC em 1,6-diclorohexano e água para a determinação por voltametria cíclica da heparina. Surge então a possibilidade de utilização de uma família de solventes, já testada na interfaces líquido-líquido¹⁵⁰, mas cujas propriedades gelificantes só agora se começam a descobrir.

3.1.2. Efeito do agente gelificante

É possível resumir a constituição de um gel como sendo uma malha fibrilar, que confere elasticidade, envolvendo um solvente líquido que ocupa o espaço interior da malha. Os géis obtêm-se após a adição de um componente com tendência para a polimerização, denominado de agente gelificante, a um solvente líquido, formando uma rede elástica

tridimensional que o envolve, atribuindo ao gel propriedades idênticas às de um sólido. Consoante o tipo de solvente vamos ter diferentes tipos de géis. Se o solvente se tratar de uma solução aquosa, estamos perante um "hidrogel", se o solvente for orgânico, estamos na presença de um "organogel"¹⁵¹.

As características de um gel podem ser avaliadas através de dois parâmetros diferentes: as constantes elásticas do polímero que constitui a malha e o factor de fricção do solvente que ocupa o espaço interior que quantifica a velocidade da malha. Tanaka *et al*¹⁵² demonstraram como quantificar esses valores macroscopicamente e através da utilização de funções de correlação da luz difusa. Permitindo desta forma a quantificação das propriedades de viscosidade do gel, que se devem precisamente à fricção da malha polimérica com o solvente no seu interior. Também o próprio solvente vai sofrer flutuações térmicas na sua estrutura que irão afectar a estrutura da rede, determinando as características de termorreversibilidade do gel.

O agente gelificante é um aspecto que condiciona fortemente as características do gel. Um dos agentes gelificantes mais utilizados é o policloreto de vinilo (PVC). Este polímero, obtido a partir da polimerização do cloreto de vinilo, apresenta-se como um pó muito fino, de cor branca e totalmente inerte¹⁵³. É bastante utilizado como plasticizante, com uma produção de cerca de 5.5 milhões de toneladas na Europa, em 1998. O PVC é sobretudo utilizado no sector da construção, que representa 57% do total das aplicações. É igualmente utilizado em embalagens, equipamentos e aparelhos domésticos e em veículos automóveis. Desde há algumas décadas que as questões ambientais relacionadas com o PVC são discutidas pelo que, a Comissão Europeia adoptou, pela primeira vez, um Livro Verde que avalia os aspectos ambientais do PVC. O Livro Verde identifica e analisa, pormenorizadamente, um leque de aspectos relacionados com o PVC e respectivo impacto sobre o ambiente: a indústria do PVC e seus produtos, aditivos e gestão dos resíduos de PVC (nomeadamente reciclagem, incineração e deposição em aterros)¹⁵⁴.

De acordo com Agência de Protecção Ambiental Norte Americana¹⁵⁵, verifica-se uma forte evidência de uma relação de causa-efeito entre a exposição ao cloreto de vinilo e o risco excessivo de angiosarcoma do fígado. O cancro do pulmão também se pode encontrar relacionado com a exposição de cloreto ao vinilo, mas os dados de Waxweiler *et al*¹⁵⁶ referem que o risco é devido a uma exposição ao policloreto de vinilo em detrimento do cloreto de vinilo.

Embora seja o agente mais utilizado na gelificação de fases orgânicas em estudos laboratoriais, as características que lhe são atribuídas em termos de efeitos no ambiente e de risco de efeitos na saúde pública, limitam a sua utilização em grande escala, conduzindo a uma procura de outro tipo de agentes de menor toxicidade.

Um outro agente gelificante, cujas propriedades toxicológicas são bem mais favoráveis, é o 1,3:2,4-dibenzilideno sorbitol (DBS), um derivado do açúcar D-glucitol. A sua estrutura química, esquematizada na figura 3.1, revela a forma de “borboleta”, que é uma característica específica desta molécula. Verifica-se também, como descreve Mercurio *et al*¹⁵⁷, que a molécula dispõe de vários pontos com grande susceptibilidade para formarem interações químicas específicas, como os grupos fenilos, acetilos e hidroxilos. As interações que estes grupos induzem forçam a molécula a rearranjar-se nos solventes orgânicos, formando uma estrutura tridimensional nanofibrilar, através de ligações de hidrogénio e interações fenólicas. Estas ligações são facilmente quebradas por aquecimento, verificando-se que o gel formado possui termorreversibilidade¹⁵⁸.

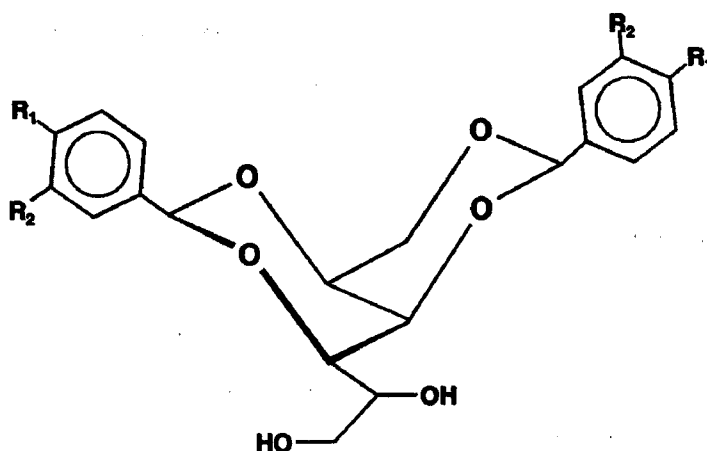


Figura 3.1. Estrutura química da molécula 1,3:2,4-dibenzilideno sorbitol (DBS) demonstrando a sua estrutura específica em forma de “borboleta”. Em que R_1 e R_2 representam átomos de hidrogénio para o caso do DBS e R_1 um grupo alquilo e R_2 um átomo de hidrogénio para outros derivados, MDBS e EDBS, respectivamente¹⁵⁹.

Tabela 3.1. Propriedades físico-químicas dos solventes orgânicos utilizados

Solvente Orgânico	Densidade / g.cm ⁻³	Ponto ebulição / °C	Ponto inflamação / °C	Constante dielétrica	Solubilidade em água / %(m/m)	Viscosidade / cP	Pressão Vapor / Pa (25°C)	Referências
Éter o-nitrofenilietílico	1.041	197-198 (11 mmHg)	---	24.2	2x10 ⁻⁶	13.8	---	160,161
1,2-dicloroetano (1,2-DCE)	1.235	83.5	13	10.4	0.87	0.84	10600	162,163
1,3-dicloropropano (1,3-DCP)	1.19	---	---	8.9	---	---	---	161
1,4-diclorobutano (1,4-DCB)	1.160	161 - 163	40	9.6	baixa	1.29	560	164
1,6-diclorohexano (1,6-DCH)	1.068	87-90 (15 mmHg)	73	8.8	---	2.04	6	160,163
1,3-dibromopropano (1,3-DBP)				4.3 (20 °C)				165
1,4-dibromobutano (1,4-DBB)	1.824	63-65 (6 mmHg)	110	5.7 (20 °C)	---	---	---	160,165
1,6-dibromohexano (1,6-DBH)	1.60	112-114 (11 mmHg)	113	5.0 (24 °C)	---	---	---	160,165
1,4-diiodobutano (1,4-DIB)	2.350	147-152 (26 mmHg)	----	---	---	---	---	160

NOTA: Não foi possível encontrar na bibliografia disponível valores para os parâmetros indicados por ---.

3.1.3. Determinação de constantes dieléctricas e de relaxação dieléctrica

Os dieléctricos (ou isoladores) são materiais em que não existem cargas livres que se possam movimentar com facilidade. Na presença de um campo eléctrico externo, este é atenuado pelo dieléctrico. Surge então um parâmetro denominado de constante dieléctrica relativa, ϵ_r que indica quantas vezes mais fraco é o campo eléctrico de um material, comparativamente ao vácuo, determinado pela relação¹⁶⁶:

$$\epsilon_r = \frac{\Delta E_{\text{vácuo}}}{\Delta E_{\text{material}}} \quad (3.1)$$

Esta atenuação do campo eléctrico deve-se à polarização induzida no material. Em sólidos ou líquidos pouco polares, as moléculas têm uma orientação aleatória, designada por movimento estocástico ou browniano. A ordem obtida nunca é perfeita, mas mesmo assim a matéria fica polarizada.

Num condensador com um dieléctrico, o campo eléctrico no seu interior fica ϵ vezes mais fraco, sendo a diferença de potencial entre as placas ϵ vezes menor. Portanto quanto maior ϵ , maior será a capacidade do condensador. Assim é possível obter uma relação entre a capacidade de um condensador plano e a constante dieléctrica relativa:

$$C = \epsilon_r C_v \quad (3.2)$$

em que C_v é a capacidade utilizando o vazio como dieléctrico e ϵ_r a constante dieléctrica relativa do meio em estudo.

Contudo, esta relação linear é válida apenas quando estamos na presença de um dieléctrico ideal. Normalmente existem perdas dieléctricas por condução e assim a constante dieléctrica relativa é um número complexo dado por:

$$\epsilon(\omega) = \epsilon'(\omega) - j\epsilon''(\omega) \quad (3.3)$$

em que a parte imaginária (ϵ'') representa as perdas relativas do meio. Calculando a corrente total no circuito ($I = I_{\text{cond}} + I_0$), em que I_{cond} representa a corrente de condução e I_0 a corrente do dieléctrico ideal, obtém-se:

$$\varepsilon' = \frac{C}{C_v} \quad (3.4)$$

$$\varepsilon'' = \frac{1}{\omega R_c C_v} \quad (3.5)$$

em que ω é a frequência e R_c a resistência de condução. Este resultado mostra que estas perdas são muito mais significativas a baixas frequências¹⁶⁷.

Na figura 3.2 encontram-se representados os circuitos equivalentes de um dieléctrico e as respectivas correntes, definidas anteriormente e I_r , a corrente associada ao processo de relaxação dieléctrica.

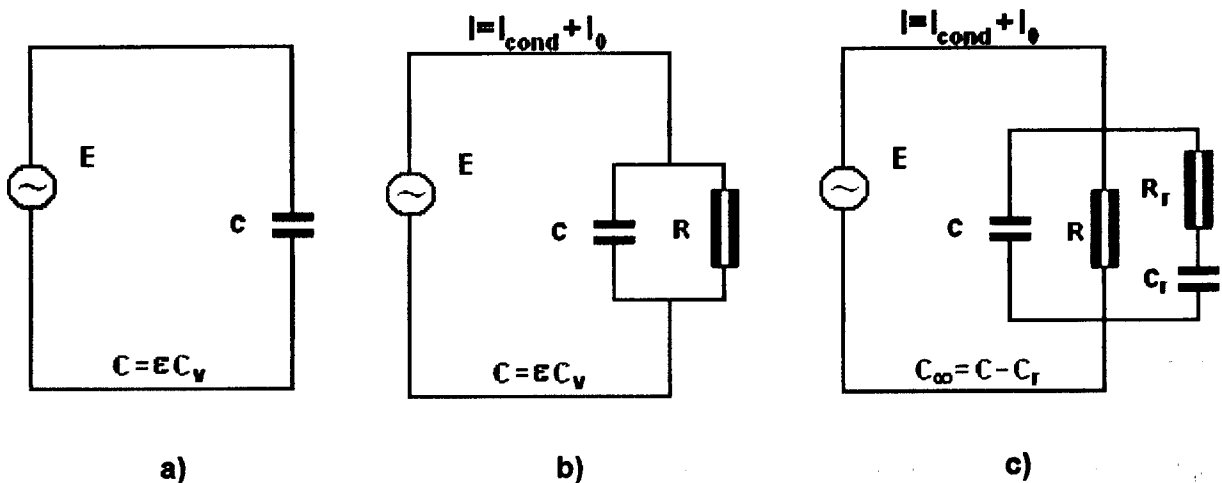


Figura 3.2. Circuitos eléctricos equivalentes de dieléctricos: a) ideal; b) com perdas por condução; c) com relaxação dieléctrica.

Contudo, os dipolos eléctricos do dieléctrico apresentam uma relaxação dieléctrica que advém da variação da polarização induzida pela aplicação do campo eléctrico. A variação destes parâmetros com a frequência encontra-se representada de forma genérica na figura 3.3¹⁶⁸:

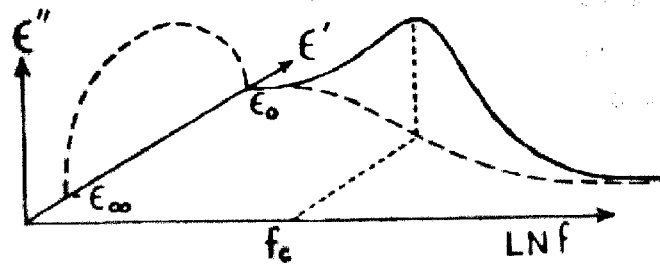


Figura 3.3. Variação dos parâmetros ϵ' e ϵ'' com o logaritmo da frequência.

Analisando a curva da figura é possível verificar que a variação de ϵ' com o logaritmo da frequência dá origem a uma curva de dispersão sigmoide, enquanto que a representação de $\epsilon'' = f(\ln f)$ origina uma curva de absorção parabólica. No entanto, a projecção de $\epsilon'' = f(\epsilon')$, conhecida por diagrama de Cole-Cole¹⁶⁹, dá origem a uma representação em semicírculo, prevista para os processos de relaxação simples, descritos pela teoria de Debye. É característico dos dielétricos, para estes processos de relaxação simples, prever uma mudança da velocidade de polarização, proporcional à diferença de polarização do valor de equilíbrio. Nestes casos a constante dielétrica pode ser expressa pela conhecida equação de Debye:

$$\epsilon = \epsilon_{\infty} + \frac{\Delta\epsilon}{1 + j\omega\tau_r} \quad (3.6)$$

em que $\Delta\epsilon = \epsilon_0 - \epsilon_{\infty}$ e τ_r é o tempo de relaxação dielétrica.

É então possível escrever a equação para a constante dielétrica, associando as contribuições das equações 3.4, 3.5 e 3.6:

$$\epsilon = \epsilon_{\infty} + \frac{\Delta\epsilon}{1 + j\omega\tau_r} + \frac{1}{j\omega\tau_c} \quad (3.7)$$

em que $\tau_c = C_v R$ é o tempo de condução dielétrica. A contribuição para a constante dielétrica para baixas frequências está associada à condução dielétrica enquanto que a contribuição para altas frequências é devida predominantemente ao processo de relaxação dielétrica.

No entanto, os processos de relaxação dielétrica podem apresentar uma dispersão do tempo de relaxação, contrariamente ao previsto pela teoria de Debye. É então possível

observar, à mesma temperatura, vários modos de relaxação que contribuem para a constante dielétrica. Considerando que estes modos são independentes, a equação 3.7 pode ser reescrita como:

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_{\infty} + \sum_{i=1}^n \frac{\Delta\varepsilon_i}{1 + (j\omega\tau_i)^{\beta_i}} + \frac{1}{(j\omega\tau_c)^{\lambda}} \quad (3.8)$$

em que n é o número de modos de relaxação independentes, β_i o parâmetro polidispersivo do sistema e λ um parâmetro que mede a dispersão dos tempos τ_c .

3.1.4. Aplicação de filmes Langmuir-Blodgett de politiofenos substituídos em biossensores

Como referido no capítulo 2 uma das limitações na preparação de biossensores relaciona-se com a dificuldade em realizar uma imobilização estável das biomoléculas, não só para uma maior eficiência da reacção catalítica, mas sobretudo para o aumento da durabilidade e reprodutibilidade do sistema. Os procedimentos, normalmente utilizados na imobilização de enzimas envolvem diferentes métodos como o encapsulamento, ligação covalente e "crosslinking", embora introduzam melhorias significativas na reprodutibilidade do biossensor ainda não conseguem suprimir a problemática da diminuição de actividade das enzimas. Mesmo quando existe a possibilidade de adsorver a enzima na superfície do biossensor, método utilizado no desenvolvimento deste biossensor, a distribuição da enzima na superfície é muito variável, assim como o seu rearranjo espacial, pelo que as dificuldades em melhorar a reprodutibilidade e durabilidade na utilização da enzima se mantêm.

Embora seja bastante conhecida a utilização de politiofenos como método de imobilização de polímeros condutores, estes polímeros ambientalmente estáveis e com uma forte conjugação π , não são facilmente solúveis em solventes orgânicos. Todavia, a recente síntese de politiofenos substituídos tem introduzido melhorias significativas na solubilidade e fusibilidade¹⁷⁰, resultante da entrada das cadeias carbonadas no esqueleto dos politiofenos, tornando-os uma excelente escolha, em diversas aplicações como o campo dos transístores de efeito de campo, transístores micro-electroquímicos, LED's e

sensores, devido à sua fácil modificação estrutural, elevada condutividade e estabilidade ambiental¹⁷¹.

A estratégia de introduzir diferentes grupos terminais nos oligotiofenos, tem sido bastante utilizada para diversificar a estrutura da molécula, refinando eficientemente as propriedades ópticas, electrónicas e electroquímicas. Assim, têm sido introduzidos diversos grupos terminais como: grupos funcionais diarilamina¹⁷², fluorenos planares¹⁷³, diarilborilos¹⁷⁴, piridilos, fenóis¹⁷⁵ e difenilfosfinas¹⁷⁶. Recentemente, uma nova família de homólogos conjugados de tiofenos foi sintetizada por Wong *et al*¹⁷⁷, através de uma reacção de ligação de Suzuki. A introdução do volumoso e rígido 9,9-difenilfluoreno, como grupo terminal de um dibromotiofeno, diminui as ligações intermoleculares e melhora a morfologia e estabilidade térmica do oligotiofeno resultante. De acordo com a cadeia do dibromotiofeno adicionado ($n=1-4$), vão-se obter os derivados 9,9-difenilfluorenos oligotiofenos, denominados por FTn ($n=1-4$). A figura 3.4 esquematiza a reacção de síntese em que A, B e C representam, respectivamente, éster bórico (obtido do tratamento do 2-bromo-9,9-difenilfluoreno com *n*-BuLi seguido do "quenching" com 2-isopropoxi-4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]-dioxoborolano), dibromooligotiofeno e FTn.

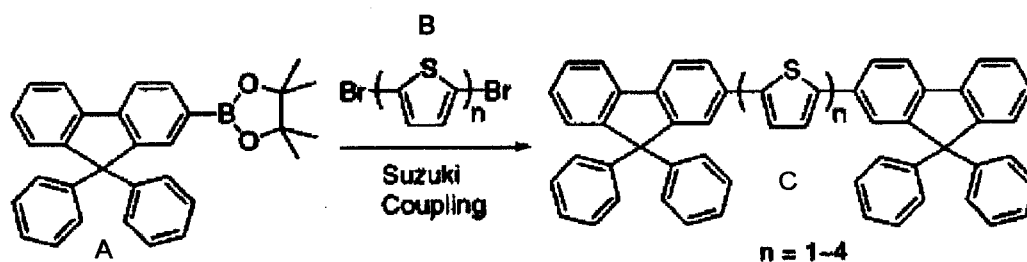


Figura 3.4. Reacção de síntese dos 9,9-difenilfluorenos-capped oligotiofenos, FTn. Em que: A - éster bórico, B - dibromooligotiofeno e C - FTn.

O recente interesse na utilização de técnicas como a técnica de Langmuir-Blodgett (LB), permitiu o desenvolvimento de filmes de monocamadas de politiofenos substituídos, cujas propriedades electroquímicas se começam agora a conhecer¹⁷⁸, conduzindo a crescentes aplicações destes filmes ultrafinos e de espessura controlada em dispositivos como interruptores electro-ópticos, moduladores, memórias e biossensores¹⁷¹. Um trabalho recente de Rikukawa¹⁷⁹, permitiu obter um elevado valor de condutividade, 100 S.cm^{-1} , para um filme de Langmuir-Blodgett de poli(3-hexiltiofeno).

A técnica de deposição de filmes por LB é reconhecida na preparação das referidas monocamadas, com estruturas bem definidas permitindo o empacotamento e ainda um elevado grau de controlo sobre as espessuras de filme. Estas condições conduzem à possibilidade de utilização de filmes de LB de politiofenos nos quais se podem imobilizar enzimas de forma altamente ordenada. Esta nova aproximação permitiu a utilização desta metodologia no desenvolvimento de novos biossensores, como descrito no trabalho de Sharma *et al*¹⁸⁰, em que é desenvolvido um biossensor para a determinação de lactose baseado em filmes de LB de poli(3-hexiltiofeno). Singhal *et al* utilizam a mesma metodologia, contudo incorporam a *glucose oxidase* nos filmes de LB, posteriormente utilizados na deposição sob a superfície do biossensor para a determinação da glucose¹⁷¹.

A técnica de Langmuir-Blodgett é a que oferece maiores possibilidades para a incorporação de biomoléculas em filmes de moléculas anfifílicas, nomeadamente de politiofenos substituídos. Nesses estudos é possível controlar a tensão superficial de um dado filme, que se relaciona com a energia de coesão entre as moléculas, durante o processo de deposição do filme. A tensão superficial de um sistema composto pelo solvente e a monocamada pode ser definida como a variação da energia livre do sistema, por unidade de área, a pressão e temperatura constantes¹⁸¹. A tensão superficial é expressa por:

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{P,T} \quad (3.9)$$

em que ∂G é a energia livre de Gibbs e A a área superficial ocupada por uma molécula.

A tensão superficial também pode ser obtida a partir da determinação da pressão superficial, Π que vem normalmente expressa em mN.m^{-1} e definida por:

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \quad (3.10)$$

em que γ_0 é a tensão superficial do solvente puro e γ é a tensão superficial do solvente com a monocamada¹⁸².

Verifica-se então que a pressão superficial corresponde à diferença entre duas tensões superficiais. Assim, a adição de uma substância anfifílica faz diminuir a tensão superficial e conseqüentemente aumentar a pressão superficial. Portanto, a utilização de solventes

polares, que possuem interacções intermoleculares mais fortes e consequentemente têm tensão superficial mais elevada, permitem a obtenção de valores de tensão superficial mais elevada. Como exemplo, a tensão superficial da água tem um valor de 73 mN.m^{-1} a 20°C .

O método do prato de Wilhelmy permite medir a força resultante da tensão superficial de uma forma rigorosa. O prato de Wilhelmy está suspenso e em contacto com a superfície da água, como representado na figura 3.5:

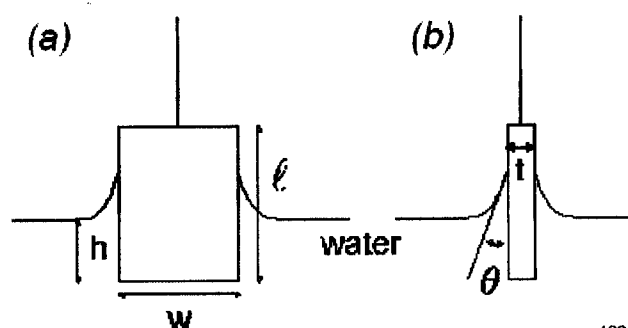


Figura 3.5. Representação esquemática do prato de Wilhelmy¹⁸³. (a) Visão frontal e (b) visão lateral.

Para um prato de dimensões l , w e t , de densidade ρ_p , imerso a uma profundidade h num líquido de densidade ρ_L , a resultante das forças do sistema (gravidade, a tensão superficial e a força de impulsão) que actuam no líquido é dada por:

$$F_R = \rho_p g l w t + 2\gamma(t + w)\cos\theta - \rho_L g h w t \quad (3.11)$$

em que θ é o ângulo de contacto e g é a aceleração da gravidade.

O método é tanto mais preciso quanto menor for a espessura do prato ($t \approx 0$). Quando o prato está completamente humedecido ($\cos\theta = 1$), a pressão superficial pode ser definida por:

$$\Pi = -\Delta\gamma = -\left[\frac{\Delta F}{2(t + w)}\right] \cong -\frac{\Delta F}{2w} \quad \text{para } t \approx 0 \quad (3.12)$$

Durante a compressão das barreiras, a velocidade e temperatura constantes, ocorre uma alteração da pressão superficial da monocamada e regista-se a isotérmica da pressão superficial Π , em função da área por molécula. Nestas isotérmicas é possível observar

zonas distintas, com declives diferentes e compressibilidades diferentes, a que correspondem estados físicos diferentes, como esquematizado na figura 3.6. Elas são o principal indicador das propriedades da monocamada de uma dada substância.

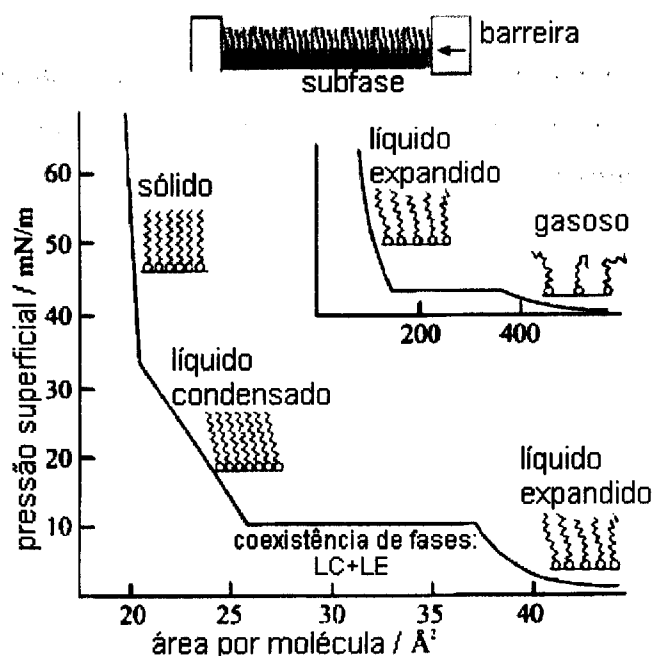


Figura 3.6. Representação de uma isotérmica genérica de uma monocamada de Langmuir-Blodgett de um ácido gordo. Adaptado da referência ¹⁸⁴.

Para classificar as fases de monocamadas é usada uma terminologia simples, em analogia com os sistemas a três dimensões. Quando a área por molécula é grande, da ordem das centenas de Å², as moléculas movem-se livremente na superfície. Nesta situação, representada no gráfico do canto superior direito da figura 3.6, considera-se que o filme está na fase gasosa, o que normalmente corresponde a uma zona em que a pressão superficial é menor que 0,1 mN.m⁻¹. Comprimindo a monocamada, a área por molécula diminui e a pressão superficial aumenta, assim esta atinge a denominada fase de líquido expandido, LE. Nesta fase considera-se que as cadeias se encontram conformacionalmente desorganizadas¹⁸⁴. Continuando com a compressão da monocamada obtém-se uma coexistência entre a fase de líquido expandido e uma outra fase, a de líquido condensado, LC. Atingida a fase de LC verifica-se que a monocamada é menos compressível que a fase de LE. Comprimindo mais um pouco observa-se uma torção da isotérmica seguida de uma diminuição da compressibilidade. Esta região de compressibilidade diferente é denominada pela fase de sólido. Nesta última fase as

moléculas estão muito próximas, com as cadeias bem orientadas e a área por molécula tende para zero.

A forma da isotérmica depende principalmente das propriedades físico-químicas do composto anfílico, da temperatura, da composição da subfase, do comprimento da cadeia de hidrocarbonetos e da magnitude de outras forças coesivas e repulsivas que existam entre a cabeça dos grupos hidrofílicos. Para cadeias maiores a atracção entre as moléculas é maior, e formam-se filmes mais compactos.

3.1.5. Caracterização de superfícies

Uma das técnicas utilizadas recentemente na caracterização de superfícies sólidas é a medição de ângulos de contacto. Estes são definidos como o ângulo formado entre a superfície de contacto sólido/líquido e uma recta tangente à superfície líquido/ar no ponto em que esta intersecta a superfície sólida. Na figura 3.7 encontra-se esquematizada a definição de ângulo de contacto.

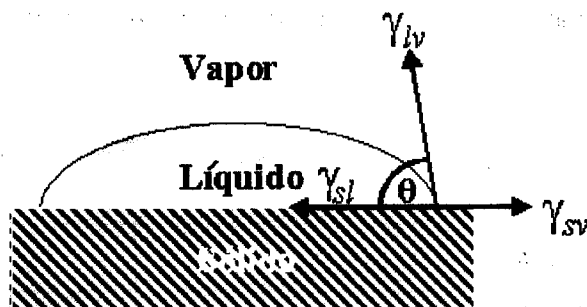


Figura 3.7. Representação esquemática do ângulo de contacto formado por uma gota numa superfície sólida.

Os ângulos de contacto reflectem a termodinâmica de interacções sólido/líquido e permitem a avaliação de certas características das superfícies como a "wettability", hidrofobicidade, adesão e tensão superficial de sólidos. Embora a determinação dos ângulos de contacto seja relativamente simples, estes apenas permitem caracterizar o comportamento "wetting" da interacção sólido/líquido. Para se determinarem outros parâmetros, como a tensão superficial, utilizam-se aproximações que correlacionam os ângulos de contacto com essa propriedade. Exemplos dessas aproximações são

referidas no artigo de Balkenende *et al*¹⁸⁵, em que se descrevem duas aproximações para prever a tensão superficial e as propriedades de “wetting” de sólidos de baixa energia.

Embora, só recentemente se tenha aplicado com maior frequência esta técnica, a sua teoria reporta a 1805, descrita pela equação de Young¹⁸⁶:

$$\gamma_{sv} - \gamma_{sl} = \gamma_{lv} \cos \theta \quad (3.13)$$

em que: θ é o ângulo de contacto e γ é a tensão interfacial em que s, v e l, representam as fases sólida, líquida e vapor, respectivamente.

Na determinação dos ângulos de contacto, existem alguns factores que é necessário considerar, pois conduzem a um considerável intervalo de valores em que o ângulo de contacto se pode encontrar. Estes relacionam-se principalmente com o historial recente da interacção, efeitos de histerese e tamanho da própria gota¹⁸⁷. Verifica-se então que, quando uma gota sofre expansão, o ângulo de contacto aproxima-se de um valor máximo denominado normalmente por ângulo de contacto de avanço (θ_a). Quando a gota se contrai, por exemplo por evaporação, o ângulo de contacto aproxima-se de um valor mínimo e este é denominado por ângulo de contacto de regresso (θ_r). A diferença entre estes dois valores quantifica o valor de histerese. A equação 3.14 dá o valor do ângulo de contacto de histerese (θ_h)¹⁸⁸:

$$\theta_h = \theta_a - \theta_r \quad (3.14)$$

O estudo do valor do ângulo de contacto de histerese é bastante utilizado para a caracterização das superfícies, dado que este está relacionado com propriedades como a heterogeneidade, rugosidade e mobilidade. De acordo com o descrito por Drelich *et al*¹⁸⁹ é necessário determinar o valor do ângulo de contacto de histerese, relativamente à variação do tamanho da gota, sempre que se utilizarem técnicas de adição ou remoção directa de líquidos. Esta relação entre o tamanho e a histerese da gota é conhecida à bastante tempo através do trabalho desenvolvido por Mack, em 1936, em que foram observados vários ângulos de contacto, para diferentes volumes de gotas de água, numa superfície de casca de maçã polida¹⁹⁰.

Estudos realizados por Drelich *et al*¹⁹¹, permitiram demonstrar que a análise da relação entre o ângulo de contacto e o tamanho da gota conduzem à obtenção de informação

adicional relativamente à qualidade e estabilidade das superfícies moleculares. Eles verificaram também que o efeito do tamanho da gota produz diferentes efeitos nos ângulos de contacto de avanço e recuo, introduzindo maiores variações nestes últimos.

Embora o estudo dos mecanismos que influenciam a variação do ângulo de contacto com a variação do tamanho da gota esteja incompleto, é actualmente aceite que alguns sistemas de três fases podem ser descritos pela equação modificada de Young, que engloba esta contribuição, e que inclui um novo termo, denominado de termo de tensão de linha, γ_{slv} . Assim:

$$\gamma_{lv} \cos \theta = \gamma_{sv} - \gamma_{sl} - \frac{\gamma_{slv}}{r} \quad (3.15)$$

em que: r é o raio da base da gota.

Esta equação prevê uma correlação linear entre o $\cos \theta$ e o inverso do raio, conduzindo à equação 3.16:

$$\cos \theta = \cos \theta_{\infty} - \frac{\gamma_{slv}}{\gamma_{lv} r} \quad (3.16)$$

em que: $\theta = \theta_{\infty}$ para $r \rightarrow \infty$

Estas equações apenas se aplicam a sistemas de três fases, com superfícies sólidas homogéneas, rígidas e estáveis.

Como referido anteriormente, o ângulo de contacto permite também dimensionar o valor da "wettability". Um líquido espalha-se completamente por uma superfície sólida se $\theta = 0$. Neste caso verifica-se que não existem quaisquer interações do líquido com a superfície. Neste contexto adopta-se a definição operacional de "wettability", introduzida por Bain *et al*¹⁹², como a gota de forma irregular cujo ângulo de contacto é inferior a 10°.

A "wettability" de um material sólido pode então ser descrita pela sua tensão superficial crítica γ_c , ou seja, a tensão superficial máxima γ_{LV} de um líquido que vai molhar a superfície do sólido. O valor de γ_c pode ser determinado representando $\cos \theta = f(\gamma_{LV})$ para uma série de líquidos homólogos, denominada de representação de Zisman e extrapolando para $\cos \theta = 1$. A tensão superficial crítica é influenciada pela rugosidade da superfície e permite então correlacionar entre a "wettability" e a constituição dos substratos¹⁹².

3.2 Procedimento experimental

3.2.1. Material e Reagentes

Tabela 3.2. Materiais e reagentes utilizados

Material	Reagentes
- Funil de extracção	- Água Ultra Pura Millipore
- Erlenmeyer com tampa vidro	- 1,3-Dicloropropano (1,3-DCP), 97%, Merck
- Balões volumétricos	- 1,3-Dibromopropano (1,3-DBP), 98,5%, BDH
- Funil	- 1,4-Diclorobutano (1,4-DCB), 97%, Merck
- Gobelés	- 1,4- Dibromobutano (1,4-DBB), 98%, BDH
- Pipetas de Pasteur	- 1,4-Diiodobutano (1,4-DIB), 99%, Aldrich
- Suporte com garras	- 1,6-Dibromohexano (1,6-DBH), 97%, Fluka
- Papel de filtro	- 1,6-Diclorohexano (1,6-DCH), 98%, Aldrich
- Tubo de vidro diâmetro de 5mm	- Alumino-silicato de sódio cristalino ("Molsiv" Molecular sieve, pore diameter 4Å)
- Parafilme®	- Tetraidrofurano (THF), 99,5%, Merck
- Craveira FIMEC – Métrica	- Clorofórmio, 99,8%, Riedel-de Haën
- Analisador de Resposta de Frequências (ARF), SI 1250 – Solartron Instrum.	- Metanol, 99,5%, Riedel-de Haën
- Tina KSV Minitrough	- Hexano, 99,5%, Fluka
- Termostatizador Jolabo	- 2-heptanona, 98%, Aldrich
- Seringa Hamilton 50 µl	- Brometo de tetraheptilamónio (THpABr), 98%, Aldrich
- Carril de suporte	- Brometo de tetradodecilamónio (TDABr), 99%, Fluka
- Fonte iluminação Weso 88	- Cloreto de bis(tetrapentilfenil)amónio (BTPPACl), 97%, Aldrich
- Difusor de papel vegetal Gravarro	- Tetraquis(4-clorofenil)borato de potássio (KTPBCl), 98%, Fluka
- Microscópio Olympus SZH Stereo Zoom Research	- Policloreto de vinilo (PVC), elevado peso molecular, Sigma
- Câmara Filmar Panasonic wv-BL200	- Nitrato de potássio (KNO ₃), 99%, M&B
- Monitor	- Iodeto de sódio (NaI),
- PC	- 9,9-difenilfluoreno oligotiofenos (FT3)
- Software Óptimas v4.01	
- Suporte Amostras	
- Poliéster	
- Tubo de vidro	
- Células de vidro KSRP-25/A307N1NSS,	

E.H.C. Co., Ltd.	- Papel alumínio
- Ponte de capacidade, LCR 4284A, Agilent	- Laca de prata
- Controlador de temperatura, DRC- 93CA, Lake Shore	
- Multímetro digital, 7150 Plus, Schlumberger	

3.2.2. Purificação do 1,6-diclorohexano (1,6-DCH)

Utilizando o 1,6-DCH tal como este provém do fornecedor verificam-se irregularidades nos voltamogramas da linha de base e restantes. No trabalho pioneiro de Katano¹⁴⁸, em que se caracteriza a interface 1,6-DCH|água através da voltametria cíclica, é mencionada a purificação deste solvente antes da sua utilização. Todavia, o procedimento indicado, provoca uma alteração da tonalidade do solvente, após a adição de ácido sulfúrico concentrado, de transparente para um amarelo carregado e posteriormente para uma tonalidade similar ao leite, após adição de uma solução de hidróxido de sódio concentrada. Este facto sugere a formação de enxofre, como resultado da purificação com o ácido sulfúrico concentrado, alterando a composição do solvente de forma irreversível. Após algumas tentativas, verificou-se que a purificação adequada (como o demonstra a figura 3.8) do solvente deverá seguir o procedimento descrito:

- Preparam-se duas soluções, de ácido clorídrico e hidróxido de sódio, a 0.1M. De seguida, adiciona-se para um funil de extracção o volume de 1,6-DCH a purificar. Adiciona-se então, igual volume de solução de ácido clorídrico, agita-se vigorosamente o balão e deixa-se a repousar. Após separação das fases verifica-se uma cor branca por parte do solvente orgânico.

- Extraí-se o 1,6-DCH e volta-se a colocar o solvente no interior do balão. Adiciona-se um volume igual de solução de hidróxido de sódio, para neutralizar. Volta-se a agitar vigorosamente e deixa-se a solução estabilizar para a separação das fases.

- Extraí-se novamente o 1,6-DCH e adiciona-se igual volume de água Millipore, para lavagem final. Agita-se vigorosamente e deixa-se repousar.

- Retira-se então o 1,6-DCH para um erlenmeyer fechado e adiciona-se alumino-silicato de sódio cristalino para remoção das partículas de água, existentes no seio do solvente orgânico e deixa-se a repousar por uma horas. Finalmente filtra-se o solvente para um balão e este é utilizado nas várias determinações.

- Aplica-se este mesmo procedimento ao 1,4-diclorobutano (1,4-DCB) e ao 1,6-dibromohexano (1,6-DBH).

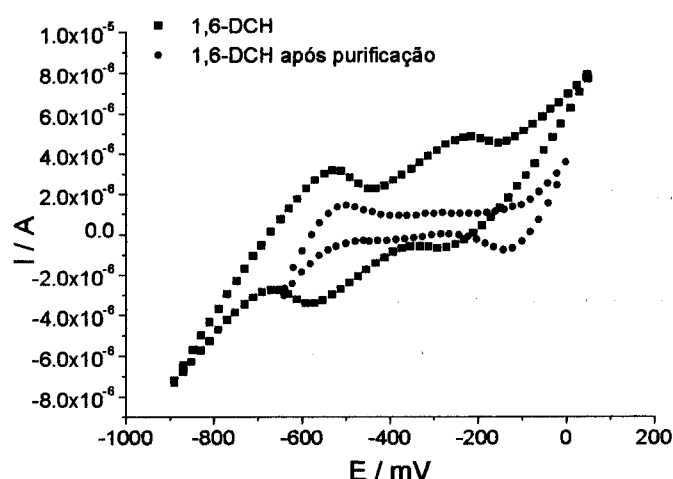


Figura 3.8. Voltamogramas cíclicos, utilizando como solvente o 1,6-DCH, antes e após a purificação. Utilizou-se uma macrointerface, descrita pela célula electroquímica II (ver cap. 2).

Todas as determinações realizadas pela utilização de 1,6-DCH, tanto nas interfaces líquido-líquido como nas interfaces líquido-gel, referem-se à utilização de 1,6-DCH purificado.

3.2.3. Preparação de géis orgânicos

3.2.3.1. Policloreto de vinilo – PVC

Na preparação deste tipo de organogéis utiliza-se o PVC com elevado peso molecular, de elevado grau de pureza, para que os géis apresentem características de transparência, consistência e relativa rigidez (gelatinosa), facilitando o manuseamento experimental. Aplica-se o procedimento descrito por Samec *et al*¹⁴⁹, contudo realizam-se algumas

alterações relativamente às percentagens utilizadas, dado que, de acordo com o descrito não se conseguiu obter nenhum resultado positivo. Após várias tentativas de optimização, descritas detalhadamente no ponto 3.3.1., obteve-se o seguinte procedimento:

- Pesa-se a massa correspondente à percentagem em massa adequada ao solvente a utilizar, de acordo com as tabelas 3.3 e 3.4, e coloca-se num gobelé tentando espalhar o composto ao máximo. Este passo é bastante importante para facilitar a dissolução do mesmo.

- Seguidamente, adiciona-se THF utilizando uma pipeta de Pasteur, agitando simultaneamente com uma vareta de vidro até perfazer o volume mínimo suficiente para dissolver bem todo o PVC.

- Finalmente adiciona-se à mistura o volume calculado de solvente orgânico e agita-se até uniformizar completamente a solução. Deixa-se evaporar o THF sob arejamento na hotte. Notar que para volumes de gel superiores aos utilizados, a área da base do gobelé deve ser também proporcional, para que seja possível dissolver bem o PVC.

3.2.3.2. 1,3:2,4-dibenzilideno sorbitol – DBS

A utilização deste agente gelificante na gelificação do solvente orgânico o-NPOE é frequente em vários estudos realizados neste grupo de investigação, pelo que todo o seu procedimento se encontra bem optimizado e descrito⁶¹. Verifica-se no entanto que a aplicação desse procedimento aos solventes orgânicos estudados, não se traduz em resultados favoráveis à formação do organogel. Também a utilização do procedimento descrito acima não se revelou eficaz pela dificuldade de dissolução do DBS. Realizaram-se então testes de solubilidade do DBS em vários solventes de volatilidade elevada para permitir a sua posterior evaporação, tais como: THF, etanol, metanol, clorofórmio, acetona, 2-heptanona e hexano. Verificou-se que o único que dissolvia pequenas quantidades de DBS, mas apenas com uma demorada agitação era a acetona. Assim, após várias tentativas de optimização das quantidades de DBS, obteve-se o seguinte procedimento:

- Pesa-se a massa correspondente à percentagem em massa adequada ao solvente a utilizar, de acordo com a tabela 3.4 e coloca-se num gobelé.
- Dissolve-se de seguida o DBS, utilizando o menor volume de acetona possível e agitando constantemente. Esta dissolução é um pouco demorada e é importante esmagar com a vareta de vidro alguns flocos que se formem para permitir a dissolução completa.
- Finalmente adiciona-se à mistura o volume calculado de solvente orgânico e agita-se até uniformizar completamente a solução. Deixa-se evaporar a acetona sob arejamento na hotte. A evaporação da acetona arrasta o gel pelas paredes do gobelé, pelo que, é necessário aquecer o gobelé até fusão do gel, uniformizando-o.

3.2.4. Preparação de sais orgânicos lipofílicos

Para a preparação dos restantes sais lipofílicos aplicou-se inicialmente o procedimento utilizado na síntese do TOATPB, como indicado no ponto 1.3.3., todavia este procedimento apenas resultou na síntese do tetrafenilborato de tetraheptilamónio (THpATPB) não sendo aplicável aos restantes sais sintetizados. A bibliografia refere um outro procedimento de síntese, descrito em pormenor no trabalho de Ammann *et al*¹⁹³ no qual são sintetizados vários sais hidrofóbicos, utilizados como aditivos na preparação de membranas poliméricas de o-NPOE em PVC. De acordo com o descrito foram sintetizados sais hidrofóbicos como o tetrafenilborato de tetradodecilamónio (TDATPB), tetraquis(p-clorofenil)borato de tetradodecilamónio (TDATPBCI) e tetraquis(p-clorofenil)borato de bis(tetrapentilfenil)amónio (BTPPATPBCI) com base no seguinte procedimento:

- Devido à solubilidade do KTPBCI em fase aquosa ser de aproximadamente 1 mM, pesa-se a massa correspondente a esta concentração e dissolve-se em água. Prepara-se uma solução de igual concentração do catião amónio em clorofórmio. Para os sais de NaTPB foi possível utilizar concentrações mais elevadas.
- Misturam-se estas duas soluções num funil de extracção e agita-se vigorosamente. Deixa-se separar as fases e remove-se a fase orgânica para uma placa de Petri. Deixa-

se evaporar o clorofórmio por arejamento, pois foram realizadas outras metodologias, como a utilização do evaporador rotativo, mas não se revelaram adequadas.

- Finalmente, dissolve-se o sal amorfo com acetona e deixa-se evaporar para que se formem os cristais por recristalização (este passo não foi utilizado no procedimento de Ammann¹⁹³).

Não foi possível realizar a síntese do tetrafenilborato de bis(tetrapentilfenil)amónio (BTPPATPB), porque nenhum dos procedimentos utilizados se revelou adequado à sua preparação e não se encontrou na bibliografia qualquer referência à sua síntese.

Na figura 3.9 realiza-se a caracterização dos diferentes sais lipofílicos pela determinação dos respectivos voltamogramas cíclicos. A diferenciação é fácil de se fazer pelas diferenças no intervalo de polarização que corresponde a um maior carácter hidrofóbico do sal.

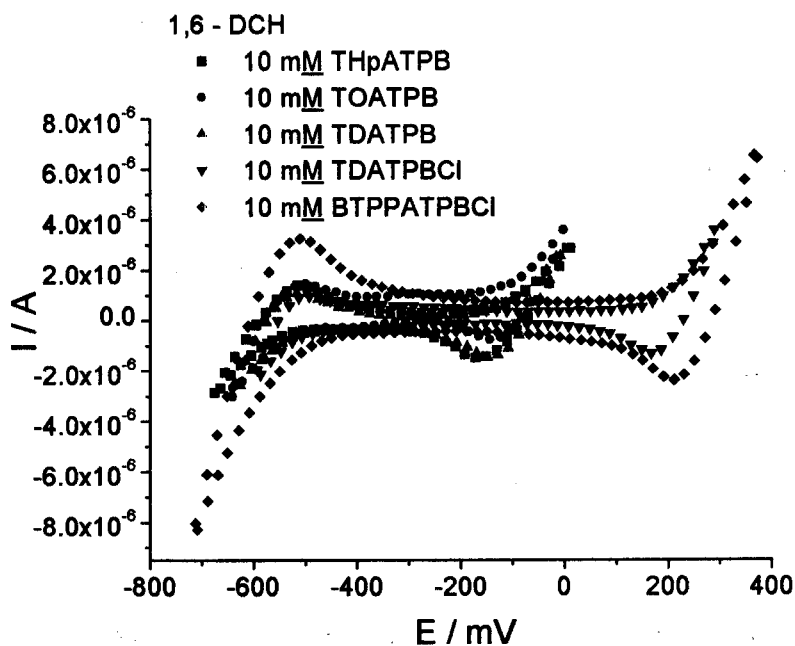


Figura 3.9. Voltamogramas cíclicos para a utilização de vários sais lipofílicos na fase orgânica, de acordo com o representado nas células electroquímicas IV e V.

3.2.5. Determinação das curvas de capacidade

3.2.5.1. Interface Líquido-Líquido

Os valores da capacidade da dupla camada foram obtidos pelo ajuste de um circuito equivalente do tipo R(CW), representado esquematicamente na figura 3.10, ao diagrama de Nyquist obtido nas determinações de impedância, realizadas de acordo com o representado nas várias células electroquímicas da figura 3.11 e cujo procedimento se encontra descrito em 2.2.1 e 2.2.2.

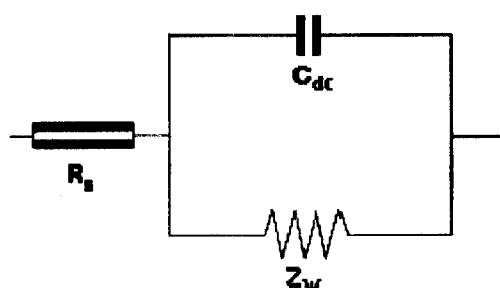
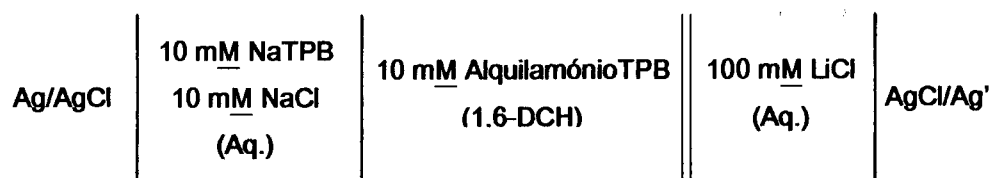


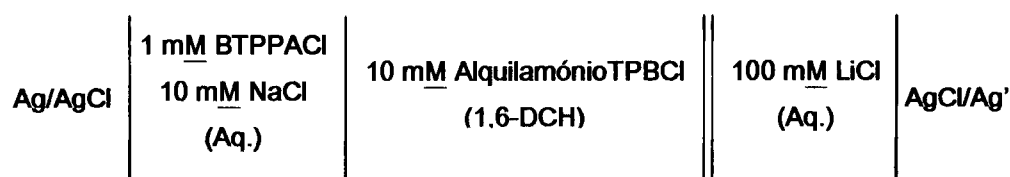
Figura 3.10. Circuito equivalente utilizado no ajuste da célula electroquímica IV: R(CW)).

Na figura 3.11 encontram-se representadas esquematicamente as várias células electroquímicas utilizadas na determinação das capacidades interfaciais em interfaces líquido-líquido em células de 4 eléctrodos. Embora o solvente orgânico utilizado seja comum a todas as células, as diferenças devem-se aos sais hidrofóbicos da fase orgânica e ao electrólito da fase aquosa.

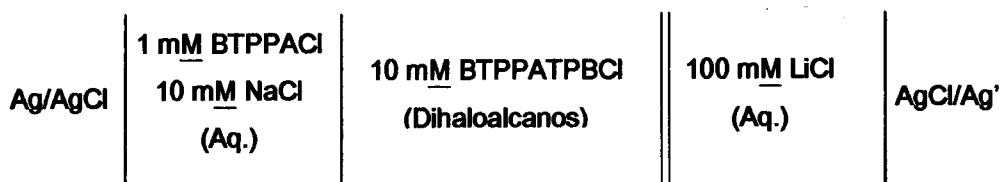
Célula electroquímica IV



Célula electroquímica V



Célula electroquímica VI



Célula electroquímica VII

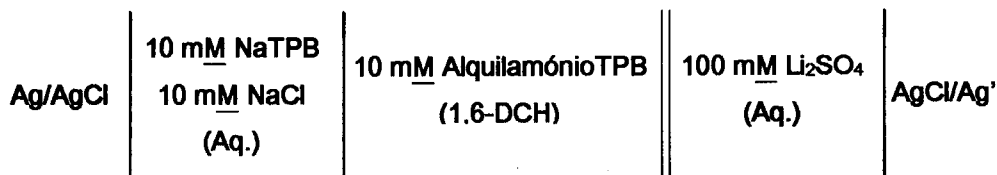


Figura 3.11. Representação das células electroquímicas utilizadas na determinação das curvas de capacidade em macrointerfaces líquido-líquido.

3.2.5.2. Interface Gel-Líquido

A montagem para a determinação das impedâncias dos géis orgânicos utilizando a célula de vidro, representada na figura 3.12, requer um procedimento diferente não só pela diferente geometria mas também pela utilização de fases gelificadas. Assim, optimizou-se o seguinte procedimento:

- Funde-se o gel orgânico de referência, a cerca de 90 °C, e com a ajuda de uma seringa preenche-se o capilar de Luggin com o gel, até que se forme uma superfície concava na ponta deste, sem que ocorra a formação de bolhas de ar, coloca-se o eléctrodo de Ag/AgCl e deixa-se secar.
- Coloca-se de seguida, na extremidade oposta, uma rolha contendo o eléctrodo de platina da fase aquosa de forma estanque. Adiciona-se pela parte superior a fase aquosa até que esta atinja a interface, sem a ultrapassar, preenchendo o também o outro capilar de Luggin.
- Coloca-se solução aquosa na parte amovível, une-se esta à célula de vidro de modo a que não se formem bolhas de ar e ajusta-se o nível global da fase aquosa.

- Finalmente, funde-se o gel orgânico e este é colocado sobre a interface, ajustando a fase aquosa pela parte amovível de modo a manter o nível do gel na interface. Adiciona-se mais gel orgânico até que este recubra o capilar de Luggin contendo o gel orgânico de referência e coloca-se um eléctrodo de platina.

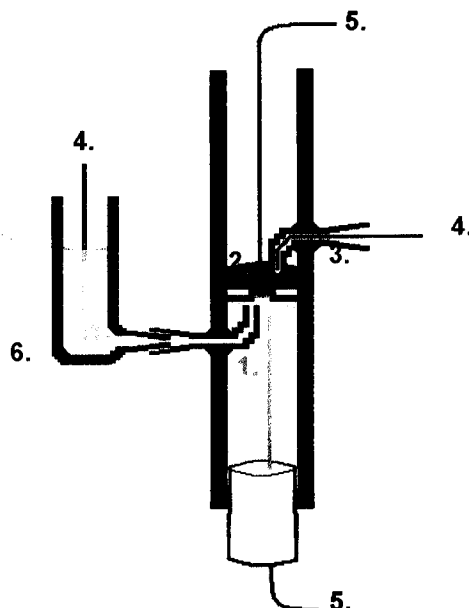


Figura 3.12. Representação da célula de vidro utilizada na determinação das curvas de capacidade dos géis orgânicos. Célula com as respectivas fases: 1. Fase aquosa; 2. Gel orgânico; 3. Gel orgânico de referência; 4. Eléctrodos de Ag/AgCl; 5. Eléctrodos de platina; 6. Parte amovível.

Na figura 3.13 encontra-se representada a célula electroquímica utilizada para a determinação das curvas de capacidade interfacial de vários géis orgânicos constituídos por diferentes sais hidrofóbicos e solventes orgânicos, descritos pela célula electroquímica VIII.

Célula electroquímica VIII

Pt	Ag/AgCl	10 mM NaTPB	10 mM TOATPB	100 mM LiCl (Aq.)	AgCl/Ag	Pt'
		ou	ou			
		1 mM BTPPACl	10 mM BTPPATPBCl			
		10 mM NaCl agar 2%	X % DBS (dihaloalcano)			

Figura 3.13. Representação da célula electroquímica utilizada na determinação das impedâncias dos géis orgânicos.

3.2.6. Determinação da resistência dos géis orgânicos

- Após preparação dos géis, como descrito em 3.2.3, estes são aquecidos até liquidificarem completamente. Retira-se uma porção para um tubo de vidro de 5 mm de diâmetro, em que umas das extremidades está tapada com Parafilme® e deixa-se a repousar umas horas.
- Preparam-se dois eléctrodos de prata, constituídos por uma folha de prata quadrada de 2.5 cm^2 unida a um cabo de cobre. Seguidamente prepara-se uma célula, como representada na figura 3.14, constituída por um tubo de borracha seccionado, de secção interior idêntica à secção do tubo de vidro que contém o gel, com cortes cujas distâncias entre si foram previamente determinadas pela utilização de uma craveira, nomeadamente 1.0, 0.6, 0.4 e 0.2 cm.
- Desliza-se o gel pelo interior do tubo até à célula, colocam-se os eléctrodos nos cortes mais afastados entre si e remove-se o excedente de gel da zona exterior dos eléctrodos.
- Ligam-se os eléctrodos ao ARF, nomeadamente CE/RE1 e ET/RE2, e realiza-se um varrimento de frequências entre 1 e 200 Hz, a um potencial dc de 0 V, para cada comprimento de organogel.

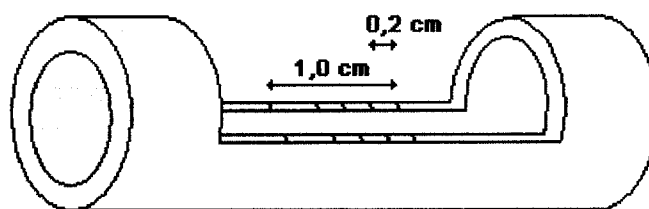


Figura 3.14. Célula utilizada na determinação de resistências de géis.

3.2.7. Técnicas

3.2.7.1. Langmuir-Blodgett (LB)

Utiliza-se na preparação dos filmes de monocamadas pela técnica de LB a denominada balança de Langmuir, constituída por uma tina (onde se coloca a subfase), duas barreiras simétricas revestidas por material inerte e hidrofóbico idêntico ao da tina (neste caso

Teflon[®]), e um prato de Wilhelmy, de platina, que se encontra mergulhado em etanol quando não está a ser utilizado, de dimensões 19.6x10.0 mm. Na figura 3.15 encontram-se esquematizados os vários constituintes da balança de Langmuir:

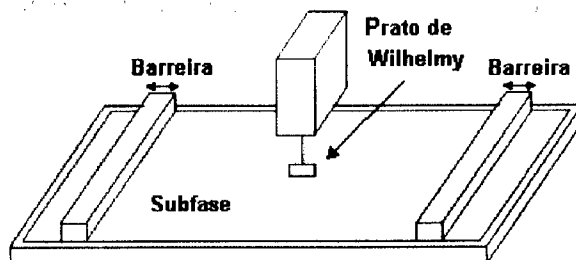


Figura 3.15. Representação esquemática da balança de Langmuir.

Na preparação dos filmes de monocamadas realizou-se o procedimento descrito:

- Após lavagem da tina com etanol e água, esta é colocada na montagem, como indica a figura 3.16, e ligam-se os tubos para a circulação da água do banho termostatizado que percorrem todo o seu interior.
- Após verificação de todos os encaixes, enche-se a tina com a subfase, neste caso água ultrapura e coloca-se o prato de Wilhelmy no encaixe, previamente lavado com água, e acciona-se o banho termostatizado. Deixa-se estabilizar a temperatura, isto é, até que a pressão superficial não varie, o que pode demorar até cerca de uma hora.
- Verifica-se se a tina está limpa. Para isso, fecham-se as barreiras a 100% da velocidade e não se pode observar uma variação da pressão superficial superior a 0.10 mN.m^{-1} , para se considerar a subfase limpa.
- Prepara-se uma solução de FT3 em clorofórmio, pesa-se a massa de GOx pretendida para um frasco vedante e adiciona-se o volume da solução de FT3 necessário. Espalha-se o volume necessário à formação da monocamada, em ambos os lados da tina, utilizando uma micro-seringa.
- Deixa-se o clorofórmio evaporar, cerca de 20 minutos e determina-se a respectiva isotérmica.

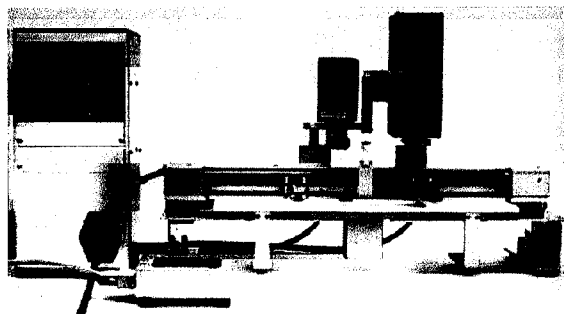


Figura 3.16. Imagem do sistema utilizado (KSV Minitrough) no estudo dos filmes de monocamadas de 9,9-Difenilfluorenos-capped oligotiofenos FT3 de Langmuir-Blodgett¹⁹⁴.

3.2.7.2 Goniometria

Existem várias aproximações para a determinação de ângulos de contacto de sólidos não porosos, como a goniometria ou a tensiometria. A goniometria baseia-se na análise da curvatura da gota situada sob a superfície sólida, ao passo que a tensiometria envolve a medição das forças de interacção da superfície sólida com o líquido. Assim, irradiando a amostra com um feixe de luz difusa, produz-se uma imagem da gota, com contornos nítidos. Esta imagem é projectada no microscópio e a câmara de vídeo acoplada reproduz a imagem sobre um monitor a preto e branco. Finalmente esta é tratada com software específico e obtém-se uma representação gráfica da curvatura da gota. A partir da curvatura da gota é possível inferir as características que definem a superfície sob a qual a gota está em contacto.

Neste trabalho utilizou-se um goniómetro óptico para a determinação dos ângulos de contacto. Basicamente, este é constituído por uma fonte luminosa, um suporte difusor da luz, um suporte da amostra, um microscópio acoplado a uma câmara de vídeo e um monitor, como descreve a figura 3.17:

Figura 3.17. Diagrama esquemático do goniómetro óptico utilizado para a determinação dos ângulos de contacto.

Figura 3.17. Diagrama esquemático do goniómetro óptico utilizado para a determinação dos ângulos de contacto.

Figura 3.17. Diagrama esquemático do goniómetro óptico utilizado para a determinação dos ângulos de contacto.

Figura 3.17. Diagrama esquemático do goniómetro óptico utilizado para a determinação dos ângulos de contacto.

Figura 3.17. Diagrama esquemático do goniómetro óptico utilizado para a determinação dos ângulos de contacto.



Figura 3.17. Imagem da montagem utilizada na determinação de ângulos de contacto: 1. Fonte luminosa; 2. Suporte difusor da luz; 3. Suporte de amostras; 4. Microscópio binocular; 5. Câmara de filmar acoplada; 6. Monitor com imagem da gota.

Para a determinação das curvaturas das gotas realizam-se previamente alguns procedimentos, como se descreve a seguir:

Calibração

- Numa primeira fase ajusta-se a direcção do feixe de luz de forma a incidir em uma das lentes binoculares do microscópio. De seguida, coloca-se um suporte de calibração, cujas dimensões se determinaram utilizando uma craveira (largura = 4.95 ± 0.05 e comprimento = 4.95 ± 0.05) e comparam-se estas com os valores resultantes da análise da imagem.
- Após obtenção de valores próximos é realizada uma calibração utilizando o software para que a razão entre a altura e o comprimento seja inferior a 2%.

Colocação da gota

- Realizada a calibração substitui-se o suporte de calibração pelo suporte de amostras. A altura deste é ajustada de forma a coincidir com o limite superior da imagem. Coloca-se a superfície sólida a analisar no suporte e de seguida uma gota do líquido, sendo então

possível iniciar as medições de determinação da curvatura da gota. Verificou-se que, experimentalmente, o volume da gota não deverá ser inferior a 10 μl .

- Os ângulos de contacto de avanço do volume da gota obtêm-se pela adição directa de líquido, utilizando uma micropipeta. Para os ângulos de regresso é retirado o volume de líquido de gota suficiente para perfazer o volume desejado.

3.2.7.3. Determinação dos parâmetros associados às propriedades dieléctricas

Para a determinação dos valores das propriedades dieléctricas prepara-se uma célula de vidro constituída por duas placas de vidro separadas por uma distância de 25 μm , contendo no seio uma superfície quadrada de óxido de índio e estanho (ITO) de 4 mm^2 de área, no interior da qual insere-se a amostra por capilaridade. Coloca-se esta célula no forno (ver figura 3.18) e realizam-se as ligações entre a célula e o forno através de tiras de alumínio, fixas nas extremidades com laca de prata.

Prepara-se a restante montagem, como se mostra na figura 3.18, e realiza-se a determinação de ϵ para uma gama de frequências entre 20 Hz e 1 MHz, sendo que a capacidade é lida no LCR METER e as temperaturas calculadas a partir da diferença de potencial de um termopar de cromel-alumel.



Figura 3.18. Montagem utilizada para a determinação dos parâmetros associados às propriedades dieléctricas.

Utiliza-se uma diferença de potencial de 0.25 V de forma a se obter um campo eléctrico o mais baixo possível, neste caso $0.01 \text{ V} \cdot \mu\text{m}^{-1}$.

O valor dos parâmetros foi obtido através do ajuste das curvas experimentais às expressões 3.23 e 3.24, utilizando a função Solver do Microsoft Excel; o procedimento informático pode ser consultado no artigo de Walsh e Diamond¹⁹⁵. Neste caso, o ajuste dos valores experimentais foi realizado utilizando a programação desenvolvida pelo Grupo Ferroeléctricos do Departamento de Física.

3.3. Análise de Resultados

3.3.1 Optimização dos géis orgânicos

A utilização da microinterface gel-líquido o-NPOE|água para o estudo de outras espécies iónicas não permitiu o acompanhamento da reacção de transferência destas espécies no respectivo intervalo de polarização. Na tentativa de tornar este sensor baseado em filmes de poliéster microperfurados mais versátil, procedeu-se ao desenvolvimento de um novo gel orgânico que apresentasse outras características passíveis de se enquadrarem neste pressuposto. Tendo por base um trabalho publicado recentemente por Samec *et al*¹⁴⁹, em que estes utilizam a voltametria para o estudo de uma reacção de transferência de carga do biopolímero heparina, através de uma interface constituída por um filme de 1,6-DCH plastificado com PVC e água, surgiu a possibilidade de se obterem géis de uma grande família de solventes orgânicos, os haloalcanos. Todavia, as percentagens de agente gelificante descritas utilizadas no procedimento descrito na literatura, não permitem o desenvolvimento de um gel orgânico de características idênticas ao obtido neste grupo de investigação e utilizado no desenvolvimento do biossensor para a determinação de glucose. De acordo com o descrito no ponto 3.2.3., procedeu-se à optimização das quantidades de cada agente gelificante necessárias à preparação dos vários géis orgânicos. Os resultados encontram-se sistematizados nas tabelas 3.3 e 3.4.

Tabela 3.3. Optimização dos géis orgânicos de 1,6-DCH.

1,6-DCH				
Gelificante	Massa /g	V _{solvente} / ml	% (m/m)	Observações
PVC	0.0215	0.5	4.0	Apresenta a forma de uma película polimérica
	0.0374	1	3.5	Aspecto límpido e de excelentes características
	0.0321	1	3.0	Aspecto gelatinoso, mas pouco consistente
	0.0267	1	2.5	Apresenta-se bastante liquefeito
DBS	0.04277	2	2.0	Apresenta flocos de gelificante
	0.01940	1	1.8	Aspecto pastoso
	0.03220	2	1.5	Aspecto irregular
	0.02558	2	1.2	Boas características, mas um pouco opaco
	0.02131	2	1.0	Aspecto límpido e de excelentes características
	0.01700	2	0.8	Apresenta-se parcialmente liquefeito

Tabela 3.4. Optimização de géis orgânicos de bromoalcanos.

1,4-DBB				
Gelificante	Massa /g	V _{solvente} / ml	% (m/m)	Observações
PVC	0.1278	2	3.5	Boa consistência, mas aspecto ligeiramente opaco
	0.1094	2	3.0	Transparente e de excelentes características
	0.0915	2	2.5	Apresenta-se parcialmente liquefeito
DBS	0.0367	1	2.0	Não se obtiveram resultados satisfatórios
	0.0330	1	1.8	
	0.0420	2	1.2	
1,6-DBH				
PVC	0.11215	2	3.5	Apresenta grânulos
	0.09600	2	3.0	Boa consistência, mas aspecto ligeiramente opaco
	0.07520	2	2.4	Transparente e de excelentes características
DBS	0.0320	1	2.0	Aspecto irregular
	0.0290	1	1.8	Apresenta grânulos
	0.0428	2	1.3	Pouco uniforme, opaco
	0.0320	2	1	Boa consistência, mas aspecto ligeiramente opaco
	0.0260	2	0.8	Transparente e de excelentes características

Foram realizados outros testes para a dissolução do DBS antes do contacto com o solvente, nomeadamente, a quente, com clorofórmio e hexano, todavia os resultados foram idênticos.

De acordo com os resultados descritos nas tabelas 3.3 e 3.4, foi possível preparar géis orgânicos de 1,6-DCH, 1,6-DBH e 1,4-DBB utilizando como agentes gelificantes tanto o PVC como o DBS, exceptuando o caso do 1,4-DBB em que apenas foi possível preparar o gel utilizando o PVC. Os valores de percentagem em massa representados a negrito representam, as quantidades de agente gelificante que permitiram a preparação com sucesso de géis orgânicos que reúnem as condições de homogeneidade, transparência e boa consistência necessárias à sua inclusão como fase orgânica em biossensores baseados em microinterfaces líquido-gel.

3.3.2. Caracterização de solventes e géis orgânicos

Como referido, as características dos géis orgânicos são marcadamente influenciadas pelo agente gelificante e, naturalmente, pelo solvente utilizado, cujas propriedades (como

a viscosidade, densidade, resistividade, permitividade relativa, etc.) vão originar diferentes respostas. Neste sentido, neste ponto serão analisados os efeitos introduzidos pelos diferentes electrólitos de ambas as fases e dos diferentes solventes orgânicos disponíveis utilizando as macrointerfaces líquido-líquido, devido à sua maior facilidade de realização experimental. Posteriormente será analisado o efeito da gelificação da fase orgânica e um estudo à resistência dos géis orgânicos em função da sua espessura.

3.3.2.1. Efeito do electrólito da fase orgânica

O electrólito de suporte assume um papel importante, não só pela formação da janela de potencial que permite a monitorização de processos de transferência iónica, mas também porque assegura a condutividade eléctrica da solução pela sua dissociação no solvente orgânico. Na figura 3.19 encontram-se representadas as curvas de capacidade interfacial, obtidas pelo ajuste dos diagramas de EIE ao circuito equivalente da figura 3.10, do tipo $R(CW)$, para vários sais orgânicos lipofílicos em 1,6-diclorohexano. As células electroquímicas IV e V da figura 3.11 representam esquematicamente os sistemas utilizados, à excepção da curva do TDPATPBCl em que se utilizou como referência da fase orgânica uma solução de 0,1 mM KTPBCl e 10 mM NaCl.

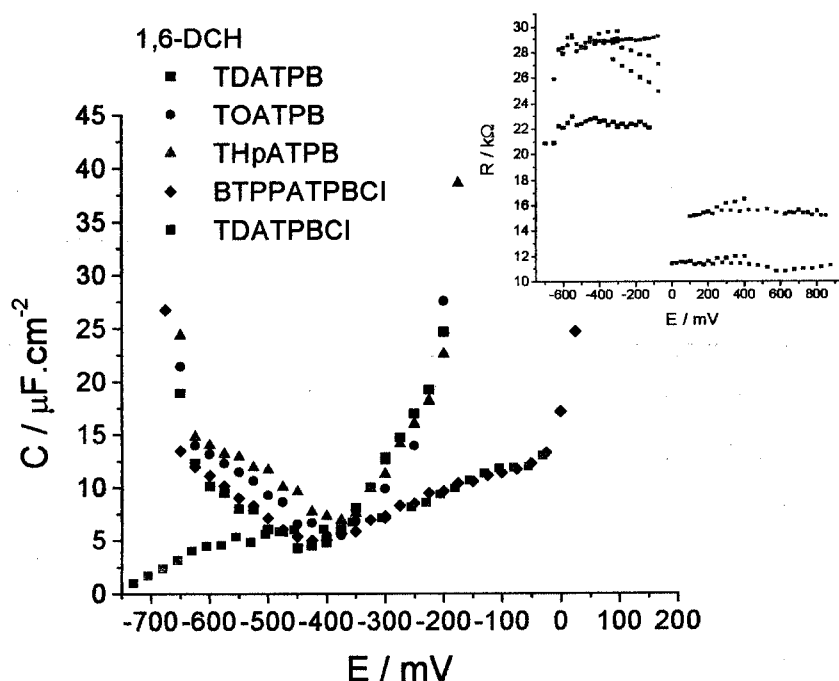


Figura 3.19. Representação dos valores obtidos para a utilização de diferentes alquilamónios como electrólitos de suporte da fase orgânica de 1,6-DCH.

Pela análise do comportamento das curvas de capacidade interfacial a potenciais mais negativos, relativos à transferência dos cátions alquilamónios, verifica-se que o valor da capacidade diminui com o aumento da cadeia carbonada do catião, na sequência: $\text{THpA}^+ < \text{TOA}^+ < \text{TDA}^+$. Analisando os valores da resistência observa-se um comportamento idêntico, o que poderá indicar uma melhor dissociação dos sais de maior massa molecular e de maior carácter hidrofóbico, à qual deveria corresponder um alargamento da janela de potencial, que neste caso poderá estar limitado pela transferência do anião da fase aquosa. O mesmo raciocínio pode ser aplicado aos restantes sais, em que o maior raio iónico e carácter hidrofóbico dos seus iões conduziram a valores inferiores de capacidade interfacial e a um aumento do intervalo de polarização. Embora no estudo do TDATPBCl a necessidade de utilização de uma outra solução orgânica de referência, contendo uma pequena concentração do ião comum (TPBCl^-), de elevada hidrofobicidade e, naturalmente, de baixa solubilidade em água, juntamente com a impossibilidade de preparação do sal de BTPPATPB, tenham condicionado a interpretação. Verifica-se, de acordo com os resultados, que o sal de BTPPATPBCl é o que apresenta a maior janela de potencial, menor resistência da solução e valores mais baixos para a capacidade interfacial, sendo o mais adequado para os estudos de transferência iónica no 1,6-diclorohexano.

3.3.2.2. Efeito do solvente orgânico

Para se avaliar o efeito introduzido por diferentes solventes, realizaram-se várias determinações em macrointerfaces líquido-líquido, representadas pela célula electroquímica VI, cujos resultados se encontram esquematizados nas figuras 3.20 e 3.21. Na primeira figura encontram-se representadas as curvas de capacidade e respectivas resistências para vários dicloroalcanos. O ajuste aos valores experimentais foi do tipo $R(\text{CW})$, excepto nas extremidades da janela de potencial onde houve a necessidade de introdução de uma resistência de transferência de carga.. Verifica-se claramente um aumento da janela de potencial com o aumento do tamanho do grupo alquilo, efeito este que também havia sido verificado no trabalho de Katano¹⁶³, acompanhado por um aumento progressivo da resistência da solução de, aproximadamente, 3, 6 e 11 k Ω , associado à crescente resistividade dos solventes, segundo a seguinte ordem: 1,2-DCE < 1,4-DCB < 1,6-DCH. Contudo, Gonzalez-Salgado *et*

*a*¹⁹⁶, verificaram no seu trabalho que no caso específico dos dihaloalcanos, várias propriedades termodinâmicas de excesso (como a energia molar de Gibbs, entalpia molar, volume e capacidade calorífica) são sensíveis a um efeito intramolecular denominado de efeito de proximidade. Embora estes resultados não permitam determinar a eventual existência desse efeito, a possibilidade de existir um relação deste com o aumento da resistividade e outras características destes solventes é um aspecto a analisar em estudos posteriores.

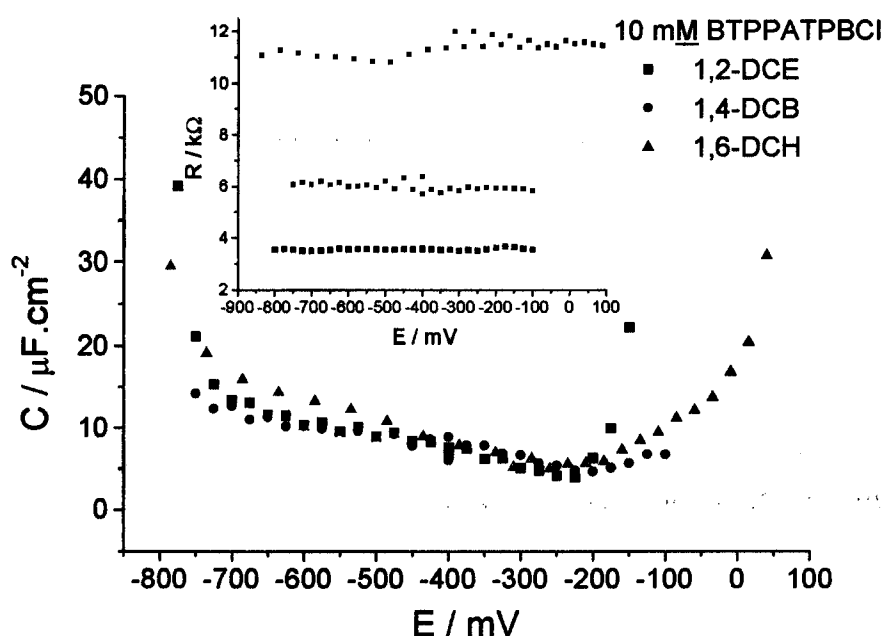


Figura 3.20. Representação de parâmetros obtidos para macrointerfaces líquido-líquido de diferentes dicloroalcanos.

Relativamente ao efeito da variação da natureza do halogéneo, retratado nos voltamogramas cíclicos da figura 3.21, sobressai de imediato o resultado obtido para o diiodobutano, pelo seu menor intervalo de polarização e deslocamento da linha de base. Embora não se tenha realizado a purificação deste solvente como descrito em 3.2.2, devido a dificuldades experimentais, a observação anterior parece também estar directamente relacionada com a sua maior resistividade, observável pela inclinação nas extremidades do voltamograma, associada à maior dificuldade de transferência do electrólito de suporte. Este aumento da resistividade relaciona-se com uma das ilações da figura, que a resistividade do solvente orgânico aumenta com o aumento da massa molecular do solvente halogenado, de acordo com a seguinte ordem: 1,4-DCB < 1,4-DBB < 1,4-DIB.

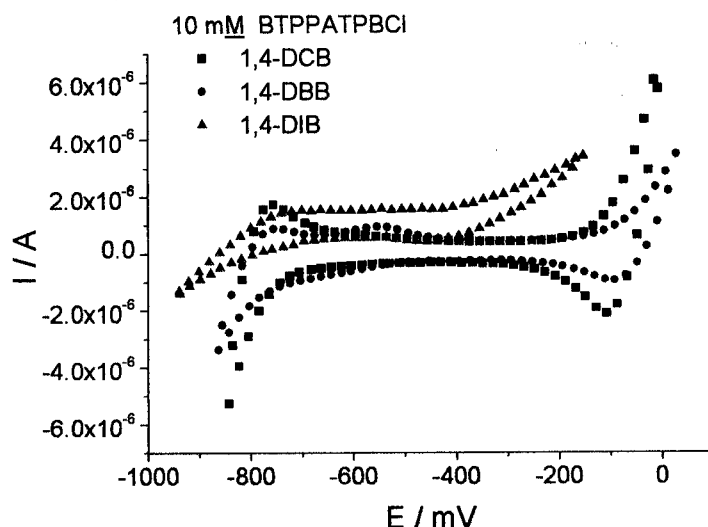


Figura 3.21. Representação dos voltamogramas cíclicos da utilização de diferentes dihalobutanos como fase orgânica.

3.3.2.3. Efeito do electrólito da fase aquosa

Estudos realizados neste grupo de investigação por Pereira *et al*¹⁹⁷ sobre o efeito do tipo e concentração dos electrólitos na capacidade interfacial da interface  gua|1,2-DCE, evidenciaram que a capacidade interfacial é controlada pelo par ião | contra ião, com a eventual formação de pares i nicos interfaciais. Observaram ainda que quando a composição electrolítica da fase orgânica era mantida constante, a capacidade diferencial aumentava segundo a ordem, $F^- < SO_4^{2-} < HO^- < ClO_4^-$, $Li^+ < K^+ < Mg^{2+} < Ba^{2+} < Sr^{2+}$ para os iões presentes na fase aquosa. Um resultado idêntico foi obtido para uma fase orgânica de 10 mM BTTPATPBCl em 1,6-DCH em que a capacidade interfacial aumentou segundo a ordem $Cl^- < SO_4^{2-}$. Contudo, os resultados obtidos para a utilização do TOATPB como electrólito de suporte da fase orgânica, não indicaram qualquer alteração da capacidade interfacial e até se encontram dissonantes dos valores de capacidade representados na figura 3.19 para as mesmas condições. Este facto parece estar directamente relacionado com a utilização de outros sais de TOATPB que haviam sido preparados anteriormente neste grupo de investigação.

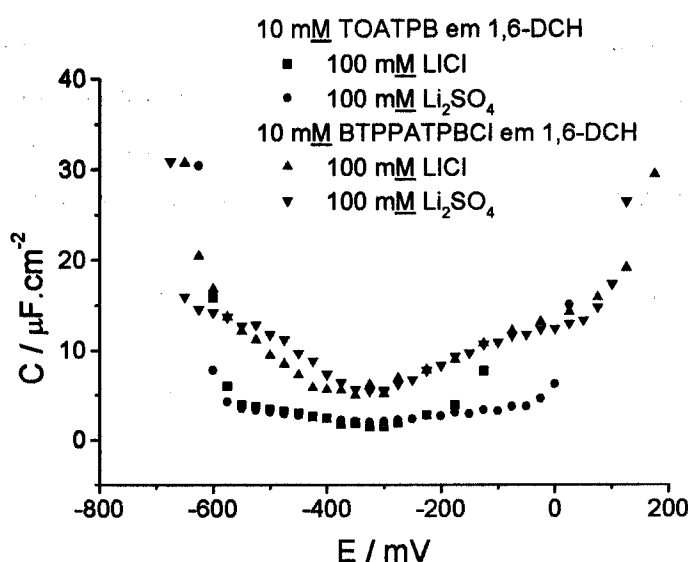


Figura 3.22. Representação dos resultados obtidos para a utilização de diferentes electrólitos na fase aquosa.

Relativamente às alterações do intervalo de polarização pela alteração do sal da fase aquosa, verifica-se que este efeito está directamente relacionado com o maior ou menor carácter hidrofóbico do sal da fase orgânica. Quando o sal que constitui a fase orgânica é o BTPPATPBCl, um sal de elevado carácter hidrofóbico, não ocorre uma alteração significativa da janela de potencial, isto porque tanto o catião BTPPA⁺ como o anião TPBCl⁻ possuem um carácter hidrofóbico superior ao carácter hidrofílico dos contra iões correspondentes da fase aquosa, SO₄²⁻ e Li⁺, respectivamente. Quando se utiliza o sal de TOATPB, devido à sua menor carácter hidrofóbico dos seus iões, verifica-se a possibilidade de alargar a janela de potencial pela utilização na fase aquosa de um sal de carácter hidrofílico correspondente superior, como o é o Li₂SO₄. Este efeito também foi verificado no estudo de Katano¹⁴⁸, em que este utilizou o sal de TOATPBCl numa fase orgânica de 1,6-DCH e alterou os sais da fase aquosa de LiCl para Li₂SO₄.

3.3.2.4. Efeito da gelificação da fase orgânica

Os problemas associados à instabilidade mecânica das interfaces líquido-líquido foram solucionados, de acordo com a resenha histórica, pela solidificação de uma das fases sob a forma de um gel ou de uma membrana. Contudo, as fases orgânicas solidificadas tornaram-se mais resistivas que os líquidos orgânicos correspondentes. Esta alteração

das propriedades da fase orgânica pode levar à alteração do próprio regime de difusão das espécies para simétrico ou assimétrico⁴⁴. Tendo como referência os resultados obtidos nas interfaces líquido-líquido, procedeu-se ao estudo das eventuais alterações devidas à gelificação dos solventes orgânicos 1,4-DBB, 1,6-DBH e 1,6-DCH, esquematizadas nas curvas de capacidade da figura 3.23. Estas foram determinadas pelo ajuste dos diagramas de EIE correspondentes, ao circuito equivalente da figura 3.10 e representadas esquematicamente pela célula electroquímica VIII, na figura 3.13. Contudo apenas se determinaram as curvas de capacidade interfacial para os géis que utilizam como agente gelificante o PVC devido às dificuldades experimentais da montagem e à impossibilidade de preparação do gel orgânico de 1,4-dibromobutano utilizando o DBS.

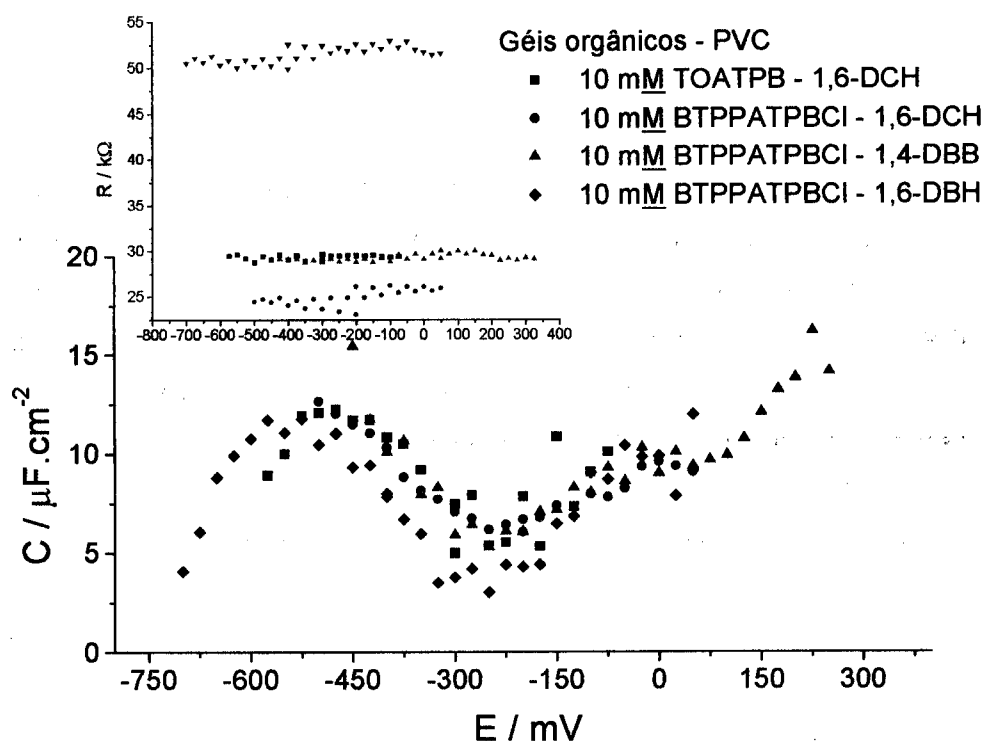


Figura 3.23. Representação das curvas de capacidade obtidas para diferentes fases orgânicas gelificadas.

Estabelecendo uma analogia dos resultados expressos na figura 3.23 com os obtidos para as mesmas condições experimentais mas para interfaces líquido-líquido, verifica-se que a gelificação da fase orgânica introduz inúmeras alterações do comportamento do sistema, nomeadamente diferenças no comportamento das curvas de capacidade interfacial e nas resistências totais das soluções. Relativamente à capacidade interfacial,

embora não existam diferenças significativas entre os valores para os vários géis, tal como havia acontecido com os solventes puros, o seu comportamento é completamente distinto. Uma primeira evidência prende-se com o facto de não se conseguir ajustar nos limites do intervalo de polarização uma resistência associada à transferência de carga, à excepção do gel de 1,4-DBB, devido aos valores elevadas da resistência total. A segunda evidência relaciona-se com a existência de dois máximos locais para a capacidade interfacial ao longo do intervalo de polarização. Esta poderá estar relacionada com o posicionamento preferencial na interface do anião ou do catião de acordo com o potencial aplicado.

Quanto à janela de potencial, verifica-se que para o caso específico do 1,6-DCH ocorreu uma diminuição do tamanho da mesma, sendo que a utilização de um outro electrólito de suporte não influencia de modo significativo o comportamento da janela de potencial, como se havia verificado para as interfaces líquido-líquido. Relativamente à representação dos valores das resistências sobressai o valor relativo à utilização do 1,6-DBH, pois embora o aumento da resistência deste gel orgânico fosse de certa forma esperado pelas observações no estudo das interfaces líquido-líquido para este solvente, nomeadamente pelo aumento da cadeia carbonada e pelo aumento da massa molecular do halogéneo, a proporção deste aumento do valor da resistência surge como um resultado de alguma forma imprevisível, o que pode limitar a utilização deste gel para o acompanhamento das reacções de transferência iónica.

3.3.2.5. Resistência dos géis orgânicos

Para se avaliar a contribuição da variação da espessura dos géis na resistência total do sistema realizaram-se determinações de impedância electroquímica a géis de 1,6-DCH e 1,6-DBH, contendo como electrólito de suporte TOATPB 10 mM e como agentes gelificantes PVC e DBS nas concentrações optimizadas no ponto 3.3.1. Para se evitar a polarização do sistema aplicou-se uma diferença de potencial dc de 0V, à qual se sobrepôs uma diferença de potencial ac de 20 mV, de acordo com o descrito no ponto 3.2.6. Pelo ajuste aos espectros de impedância de um circuito do tipo R(CW), obtiveram-se os valores de R_{gel} , C e W, esquematizados na tabela 3.5.

Tabela 3.5. Valores obtidos por EIE para diferentes espessuras de géis de 1,6-DCH.

1,6-DCH									
	espessura /mm	R / kΩ	erro / %	C / μF	erro / %	W / μΩ	erro / %	m / Ω.mm ⁻¹	b / Ω
DBS	2,0	20,048	1,15	2,0647	7,94	12,575	3,82	7041.5	7813
	4,0	36,065	1,73	2,9891	19,08	14,273	10,16		
	6,0	53,629	2,47	4,3957	30,05	12,077	28,94		
	10,0	76,423	1,5	3,0092	26,29	11,429	16,28		
PVC	2,0	24,953	1,1	1,3792	5,46	6,5942	3,73	9131.5	9111
	6,0	48,865	2,14	1,6869	11,47	4,8791	11,22		
	10,0	99.619	2,75	1,6671	18,80	3,6763	21,84		

Na figura 3.24 encontram-se esquematizados os valores obtidos pela representação gráfica do efeito da variação da resistência em função da espessura do gel. Obtém-se uma representação linear, na qual o valor da ordenada na origem representa a resistência de contacto dos eléctrodos de prata com o gel e o declive da recta encontra-se relacionado com a condutividade do gel. Comparativamente, verifica-se que os valores para o gel de 1,6-DCH contendo PVC, apesar de apresentarem um maior valor para a resistência de contacto, apresentam no entanto um valor superior de condutividade, que o gel de DBS. No entanto, os valores de resistência de ambos os géis, para espessuras inferiores a 2 mm, são inferiores aos valores encontrados para resistência da solução nas interfaces líquido-líquido (≈28 kΩ). Este aspecto poderá estar relacionado com uma melhor dissolução do TOATPB promovida pela malha do gel, pois encontram-se bastantes dificuldades na dissolução do TOATPB nas soluções de 1,6-DCH.

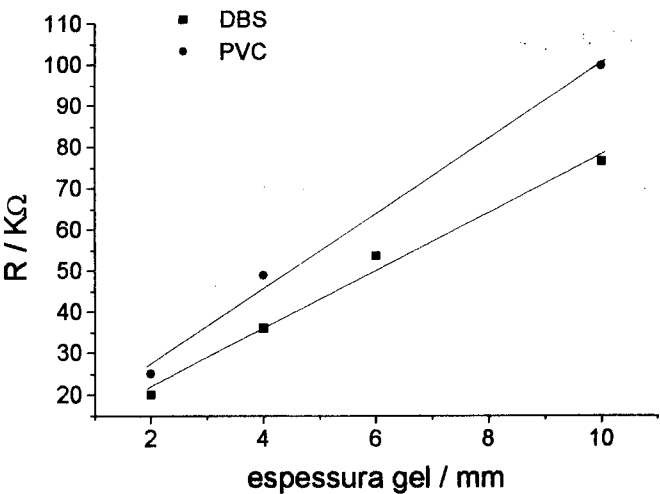


Figura 3.24. Representação da variação da resistência com a espessura de géis de 1,6-DCH.

Foram também realizadas determinações idênticas aos géis de 1,6-DBH, todavia os diagramas de impedância electroquímica apresentam um comportamento aleatório, sem qualquer significado, impossibilitando qualquer ajuste de um circuito equivalente.

3.3.2.6. Transferência iónica através de uma microinterface gelificada água|1,6-DCH

No ponto 1.2.3. refere-se que a equação da intensidade da corrente para os microorifícios é análoga da equação da intensidade de corrente num eléctrodo de microdisco, dada pela equação 1.11. Para um conjunto de microorifícios, como é constituída esta membrana de suporte, o valor da intensidade de corrente deverá ser multiplicado pelo número total de microorifícios, dado que cada um se comporta como uma interface independente. Assim a equação deverá apresentar a seguinte forma:

$$I_d = 4nFDc^*r \times m \quad (3.17)$$

em que o significado dos símbolos se encontra descrito na equação 1.10 e m é o número total de microorifícios.

Para as membranas microperfuradas que se utilizaram neste trabalho, que possuem um total de 66 microorifícios de 5 µm de raio, obtiveram-se os valores para os coeficientes de difusão de alguns iões para uma interface gelificada de água|1,6-DCH em PVC, determinados a partir dos voltamogramas cíclicos realizados a uma velocidade de varrimento de 50 mV.s⁻¹, que se encontram esquematizados na tabela 3.6.

Tabela 3.6. Valores para os coeficientes de difusão de alguns iões através de uma interface gelificada água|1,6-DCH.

Iões	Concentração / M	I _p / A	D / cm ² .s ⁻¹
Nitrato (NO ₃ ²⁻)	1.0x10 ⁻³	1.94x10 ⁻⁸	1.52x10 ⁻⁶
Perclorato (ClO ₄ ²⁻)	1.0x10 ⁻⁴	2.26x10 ⁻⁸	1.77x10 ⁻⁵
Tetrapentilamónio ((C ₅ H ₁₁) ₄ NH ₄ ⁺)	1.0x10 ⁻⁴	1.89x10 ⁻⁸	1.48x10 ⁻⁵

3.3.3. Estudo das propriedades dieléctricas de géis orgânicos

Samec *et al*⁴¹ descrevem teoricamente no seu trabalho a relação que existe entre a capacidade da interface e a constante dieléctrica. Pelo estudo das propriedades dieléctricas é então possível obter uma melhor compreensão dos fenómenos inter e intramoleculares, permitindo uma análise mais profunda dos processos físico-químicos que decorrem e que dependem dos solventes orgânicos utilizados.

Como se pode observar na figura 3.3 a representação de $\epsilon''=f(\epsilon')$, designada por representação de Cole-Cole, tem a forma de um semicírculo par de uma relaxação do tipo de Debye (modo de relaxação monodispersivo), que pode ser descrito matematicamente por¹⁶⁷:

$$(\epsilon' - a)^2 + \epsilon'^2 = c^2 \quad (3.17)$$

em que a e c são constantes. Todavia, é frequente encontrarem-se modos de relaxação com alguma dispersão na frequência de relaxação, designados por modos polidispersivos. Para estes, o diagrama de Cole-Cole é parte de um semicírculo, em que agora o centro não se encontra sobre o eixo ϵ' , mas abaixo dele; a expressão matemática que representa esta situação é:

$$(\epsilon' - a)^2 + (\epsilon'' - b)^2 = c^2 \quad (3.18)$$

em que a , b e c são constantes. O ajuste dos valores experimentais da representação de Cole-Cole a esta equação permite calcular os valores de $\Delta\epsilon$, os termos $\epsilon(0)$, $\epsilon(\infty)$ e o parâmetro β^i , através das seguintes expressões:

$$\epsilon(0) = a + \sqrt{c^2 - b^2} \quad (3.19)$$

$$\epsilon(\infty) = a - \sqrt{c^2 - b^2} \quad (3.20)$$

$$\Delta\epsilon = \epsilon(0) - \epsilon(\infty) = 2\sqrt{c^2 - b^2} \quad (3.21)$$

ⁱ Parâmetro que mede o carácter polidispersivo do modo. Se:

- $\beta = 1$ o modo é monodispersivo;
- $0 < \beta < 1$ o modo é polidispersivo;

$$\beta = 1 - \frac{2}{\pi} \arcsen\left(\frac{b}{c}\right) \quad (3.22)$$

Na prática é mais fácil obter estes parâmetros ajustando uma expressão teórica aos valores experimentais de $\varepsilon'(\omega)$ e de $\varepsilon''(\omega)$. Para isso, considerando que existem um ou mais modos de relaxação independentes, as expressões da contribuição dielétrica $\varepsilon'(\omega)$ e $\varepsilon''(\omega)$ têm a seguinte forma:

$$\varepsilon'(\omega) = \varepsilon_{\infty} + \Delta\varepsilon \sum_{i=1}^n \left\{ g_i \frac{1 + \left(\frac{\omega}{\omega_{r_i}}\right)^{\beta_i} \cos\left(\frac{\beta_i \pi}{2}\right)}{1 + 2\left(\frac{\omega}{\omega_{r_i}}\right)^{\beta_i} \cos\left(\frac{\beta_i \pi}{2}\right) + \left(\frac{\omega}{\omega_{r_i}}\right)^{2\beta_i}} \right\} + \frac{\cos \frac{\lambda \pi}{2}}{\left(\frac{\omega}{\omega_c}\right)^{\lambda}} \quad (3.23)$$

$$\varepsilon''(\omega) = \Delta\varepsilon \sum_{i=1}^n \left\{ g_i \frac{\left(\frac{\omega}{\omega_{r_i}}\right)^{\beta_i} \sen\left(\frac{\beta_i \pi}{2}\right)}{1 + 2\left(\frac{\omega}{\omega_{r_i}}\right)^{\beta_i} \cos\left(\frac{\beta_i \pi}{2}\right) + \left(\frac{\omega}{\omega_{r_i}}\right)^{2\beta_i}} \right\} + \frac{\sen \frac{\lambda \pi}{2}}{\left(\frac{\omega}{\omega_c}\right)^{\lambda}} \quad (3.24)$$

em que $\Delta\varepsilon$ é a amplitude dielétrica, β_i e λ são factores adimensionais (entre 0 e 1) que definem, respectivamente, o carácter polidispersivo do sistema e a existência de defeitos na malha, g_i é o factor adimensional característico do modo de relaxação i , sendo

$\sum_{i=1}^n g_i = 1$ e $\omega_{r_i} = \frac{1}{\tau_{r_i}}$ e $\omega_c = \frac{1}{\tau_c}$ são as frequências de relaxação e condução¹⁶⁷.

Na parte superior direita da figura 3.25 encontra-se a representação da parte imaginária da constante dielétrica (ε'') em função da parte real (ε'), conhecida por diagrama de Cole-Cole. O ajuste dos valores experimentais de $\varepsilon'(\omega)$ e de $\varepsilon''(\omega)$ às expressões anteriores, permite determinar os parâmetros experimentais associados às propriedades dielétricas ($\Delta\varepsilon$, g_i , ω_{r_i} , β_i , ω_c e λ).

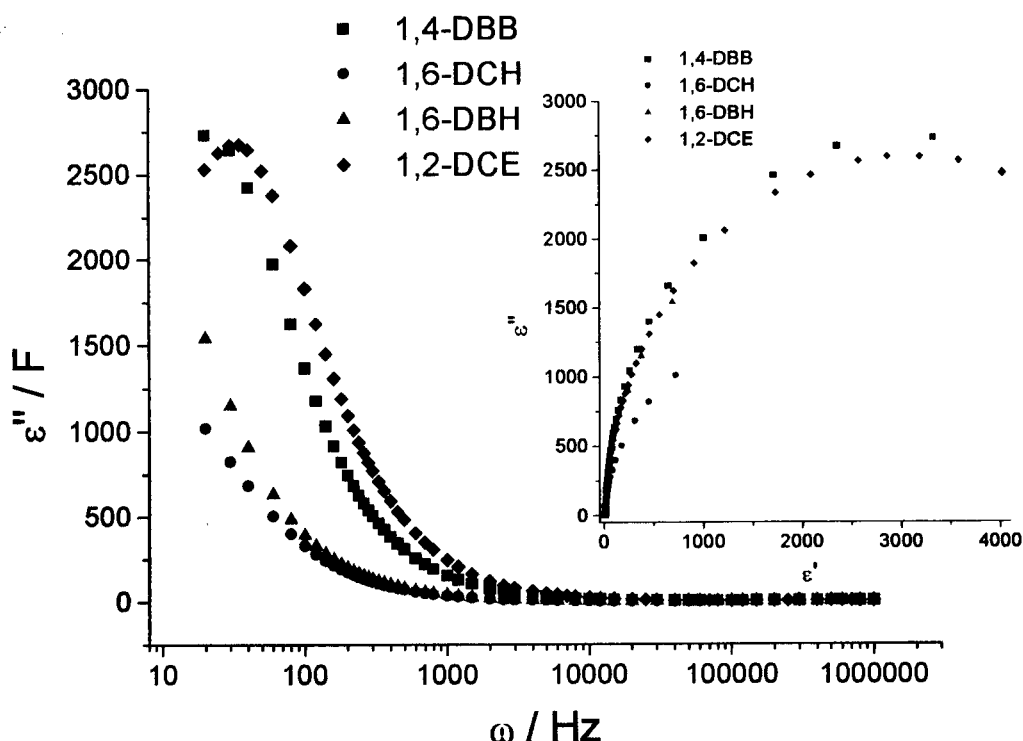


Figura 3.25. Representação dos valores das partes real e imaginária da constante dielétrica para diferentes solventes orgânicos.

Os valores para a parte imaginária da constante dielétrica, representados graficamente na figura 3.25, indiciam o deslocamento dos modos de relaxação para menores frequências (inferiores a 20 Hz) para os solventes de maior cadeia alifática e maior massa molecular do halogéneo. Este efeito pode ser explicado pelo aumento dos tempos de relaxação devido a um aumento do volume das moléculas dos solventes, que condiciona o reajuste das moléculas perante a aplicação de um pequeno campo eléctrico alternado.

Embora estes modos de relaxação sejam apenas claramente visíveis nos géis de 1,2-DCE e 1,4-DBB, o facto de o diagrama de Cole-Cole apresentar a forma de um semicírculo, bem como os ajustes efectuados, sugerem precisamente a existência de tais fenómenos de relaxação. É então possível, a partir do ajuste e extrapolação dos valores experimentais do diagrama de Cole-Cole às equações 3.23 e 3.24, quantificar os valores dos parâmetros dielétricos para os vários solventes utilizados, sendo que apenas aqueles que apresentam maior significado físico se encontram esquematizados na tabela 3.7.

Tabela 3.7. Valores dos parâmetros dielétricos de solventes orgânicos puros.

Solvente Orgânico	Temperatura / °C	λ	$\Delta\epsilon$	β	ω_r / Hz
1,2-DCE	25.6	0.98	3080.1	0.99	26
			2342.9	0.96	62
			6.4	1.00	600 000
1,4 - DBB	25.0	0.98	3294.4	1.00	18
			2259.5	0.98	39
1,6 - DCH	22.3	0.32	2129.9	1.00	10
			329.9	0.98	38
1,6 - DBH	22.6	0.97	2640.1	0.99	11
			9.0	1.00	599 999

Embora não se tenham determinado os valores de ϵ para os diferentes solventes à mesma temperatura, devido a algumas limitações experimentais, considera-se que estes desvios de temperatura não introduzem contribuições significativas. Assim, pela comparação dos valores de γ verifica-se que apenas o 1,6-DCH apresenta um resultado dissonante, apresentado um valor bastante baixo para este parâmetro. Este resultado, de algum modo imprevisível, surge na sequência do comportamento obtido para o diagrama de Cole-Cole no qual o semicírculo obtido para o 1,6-DCH apresenta uma curvatura diferente da dos restantes solventes, contudo não é possível com os dados disponíveis retirar qualquer conclusão relativamente a este aspecto.

Relativamente aos modos de relaxação, a tabela 3.7 apresenta para todos os solventes um modo de relaxação de baixa frequência próximo dos 20 Hz, constituindo uma extrapolação aos dados em análise. Estes modos de relaxação têm uma grande contribuição para a constante dielétrica relativa dado que apresentam os valores mais elevados para a amplitude dielétrica sendo que, no caso dos halo hexanos, a sua contribuição é quase plena. No caso do dicloro hexano o valor da amplitude dielétrica do segundo modo de relaxação é bastante menor enquanto que para o dibromo hexano o segundo modo de relaxação é conhecido e deve-se aos eléctrodos de ITO da célula.

O valor da amplitude dielétrica, $\Delta\epsilon$, para cada solvente é obtido pela contribuição ponderada (pelo factor g_i) das amplitudes dielétricas de cada modo de relaxação. Verifica-se que à medida que aumenta a cadeia alifática e a massa molecular do

halogéneo o valor de $\Delta\epsilon$ vai sendo menor e portanto estes solventes apresentam menor polarizabilidade, diminuindo assim a sua apetência para se tornarem solventes ideais como descreve Vanýsek^{139,140}.

Na figura 3.26 encontram-se representadas as curvas da parte imaginária de ϵ em função da frequência, para várias fases orgânicas de solvente 1,4-DBB. Verifica-se que a gelificação do solvente pela introdução do PVC provoca um deslocamento da curva para frequências mais elevadas. Este desvio para frequências mais elevadas deve-se aos menores tempos de relaxação da estrutura molecular, que pode ser relacionado com as interacções intermoleculares. É possível relacionar este resultado com uma interacção das moléculas de solvente com a malha tridimensional formada pelo PVC. Devido a essa interacção as moléculas reagem mais rapidamente à aplicação do campo eléctrico, diminuindo os tempos de relaxação e deslocando o modo de relaxação para frequências mais elevadas.

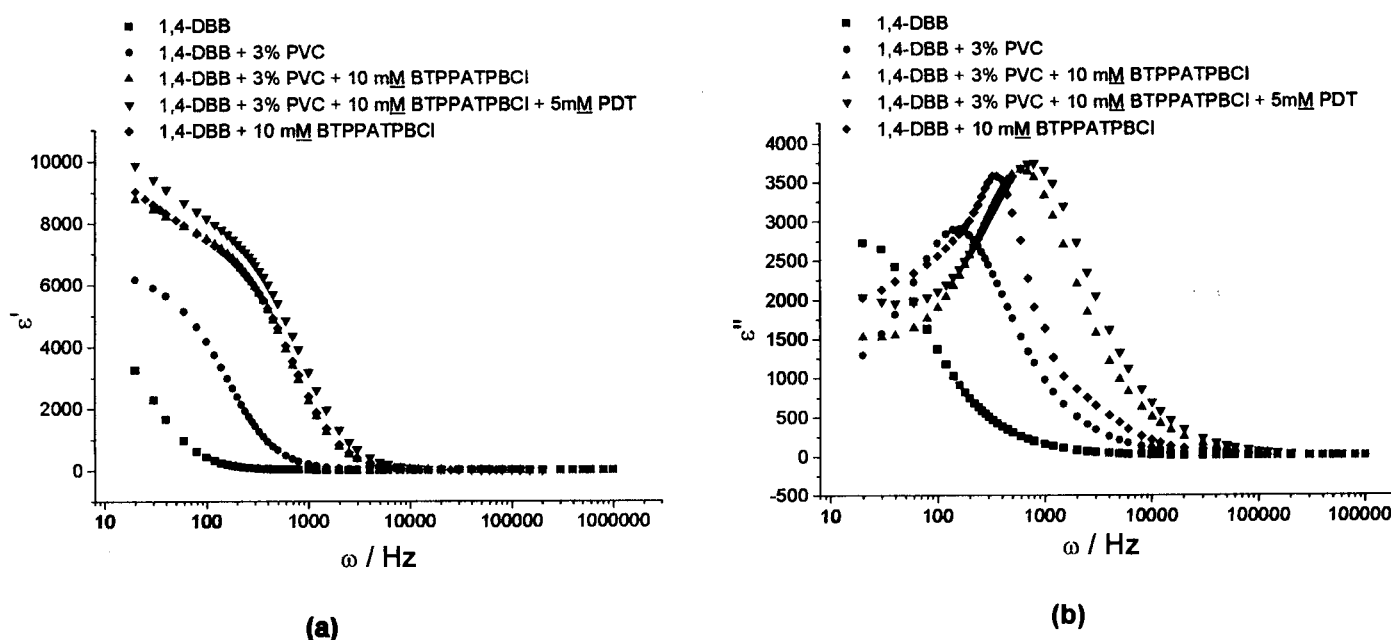


Figura 3.26. Representação das curvas das de constante dielétrica para diferentes fases orgânicas em 1,4-DBB. a) Componente real; b) Componente imaginária.

Relativamente à introdução do sal de BTTPATPBCl, este não só altera os tempos de relaxação, pelos mesmos motivos, como também introduz um forte aumento dos valores de ϵ'' , relacionados com o aumento da condução da solução, e dos valores de ϵ' , que se relacionam com a capacidade da solução, devido ao carácter iónico desta solução,

introduzido pela dissociação do sal. O mesmo efeito é obtido pela introdução do BTPPATPBCI no gel orgânico para as curvas de ϵ'' , considerando que as contribuições do PVC e do sal são aditivas, enquanto que para as curvas de ϵ' a contribuição deve-se exclusivamente ao carácter iónico introduzido pela adição do sal. Relativamente à introdução do ligando, este também contribui para uma maior interacção das moléculas do solvente, contudo esta sua contribuição é pouco significativa e deve-se somente a um ligeiro aumento da capacidade do sistema, como o demonstra a curva de ϵ' .

Na figura 3.27 encontram-se representadas as curvas para as componentes real e imaginária da constante dielétrica para diferentes concentrações de BTPPATPBCI numa solução de 1,4-dibromobutano. Observa-se que o aumento da concentração do sal não altera significativamente o comportamento das curvas. Torna-se possível concluir, de acordo com o descrito na interpretação da figura anterior, que apenas tem significado a contribuição introduzida pelo carácter iónico da solução com a dissociação do sal na condução da solução, não existindo contributo para concentrações de sal desta ordem de grandeza.

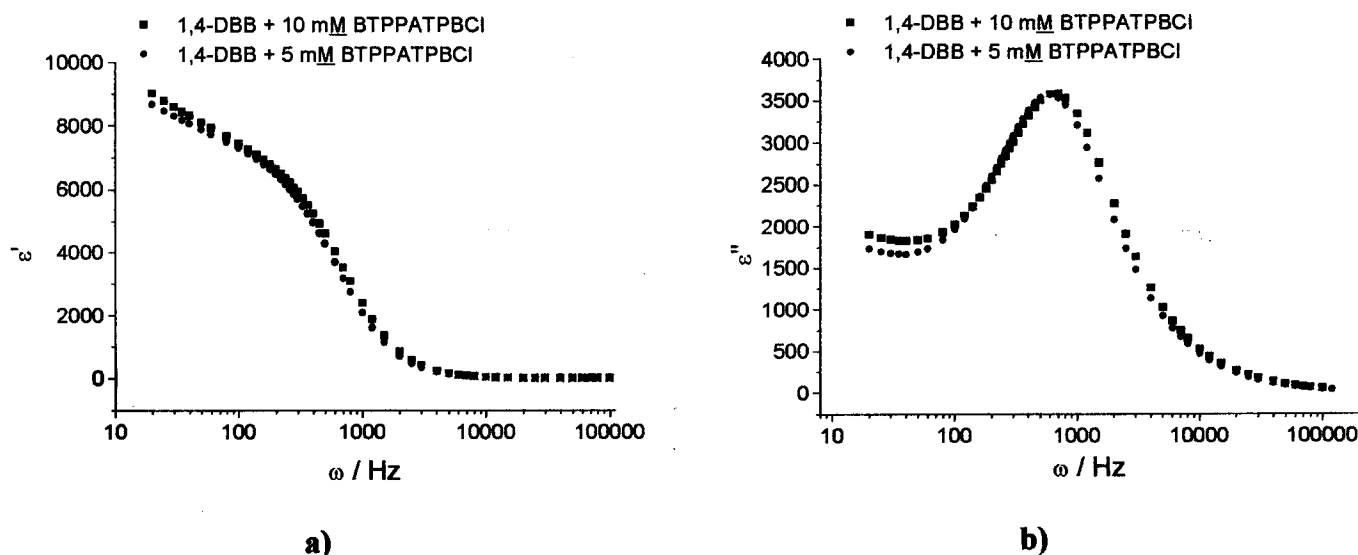


Figura 3.27. Representação das curvas das componentes da constante dielétrica para diferentes concentrações de BTPPATPBCI em 1,4-DBB. a) Componente real; b) Componente imaginária.

Como referido anteriormente, um gel não é mais que uma malha polimérica embebida por um solvente que ocupa os espaços no interior. Esta condição conduz a que exista um equilíbrio entre as fases. Como referem Tanaka *et al*¹⁹⁸, este fenómeno do equilíbrio das

fases fornece informação importante sobre a termodinâmica das interações entre a rede e o líquido, assim a termorreversibilidade do gel dada pelas curvas de aquecimento e arrefecimento revela informação importante sobre as interações entre a malha e o fluido, que podem ser quantificadas¹⁵². Na figura 3.28 encontram-se representados os valores máximos de ϵ'' para diferentes temperaturas, correspondendo às curvas de aquecimento e arrefecimento obtidas para um gel orgânico de 1,4-DBB constituído por 3% PVC, 10 mM BTPPATPBCI e 5 mM PDT. Evidencia-se o comportamento de alteração dos declives, certamente relacionado com a alteração de fase, sendo que para este caso é possível concluir que o gel orgânico possui um ponto de fusão de aproximadamente 72°C.

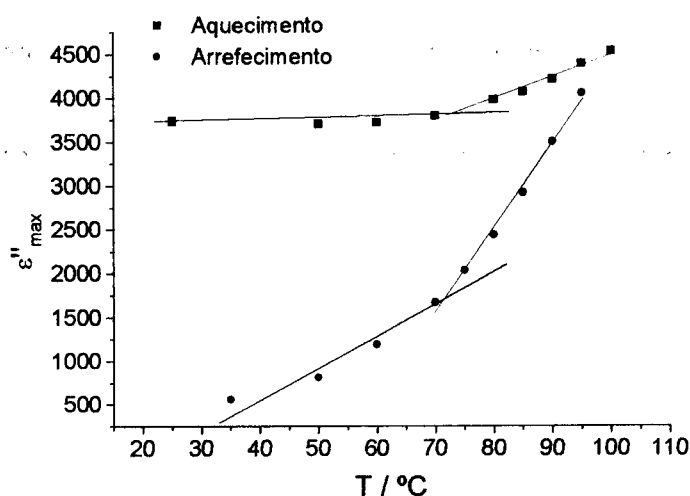


Figura 3.28. Representação das capacidades dielétricas para um gel orgânico de 1,4-DBB constituído por 3% PVC, 10 mM BTPPATPBCI e 5 mM PDT.

3.3.4. Preparação e imobilização de *glucose oxidase* em filmes de Langmuir-Blodgett de 9,9-difenilfluoreno oligotiofeno (FT3)

A utilização de filmes de monocamadas de moléculas em várias aplicações comerciais, como em sensores, detectores, monitores e componentes de circuitos electrónicos, evoluiu bastante com a possibilidade de depositar essas monocamadas em substratos sólidos através de diversas técnicas, sendo a de Langmuir-Blodgett uma das mais promissoras. Esta técnica permite um controlo preciso da espessura da monocamada, deposição homogénea em grandes superfícies e a possibilidade de depositar diversas camadas de compostos diferentes em quase todo o tipo de substratos¹⁹⁹.

Neste ponto pretende-se avaliar a possibilidade de preparar um filme estável de um novo derivado de um oligotiofeno, o FT3 e determinar se as suas propriedades permitem uma imobilização funcional da GOx. Utilizando a técnica de Langmuir-Blodgett as monocamadas de FT3 na interface ar-água caracterizam-se pelas isotérmicas de compressão da pressão superficial (mN.m^{-1}) em função da área média por molécula ($\text{\AA}^2.\text{molécula}^{-1}$).

Na figura 3.29 encontram-se representadas as isotérmicas para a adição de diferentes volumes de uma solução de 1 mg.ml^{-1} de FT3 na superfície da subfase. Verifica-se que, de acordo com as características da tina, apenas para a adição de volumes superiores a $80 \text{ }\mu\text{l}$ de solução de 1 mg.ml^{-1} de FT3 existe uma quantidade de moléculas suficiente para que ocorra a formação de uma monocamada. Mas o resultado mais interessante prende-se com a transição de fases. Neste aspecto verifica-se pelo comportamento da isotérmica que o filme passa de um estado praticamente gasoso, em que a pressão superficial se encontra no intervalo entre 0.1 e 0.2 mN.m^{-1} para o estado sólido, com uma subida abrupta da pressão superficial. Este resultado permite afirmar que é possível preparar um filme estável e altamente organizado de FT3.

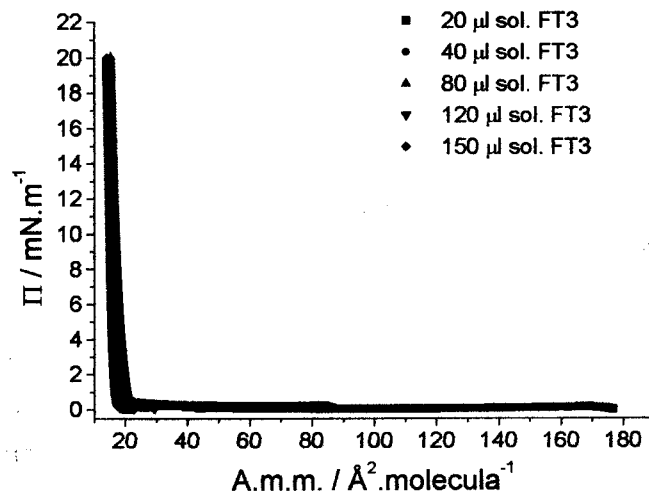


Figura 3.29. Isotérmicas da adição de diferentes quantidades de FT3 em água, a 20°C , para uma velocidade de compressão de 5 mm.min^{-1} .

Como referem Sun *et al*²⁰⁰, no seu trabalho de preparação de filmes de Langmuir-Blodgett de *glucose oxidase*, pelo controlo da subfase ou da composição da superfície, a técnica de Langmuir-Blodgett possibilita um meio de preparar filmes ordenados de enzimas com um aumento da acessibilidade aos seus centros activos relativamente a

outras técnicas de imobilização. Como se verificou a possibilidade de preparar filmes ordenados de FT3, fez-se a adição de *glucose oxidase* à solução de FT3 antes do início da deposição. Na figura 3.30 estão representadas várias adições de uma solução de FT3 contendo uma quantidade relativamente elevada de GOx.

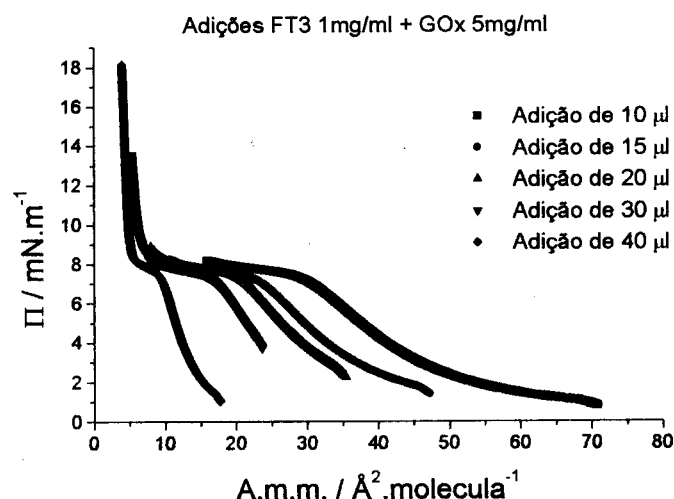


Figura 3.30. Isotérmicas da preparação de filmes de FT3 contendo GOx.

Observa-se a existência de um comportamento diferente do obtido para os filmes de FT3, devido à presença da enzima. Uma destas diferenças prende-se com a existência, em todas as isotérmicas, de uma região de coexistência da fase líquido expandido e líquido condensado, cuja pressão superficial é de aproximadamente 8 mN.m⁻¹, denominada de pressão de transição, Π_T . Esta região revela a necessidade de ocorrer um rearranjo da enzima de modo a formar um filme sólido ordenado, que é facilitado com a maior quantidade de enzima adicionada. Só a partir da adição de volumes superiores a 30 μ l é que se torna possível observar a formação de filmes ordenados. Contudo a área média por molécula (A.m.m.) destes é inferior à obtida para os filmes contendo apenas FT3, este facto está certamente relacionado com a diferença na área molecular da GOx que é bastante superior à do FT3.

Este estudo permitiu demonstrar a possibilidade de imobilizar a GOx em filmes altamente ordenados de FT3 através da técnica de Langmuir-Blodgett. Este novo método de imobilização necessita no entanto de outros estudos, relativamente à perda de actividade da enzima e à aplicação destes filmes em substratos sólidos. Esta possibilidade será alvo de uma breve abordagem no ponto seguinte.

3.3.5. Caracterização de superfícies por determinação do ângulo de contacto de gotas de água

A interpretação e comparação de ângulos de contacto em diferentes superfícies, ou até mesmo em superfícies idênticas por investigadores diferentes, são complicadas por dois factores: a existência de efeitos de histerese e o facto de a superfície raramente exibir um único ângulo de contacto de equilíbrio termodinâmico, como definido pela equação de Young^{192, 201}. Verifica-se também que as próprias leituras dependem se a gota avançou ou regrediu na superfície antes da determinação. Perante estes factores várias metodologias surgiram com o intuito de se uma melhor comparação e avaliação dos ângulos de contacto. Das várias metodologias existentes podem-se citar como as mais usuais a determinação da tensão superficial crítica¹⁹², histerese do ângulo de contacto²⁰¹ e o efeito do tamanho da gota²⁰².

3.3.5.1. Poliéster (PET)

Para comparação de ângulos de contacto entre diferentes superfícies, a utilização dos valores de γ_c evita muitas das ambiguidades envolvidas. Segundo Wenzel²⁰³ uma maior rugosidade da superfície implica um maior valor de γ_c . Contudo, como analisado no ponto 3.1.5., é necessário a determinação dos ângulos de contacto de vários líquidos sobre a superfície para se representar $\cos\theta = f(\gamma_w)$ e assim determinar por extrapolação o valor de γ_c , o que não foi possível neste trabalho. Para se obter mais informação sobre a estabilidade das superfícies moleculares, Drelich *et al*²⁰² demonstraram que a análise da relação entre o ângulo de contacto (de avanço e regresso) e o tamanho da gota permite obter uma informação adicional. Assim, realizaram-se determinações dos ângulos de contacto de avanço e regresso para uma gota de água colocada sob a superfície de uma membrana de poliéster, de forma a se avaliar o efeito do tamanho da gota, como representado na figura 3.31. Realizaram-se 10 determinações para cada ponto e os valores apresentados são a média dessas determinações e respectivo desvio de padrão. São também apresentados na figura os valores dos ângulos de contactos de histerese obtidos pela aplicação da equação 3.14.

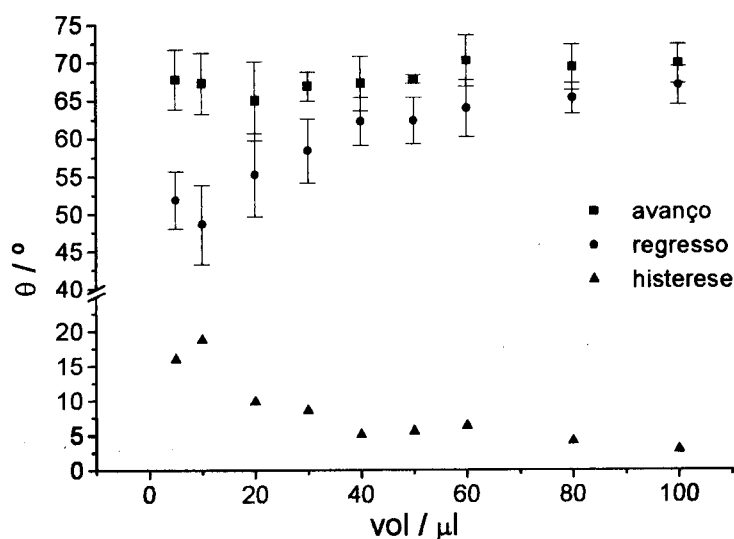


Figura 3.31. Representação dos ângulos de contacto de uma gota de água na superfície de uma membrana de poliéster.

Pode observar-se, na representação da figura 3.30, que o efeito do tamanho da gota é diferente para os ângulos de contacto de avanço e regresso. Para o caso da água, os ângulos de contacto de avanço serão sensíveis ao carácter hidrofóbico da superfície traduzindo-se por uma diminuição dos respectivos ângulos, enquanto que para os ângulos de contacto de regresso, influenciados pelo movimento de drenagem da linha de contacto da gota, irão caracterizar o carácter hidrofílico da superfície. Verifica-se pela análise da figura 3.31 que os ângulos de contacto de avanço pouco oscilam com o tamanho da gota, enquanto que os ângulos de contacto de regresso variam significativamente, sendo mais pronunciados para volumes menores. Esta observação indica a existência de uma forte interacção entre a gota de água e a superfície e portanto um maior carácter hidrofílico por parte da superfície de PET. Relativamente aos efeitos da rugosidade e heterogeneidade na superfície sólida, que introduzem barreiras ao movimento da linha de contacto da gota, estes traduzem-se, quantitativamente, pelo valor do ângulo de contacto de histerese.

Analisando a figura 3.31 verifica-se ainda que, embora o efeito de histerese esteja sempre presente, este é mais significativo para valores inferiores a 40 μ l. Esta observação indicia que a superfície do PET apresenta rugosidade e heterogeneidade, contudo como esta apenas se pronuncia para volumes menores, este ângulo de histerese

encontra-se certamente relacionado com o carácter hidrofílico da superfície e não com as características da superfície que influenciariam todo o intervalo de volumes de gota.

Relativamente ao valor do ângulo de contacto de uma gota de água numa superfície de PET este é de 68°, obtido a partir do cálculo do valor médio dos ângulos de contacto de avanço. Este valor indica que a água interacciona com a superfície sólida (pois o ângulo de contacto é inferior a 90°)¹⁸⁷. Comparativamente, encontram-se representados na tabela 3.8 os valores dos ângulos de contacto encontrados na literatura para as superfícies de PTFE, PE, PET e PMMA. Verifica-se que as superfícies de PTFE (Teflon®) e PE possuem um carácter hidrofóbico enquanto que as de PET e PMMA apresentam um carácter hidrofílico, de acordo com o obtido anteriormente. Relativamente à superfície de PET, os valores apresentados, embora da mesma ordem de grandeza, são ligeiramente superiores ao obtido neste estudo, o que pode estar relacionado com o maior grau de pureza da superfície introduzido pelas tecnologias de produção industrial actuais.

Tabela 3.8. Valores dos ângulos de contacto de uma gota de água em várias superfícies.

	Politetrafluoretileno PTFE / °	Polietileno PE / °	Polietilenotereftalato PET / °	Polimetilmetacrilato PMMA / °
J. R. Dann ²⁰⁴	112	95	71	74
S. Wu ²⁰⁵	108	94	---	---
W. A. Zisman ^{206,207}	---	94	81	---
B. Jańczuk ²⁰⁸	111	96	76	74

3.3.5.2. Gel orgânico o-NPOE

Para se avaliarem as características da superfície do gel orgânico colocaram-se diferentes volumes de gotas de água sob uma superfície de gel orgânico de o-NPOE, correspondente à secção de um tubo de vidro de 6 mm, constituído por 1.8% DBS, 10 mM TOATPB e 5 mM PDT, idêntico ao utilizado no capítulo 1. Os resultados encontram-se esquematizados na figura 3.32 e demonstram um aumento dos ângulos de contacto, quando comparados com a superfície de PET, o que indica um menor carácter hidrofílico, mas revelam sobretudo a existência de uma superfície heterogénea, devido à diferença significativa dos ângulos de contacto para diferentes volumes de gota.

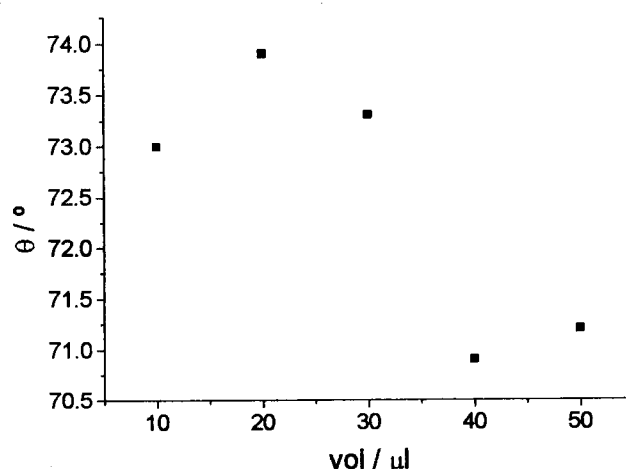


Figura 3.32. Representação dos ângulos de contacto de gotas de água sob a superfície de um gel orgânico de o-NPOE constituído por 1.8% DBS, 10 mM TOATPB e 5 mM PDT.

Para se avaliar o efeito da adsorção da GOx na superfície do gel orgânico, foi imerso um tubo de vidro contendo o gel numa solução de GOx 250 nM, durante o tempo indicado, após o qual o gel foi seco com papel absorvente e se colocou uma gota de água de 10 μ l sob a superfície de gel imersa previamente na solução da enzima. Na figura 3.33 encontram-se representados os resultados obtidos e pela análise os valores verifica-se que o ângulo de contacto obtido após 2 horas de imersão é idêntico ao obtido na figura anterior para igual volume de gota, contudo, após 17 horas de imersão existe uma diminuição significativa do seu valor. Este resultado confirma a adsorção da GOx na superfície do gel orgânico, em consonância com o obtido no capítulo 2 e por outros autores¹⁵.

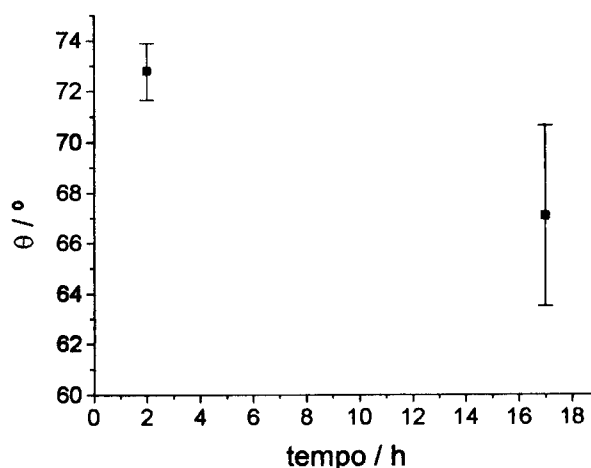


Figura 3.33. Representação dos ângulos de contacto obtidas para uma gota de solução de GOx sob uma superfície de poliéster.

3.3.5.3. 9,9-Difenilfluoreno oligotiofeno (FT3)

A preparação, num passado recente, de filmes orgânicos de monocamadas de estrutura molecular bem organizada, para posterior adsorção em substratos sólidos, conduziu ao aperfeiçoamento de dois métodos de preparação distintos: a técnica de monocamadas de Langmuir-Blodgett e as monocamadas automontadas (SAM's)^{192,202}. Com base nas monocamadas de LB de FT3, apresentadas anteriormente, pretende-se agora avaliar a possibilidade de adsorção destes filmes orgânicos na superfície de PET.

Para se explorar a relação existente entre a estrutura microscópica das superfícies orgânicas e as suas propriedades macroscópicas, como a "wettability", utilizam-se inúmeras técnicas de acordo com Petty²⁰⁹, que incidem essencialmente em três categorias: estrutural, óptica e eléctrica. Pela determinação dos ângulos de contacto nestas superfícies, representados na figura 3.3.4, conclui-se que existe um aumento da "wettability", traduzido pelo aumento dos ângulos de contacto, com o aumento da quantidade de FT3 presente na superfície de PET. Este resultado vem reforçar a possibilidade de utilização do 9,9-difenilfluoreno oligotiofeno (FT3) como filme de revestimento de superfícies de PET para a imobilização de enzimas, devido ao elevado carácter hidrofílico que demonstra. No entanto, estes filmes apresentam alguma rugosidade ou heterogeneidade na superfície, principalmente para volumes de gota menores.

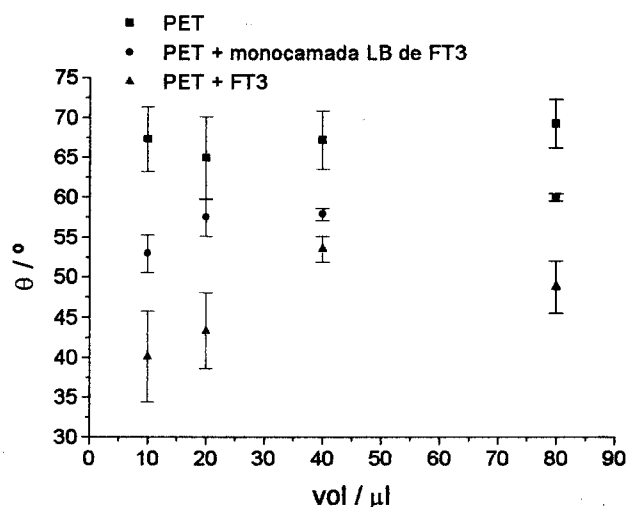


Figura 3.34. Representação dos ângulos de contacto de gotas de água sobre poliéster, poliéster revestido com monocamada de LB de FT3 e poliéster revestido com uma camada de FT3.

3.4 Conclusão

Com a realização deste trabalho foi possível demonstrar a possibilidade de preparação novos géis orgânicos de 1,6-diclorohexano, 1,6-dibromohexano e 1,4-dibromobutano utilizando pequenas percentagens de PVC como agente gelificante, ou de 1,6-diclorohexano e 1,6-dibromohexano utilizando concentrações baixas de DBS como agente gelificante. Pelo estudo da resistência em função da espessura do gel foi possível observar que o gel de 1,6-diclorohexano, de PVC, utilizando como electrólito de suporte TOATPB 10 mM, apresenta um maior valor de condutividade. No entanto ambos os géis apresentam, para espessuras inferiores a 2 mm, valores de resistência inferiores aos obtidos em interfaces líquido-líquido, utilizando como electrólito de suporte 10 mM TOATPB. Estas novas metodologias de gelificação da fase orgânica abrem novas perspectivas para a monitorização de reacções de transferência iónica através das microinterfaces gelificadas suportadas em membranas de poliéster microperfuradas.

Demonstra-se a possibilidade de ampliar o intervalo de polarização, quer pela utilização de electrólitos de suporte da fase orgânica e aquosa, respectivamente, de maior carácter hidrofóbico e hidrofílico, quer pela utilização de solventes orgânicos de maior cadeia alifática e de diferente natureza do halogéneo. Contudo este aumento introduz problemas relacionados com o aumento da resistividade da fase orgânica. Esta relação poderá ser representada esquematicamente por:

Resistividade Intervalo de polarização	Resistividade Intervalo de polarização	
	1,4-DCB	1,6-DCH
	1,4-DBB	1,6-DBH
	1,4-DIB	

De acordo com os resultados experimentais verifica-se que para o caso do 1,4-DIB a própria elevada resistividade do solvente é suficiente para impedir a determinação dos diagramas de impedância enquanto para o caso do 1,6-DBH este resultado apenas acontece para a gelificação desta fase orgânica.

A realização de estudos das propriedades dieléctricas associadas aos solventes, à dissolução do electrólito de suporte da fase orgânica e à própria gelificação da fase pela introdução de PVC, surge com base no pressuposto que a formação de pares iónicos (comportamento não ideal) é favorecida em solventes de baixa constante dieléctrica e nos casos em que a miscibilidade entre o solvente orgânico e a água é grande. Estes estudos revelaram uma diminuição da amplitude dieléctrica, acompanhada por uma diminuição das frequências de relaxação, com o aumento da cadeia alifática e massa molecular do halogéneo dos solventes. Este efeito afasta o comportamento destes solventes do comportamento ideal. Contudo, verifica-se, no caso do 1,4-dibromobutano, que a gelificação do solvente e a introdução de um electrólito de suporte como o BTPPATPBCl, aumentam significativamente os valores das componentes real e imaginária da constante dieléctrica.

Neste trabalho foi também desenvolvido um novo método para a imobilização da *glucose oxidase*. Neste estudo foi possível preparar um filme altamente ordenado de um 9,9- difenilfluoreno oligotiofeno (FT3) pela técnica de Langmuir-Blodgett e demonstrou-se posteriormente a possibilidade de imobilizar a *glucose oxidase* nessa monocamada. Contudo é necessária a realização de outros estudos para se avaliar a eficiência da imobilização e se esta afecta ou não a actividade da enzima.

Pela análise da relação entre os ângulos de contacto, de avanço e regresso, e do volume de gotas de água em superfícies sólidas, foi possível a caracterização de superfícies como as de membranas de PET, de gel orgânico o-NPOE e 9,9-difenilfluoreno oligotiofeno (FT3). Para a superfície de PET obteve-se um valor de ângulo de contacto médio de 68°, próximo do obtido por outros autores (71²⁰⁴ e 76°²⁰⁸) o que indica a existência de um carácter hidrofílico da superfície de PET. Quanto à superfície do gel orgânico de o-NPOE, esta apresenta maiores valores de ângulos de contacto e portanto um menor carácter hidrofílico e também a existência de heterogeneidade na superfície. Relativamente às superfícies de 9,9-difenilfluoreno oligotiofeno (FT3) estas apresentam os menores ângulos de contacto, e portanto valores maiores de "wettability", sendo que este aumento do carácter hidrofóbico se encontra relacionado com o aumento da quantidade de FT3 na superfície.

4. Trabalho Futuro

A utilização das microlinhas possibilita um melhor desempenho nos biossensores suportados em membranas de poliéster microperfuradas, todavia é necessária a preparação de uma montagem experimental que permita a produção deste tipo de membranas, assim como um estudo de optimização das dimensões e do número de microlinhas a utilizar em cada biossensor. Finalmente, o estudo dos fenómenos que lhes estão associados é um aspecto importante para o conhecimento das propriedades que as tornam uma melhor opção relativamente aos microorifícios.

Os estudos realizados, relativamente à preparação de vários géis orgânicos e de diferentes electrólitos, abrem perspectivas para a utilização da metodologia desenvolvida neste biossensor na detecção de outras espécies, como por exemplo, o nitrato utilizando a como enzima a *nitrato reductase*.

5. Bibliografia

- ¹ T. D. Gibson, J. R. Woodward, *Biosensors and Chemical Sensors*; Editores, P. G. Eldman, J. Wang, ACS Books, 1992.
- ² D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson, *Pure Appl. Chem.*, **1999**, 71(12), 2333-2348.
- ³ E. Magner, *Analyst*, **1998**, 123, 1967-1970.
- ⁴ M. Masoom, A. Townshend, *Anal. Chim. Acta*, **1987**, 166, 111-118.
- ⁵ T. Chen, G. Binyamin, D. Schmidtke, K. Friedman, A. Heller, *Anal. Sci.*, **2001**, 17, i297-i300.
- ⁶ L. C. Clark, C. Lyons, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1962**, 102, 29.
- ⁷ Elizabeth A. H. Hall, *Biosensors*, Open University Press, Wiltshire, 1990, cap.1.
- ⁸ A. E. G. Cass, G. Davis, G. Francis, H. A. O. Hill, W. J. Aston, I. J. Higgins, E. V. Plotkin, L. D. L. Scott, A. P. F. Turner, *Anal. Chem.*, **1984**, 56, 667-671.
- ⁹ Z. Zhang, H. Liu, J. Deng, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 1632-1638.
- ¹⁰ N. Dimcheva, E. Horozova, Z. Jordanova, *Z. Naturforsch.*, **2002**, 57c, 705-711.
- ¹¹ K. Sirkar, A. Revzin, M. V. Pishko, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 2930-2936.
- ¹² O. S. Wolfbeis, *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 3269-3284.
- ¹³ E. Bakker, *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 3285-3298.
- ¹⁴ H.-D. Belitz, W. Grosch, *Food Chemistry*, 2ª edição, Springer-Verlag, Berlin, 1999.
- ¹⁵ D. G. Georganopoulou, D. E. Williams, C. M. Pereira, F. Silva, T.-J. Su, J. R. Lu, *Langmuir*, **2003**, 19, 4977-4984.
- ¹⁶ Hechi, H. J., Kalisz, H. M., Hendle, J., Schmid, R. D., Schomburg, D., *J. Mol. Biol.*, 1993, **229**, 153-172.
- ¹⁷ V. I. Birss, S. Guha-Thakurta, C. E. McGarvey, S. Quach, P. Vanýsek, P., *J. Electroanal. Chem.*, **1997**, 423, 13-21.
- ¹⁸ D. T. Pierce, P. R. Unwin, A. J. Bard, *Anal. Chem.*, **1992**, 64(17), 1795-1804.
- ¹⁹ D. J. Holme, H. Peck, *Analytical Biochemistry*, Longman Scientific & Technical, Harlow, 1983, cap. 8.
- ²⁰ J. P. Lowry, K. McAteer, S. S. El Atrash, A. Duff, R. D. O'Neill, *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 1754-1761.
- ²¹ L. D. Mello, L. T. Kubota, *Food Chemistry*, **2002**, 77, 237-256.
- ²² A. Turner, I. Karube, G. Wilson, *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Oxford University Press, Oxford, 1987, cap.6.
- ²³ K. Ogawa, B. Wang, E. Kokufuta, *Langmuir*, **2001**, 17, 4704-4707.
- ²⁴ K. Ogawa, T. Nakajima-Kambe, T. Nakahara, E. Kokufuta, *Biomacromol.*, **2002**, 3, 625-631.
- ²⁵ V. Marecek e Z. Samec, *Anal. Letters*, **1981**, 14(B15), 1241-1253.
- ²⁶ A. Hofmanová, Le Q. Hung, W. Khalil, *J. Electroanal. Chem.*, **1982**, 135, 257-264.
- ²⁷ P. Vanýsek e R. P. Buck, *J. Electroanal. Chem.*, **1984**, 163, 1-9.
- ²⁸ Z. Yoshida e H. Freiser, *J. Electroanal. Chem.*, **1984**, 179, 31-39.

- ²⁹ T. Kakiuchi, J. Noguchi, M. Kotani e M. Senda, *J. Electroanal. Chem.*, **1990**, *296*, 517-535.
- ³⁰ W. Nernst e E. H. Riesenfeld, *Ann. Phys.*, **1902**, *8*, 600.
- ³¹ E. J. W. Verwey e K. F. Niessen, *Phil. Mag.*, **1939**, *28*, 435.
- ³² C. Gavach, T. Mlodnicka e J. Guastalla, *C. R. Acad. Sci.*, **1968**, C266, 1196.
- ³³ J. Koryta, P. Vanýsek, M. Brezina, *J. Electroanal. Chem.*, **1976**, *67*, 263-266.
- ³⁴ E. Du Bois-Reymond, *Untersuchungen Über Thierische Elektrizität*, vol. I, Berlin, 1848.
- ³⁵ A. G., Volkov, *Liquid Interfaces in Chemical, Biological and Pharmaceutical Applications*, Marcel Dekker, New York, 2001.
- ³⁶ Z. Samec, V. Mareček, J. Koryta, M. W. Khalil, *J. Electroanal. Chem.*, **1977**, *83*, 393-397.
- ³⁷ Z. Samec, V. Mareček, J. Weber, *J. Electroanal. Chem.*, **1977**, *96*, 245-247.
- ³⁸ Z. Samec, V. Mareček, J. Weber, *J. Electroanal. Chem.*, **1979**, *100*, 841-852.
- ³⁹ Z. Samec, V. Mareček, J. Weber, *J. Electroanal. Chem.*, **1979**, *103*, 11-18.
- ⁴⁰ T. Kakutani, T. Osakai, M. Senda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1983**, *56*, 991.
- ⁴¹ Z. Samec, V. Mareček, D. Homolka, *J. Electroanal. Chem.*, **1981**, *126*, 121-129.
- ⁴² V. Mareček, Z. Samec, *Anal. Chim. Acta*, **1983**, *151*, 265-269.
- ⁴³ T. Osakai, T. Kakutani, M. Senda, *Anal. Sci.*, **1988**, *4*, 529-530.
- ⁴⁴ H. J. Lee, "Ion Transfer Reactions across Micro-Liquid/Liquid Interfaces: Fundamental Studies and Applications", Tese de doutoramento, EPFL, Lausanne, 1999.
- ⁴⁵ B. Liu, M. V. Mirkin, *Anal. Chem.*, **2001**, *73*(23), 670A-677A.
- ⁴⁶ G. Taylor, H. H. Girault, *J. Electroanal. Chem.*, **1986**, *208*, 179-183.
- ⁴⁷ Y. Shao, M. D. Osborne, H. H. Girault, *J. Electroanal. Chem.*, **1991**, *318*, 101-109.
- ⁴⁸ T. Solomon, A. J. Bard, *Anal. Chem.*, **1995**, *67*, 2787-2790.
- ⁴⁹ S. Amemiya, A. J. Bard, *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 4940-4948.
- ⁵⁰ S. Amemiya, X. Yang, T. L. Wazenegger, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*(39), 11832-11833.
- ⁵¹ A. A. Stewart, Y. Shao, C. M. Pereira, H. H. Girault, *J. Electroanal. Chem.*, **1991**, *305*, 135-39.
- ⁵² Y. Shao, V. Mirkin, *Anal. Chem.*, **1998**, *70*, 3155-3161.
- ⁵³ P. D. Beattie, A. Delay, H. H. Girault, *J. Electroanal. Chem.*, **1995**, *380*, 167-175.
- ⁵⁴ J. A. Campbell, H. H. Girault, *J. Electroanal. Chem.* **1989**, *266*, 465-469.
- ⁵⁵ M. C. Osborne, Y. Shao, C. M. Pereira, H. H. Girault, *J. Electroanal. Chem.*, **1994**, *364*, 155-61.
- ⁵⁶ C. M. Pereira, F. Silva, *Electroanalysis*, **1994**, *6*, 1034-1039.
- ⁵⁷ S. Wilke, H. M. Wang, M. Muraczewska, H. Müller, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1996**, *356*, 233.
- ⁵⁸ S. Wilke, M. D. Osborne, H. H. Girault, *J. Electroanal. Chem.*, **1997**, *436*, 53-64.
- ⁵⁹ S. Wilke, T. Zerihun, *Electrochim. Acta*, **1998**, *44*, 15-22.
- ⁶⁰ L. Murtomäki, K. Kontturi, *J. Electroanal. Chem.*, **1998**, *449*, 225-229.
- ⁶¹ F. Silva, M. J. Sousa, C. M. Pereira, *Electrochim. Acta*, **1997**, *42*, 3095-3103.
- ⁶² T. Kakutani, T. Ohkouchi, T. Osakai, T. Kakiuchi, M. Senda, *Anal. Sci.*, **1985**, *1*, 219.
- ⁶³ O. Dvořák, V. Mareček, Z. Samec, *J. Electroanal. Chem.*, **1990**, *284*, 205-215.
- ⁶⁴ L. Tomaszewski, "Assisted Transfer of Heavy Metals Ions at Liquid/Liquid Interfaces: Elucidation of Transfer Mechanisms", Tese de doutoramento, Cap. II, EPFL, Lausanne, **2000**.

- ⁶⁵ J. Koryta, *Electrochim. Acta*, **1979**, *24*, 293.
- ⁶⁶ M. C. Martins, "Estudo da transferência de catiões metálicos assistida por ligandos através da interface água|1,2-DCE", dissertação para o grau de Mestre, departamento de Química, FCUP, 1994.
- ⁶⁷ P. D. Beattie, A. Delay, H. H. Girault, *J. Electroanal. Chem.*, **1995**, *380*, 167-175.
- ⁶⁸ C. M. Pereira, F. Silva, M. J. Sousa, K. Konturi, L. Murtomäki, *J. Electroanal. Chem.*, **2001**, *509*, 148-154.
- ⁶⁹ Silva, R. F., "Sensores amperométricos baseados em interfaces gel/líquido suportadas em microfuros", dissertação para o grau de Mestre, Departamento de Química, FCUP, 2002.
- ⁷⁰ C. M. Pereira, W. Schmickler, F. Silva, M. D. Sousa, *J. Electroanal. Chem.*, **1997**, *436*, 9.
- ⁷¹ P. Vanýsek, *Modern Techniques in Electroanalysis*, 1996, John Wiley & Sons, Inc., New York, cap.8, p. 350.
- ⁷² C. M. Pereira, J. M. Oliveira, F. Silva, *Nanostructured Materials and Coatings for Biomedical and Sensor Applications*, Editores; Y. G. Gogotsi, I. V. Uvarova, Kluwer Academic Publishers, 2003, p. 365-370.
- ⁷³ S. Brahim, D. Narinesingh, A. Guiseppi-Elie, *Electroanalysis*, **2002**, *14*(9), 627-633.
- ⁷⁴ http://www-biol.paisley.ac.uk/marco/enzyme_electrode/chapter2/chapter2_page4.htm.
- ⁷⁵ M. D. Osborne, H. H. Girault, *Electroanalysis*, **1995**, *7*(5), 425-434.
- ⁷⁶ http://research.chem.psu.edu/brpgroup/pka_compilation.pdf
- ⁷⁷ P. W. Atkins, *Physical Chemistry*, 6ª edição, Oxford University Press, Oxford, 1998, p. 775-777.
- ⁷⁸ Rosevear, A., Kennedy, J. F., Cabral, J. M. S., *Immobilised enzymes and cells*, Adam Hilger, Bristol, 1987.
- ⁷⁹ S. Cosnier, C. Gondran, A. L. Pellec, A. Senillou, *Anal. Letters*, **2001**, *34*, 61-70.
- ⁸⁰ B. A. Gregg, A. Heller, *Anal. Chem.*, **1990**, *62*, 258-263.
- ⁸¹ K. Sugawara, H. Fukushi, S. Hoshi, K. Akatsuka, *Anal. Sci.*, **2000**, *16*, 1139-1143.
- ⁸² M. D. Gouda, S. A. Singh, A. G. Appu Rao, M. S. Thakur, N. G. Karanth, *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*(27), 24324-24333.
- ⁸³ M. K. Weibel, H. J. Bright, *Biochem. J.*, **1971**, *124*, 801.
- ⁸⁴ A. N. Eremin, D. I. Metelisa, Z. F. Shishko, R. V. Mikhailova, M. I. Yassenko, A. G. Lobanok, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **2001**, *37*(6), 678-686.
- ⁸⁵ R. De Levie, D. Vukadin, *Electroanal. Chem. Interf. Electrochem.*, **1975**, *62*, 95-109.
- ⁸⁶ Nota de aplicação nº11, Autolab.
- ⁸⁷ Z. Figaszewski, I. Paleska, *J. Electroanal. Chem.*, **1989**, *253*-264.
- ⁸⁸ A. J. Zhang, V. I. Birss, P. Vanýsek, *J. Electroanal. Chem.*, **1994**, *378*, 63-76.
- ⁸⁹ C. Tlili, K. Reybier, A. Gélœn, L. Ponsonnet, C. Martelet, H. B. Ouada, M. Lagarde, N. Jaffrezic-Renault, *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, 3340-3344.
- ⁹⁰ E. Katz, I. Willner, *Electroanalysis*, **2003**, *15*(11), 913-947.
- ⁹¹ P. D. Beattie, A. Delay, H. H. Girault, *Electrochim. Acta*, **1995**, *40*(18), 2961-2969.
- ⁹² Nota de aplicação nº13, Autolab.

- ⁹³ C. M. Pereira, *Desenvolvimento de sensores voltamétricos com base em microinterfaces líquido-líquido suportadas em membranas*, Tese de doutoramento, Departamento Química, FCUP, Porto, 1997.
- ⁹⁴ J. Janata, M. Josowicz, P. Vanýsek, D. M. DeVaney, *Anal. Chem.*, **1998**, *70*, 179R-208R.
- ⁹⁵ J. Wang, *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 328R-332R.
- ⁹⁶ P. Mailley, S. Cosnier, L. Coche-Guérente, *Anal. Letters*, **2000**, *33*(9), 1733-1753.
- ⁹⁷ A. Heller, *J. Phys. Chem.*, **1992**, *96*, 3579-3587.
- ⁹⁸ M. Zhao, D. B. Hibbert, J. J. Gooding, *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, 593-600.
- ⁹⁹ E. Liaudet, F. Battaglini, E. J. Calvo, *J. Electroanal. Chem.*, **1990**, *293*, 55-63.
- ¹⁰⁰ Y. Kajiya, H. Sugai, C. Iwakura, H. Yoneyama, *Anal. Chem.*, **1991**, *63*, 49-54.
- ¹⁰¹ V. G. Gavalas, M. G. Fouskaki, N. A. Chaniotakis, *Anal. Letters*, **2000**, *33*(12), 2391-2405.
- ¹⁰² J. P. Lowry, R. D. O'Neill, *J. Electroanal. Chem.*, **1992**, *334*, 183-194.
- ¹⁰³ S. K. Jung, G. S. Wilson, *Anal. Chem.*, **1996**, *68*, 591-596.
- ¹⁰⁴ J. Anzai, H. Takeshita, Y. Kobayashi, T. Osa, T. Hoshi, *Anal. Chem.*, **1998**, *70*, 811-817.
- ¹⁰⁵ M. Situmorang, J. J. Gooding, D. B. Hibbert, *Anal. Chim. Acta*, **1999**, *394*, 211-223.
- ¹⁰⁶ C. Zhang, K. Wang, *Anal. Sci.*, **2002**, *35*(5), 869-880.
- ¹⁰⁷ A. A. Karyakin, E. A. Kotel'nikova, L. V. Lukachova, E. Karyakina, J. Wang, *Anal. Chem.*, **2002**, *74*, 1597-1603.
- ¹⁰⁸ M. A. McRipley, R. A. Linsenmeier, *J. Electroanal. Chem.*, **1996**, *414*, 235-246.
- ¹⁰⁹ S. Sotiropoulou, V. Gavalas, V., Vamvakaki, N. A. Chaniotakis, *Biosens. Bioelectr.*, **2003**, *18*, 211-215.
- ¹¹⁰ S. Brahim, D. Narinesingh, A. Guiseppi-Elie, *J. Mol. Catal. B*, **2002**, *18*, 69-80.
- ¹¹¹ D. G. Georganopoulou, R. Carley, D. A. Jones, M. G. Boutelle, *Faraday Discuss.*, **2000**, *116*, 291-303.
- ¹¹² H. Liu, J. Deng, *Anal. Chim. Acta*, **1995**, *300*, 65-70.
- ¹¹³ C. C. Jung, E. A. H. Hall, *Anal. Chem.*, **1995**, *67*, 2393-2400.
- ¹¹⁴ M. C. Rodríguez, G. A. Rivas, *Anal. Letters*, **2000**, *33*(12), 2373-2389.
- ¹¹⁵ M. Trojanowicz, A. Miernik, *Electrochim. Acta*, **2001**, *46*, 1053-1061.
- ¹¹⁶ T. Hoshi, H. Saiki, S. Kuwazawa, C. Tsuchiya, Q. Chen, J. Anzai, *Anal. Chem.*, **2001**, *73*, 5310-5315.
- ¹¹⁷ J. J. Gooding, P. Erokhin, D. Losic, W. Yang, V. Policarpio, J. Liu, F. M. Ho, M. Situmorang, D. B. Hibbert, J. G. Shapter, *Anal. Sciences*, **2001**, *17*, 3-9.
- ¹¹⁸ Osborne, M. D., Girault, H. H., *Electroanalysis*, **1995**, *7*(8), 714-721.
- ¹¹⁹ Osborne, M. D., Girault, H. H., *Mikrochim. Acta*, **1995**, *117*, 175-185.
- ¹²⁰ C. M. Pereira, M. Oliveira, R. M. Silva, F. Silva, *Anal. Chem.*, **2004**, *76*(18), 5547-5551.
- ¹²¹ <http://www.dojindo.com/newprod/3/metaldet/pdtdb.html>
- ¹²² J. M. A. Oliveira, *Desenvolvimento de Biossensores Enzimáticos*, Relatório de Estágio da licenciatura em Bioquímica, FCUP, Porto, 2001.

- ¹²³ H. A. Santos, *Estudos de adsorção de fosfatidilcolinas em interfaces ar-água e líquido-líquido polarizadas*, Relatório de Seminário, FCUP, Porto, 2003.
- ¹²⁴ http://www-biol.paisley.ac.uk/marco/enzyme_electrode/chapter3/chapter3_page1.html
- ¹²⁵ http://www.roche-applied-science.com/indbio_neu/industry/clinical/pdf/enzymes/s050-052.pdf
- ¹²⁶ S. Kröger, S. J. Setford, A. P. F. Turner, *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 368, 219-231.
- ¹²⁷ J. C. Miller, J. N. Miller, *Statistics for analytical chemistry*, Ellis Horwood Ltd, 2ª edição, West Sussex, 1988, p. 55.
- ¹²⁸ B. A. A. Dremel, B. P. H. Schaffar, R. D. Schmid, *Anal. Chim. Acta*, **1989**, 225, 293-301.
- ¹²⁹ K. McAteer, R. D. O'Neill, *Analyst*, **1996**, 121, 773-777.
- ¹³⁰ J. L. F. C. Lima, C. Delerue-Matos, M. C. V. F. Vaz, J. Silva, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1999**, 364, 266-269.
- ¹³¹ A. Trojanek, A. Lhotsky, V. Marecek, Z. Samec, *J. Electroanal. Chem.*, **2004**, 565(2), 243.
- ¹³² D. S. Walker, M. Brown, C. L. McFearn, G. L. Richmond, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, 108(7), 2111.
- ¹³³ M. H. M. Cacote, C. M. Pereira, L. Tomaszewski, H. H. Girault, F. Silva, *Electrochim. Acta*, **2004**, 49(2), 263.
- ¹³⁴ P. Vanýsek, I. C. Hernandez, J. J. Xu, *J. Colloid Interf. Sci.*, **1990**, 139(2), 527
- ¹³⁵ T. Osakai, K. Muto, *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 496, 95.
- ¹³⁶ Y. Kitatsuji, Z. Yoshida, H. Kudo, S. Kihara, *J. Electroanal. Chem.* **2002**, 520, 133.
- ¹³⁷ <http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts38.pdf>
- ¹³⁸ <http://www.epa.gov/chemfact/nitro-sd.txt>
- ¹³⁹ P. Vanýsek, *Electrochemistry on Liquid/Liquid Interfaces – Lecture Notes in chemistry*, vol. 39, Springer Verlag, Berlin, 1985.
- ¹⁴⁰ J. Koryta, P. Vanýsek, *Advances in Electrochemistry and Electrochemical Engineering*, vol. 12, John Wiley & Sons, New York, 1981, p. 113.
- ¹⁴¹ S. Kihara, M. Suzuki, K. Maeda, K. Ogura, M. Matsui, *J. Electroanal. Chem.*, **1986**, 210, 147.
- ¹⁴² H. Alemu, T. Solomon, *J. Electroanal. Chem.*, **1987**, 237, 113
- ¹⁴³ Z. Sun, E. Wang, *Electroanalysis*, **1989**, 1, 507.
- ¹⁴⁴ I. Paleska, J. Kotowski, M. Dupeyrat, *J. Electroanal. Chem.*, **1990**, 278, 129.
- ¹⁴⁵ Y. Cheng, D. J. Schiffrin, *J. Electroanal. Chem.*, **1996**, 409, 9.
- ¹⁴⁶ Z. Samec, A. Trojanek, E. Samcová, *J. Electroanal. Chem.*, **1995**, 386, 225.
- ¹⁴⁷ Z. Samec, J. Langmaier, A. Trojanek, *J. Electroanal. Chem.*, **1996**, 409, 1.
- ¹⁴⁸ H. Katano, M. Senda, *Anal. Sci.*, **2001**, 17, 1027-1029.
- ¹⁴⁹ Z. Samec, A. Trojanek, J. Langmaier, E. Samcová, *Electrochem. Commun.*, **2003**, 5, 867.
- ¹⁵⁰ M. J. M. Sousa, *Caracterização de Microinterfaces Gel-Solução para o Desenvolvimento de um sensor*, Dissertação Mestrado em Química, FCUP, Porto, 1996.
- ¹⁵¹ Wilder, E. A., C. K. Hall., S. A. Khan, R. J. Spontak, *Langmuir*, **2003**, 19, 6004-6013.
- ¹⁵² T. Tanaka, L. O. Hocker, G. B. Benedek, *J. Chem. Phys.*, **1973**, 59(9), 5151-5159.
- ¹⁵³ <http://www.eq.uc.pt/~leonor3/tarefa1/index.html>
- ¹⁵⁴ http://europa.eu.int/comm/environment/waste/pvc/green_paper_pvc.htm

- ¹⁵⁵ Toxicological review of vinyl chloride (CAS No. 75-01-4), EPA/635R-00/004, In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS), Washington DC, 2000.
- ¹⁵⁶ R. J. Waxweiler, A. H. Smith, H. Falk, *Environ. Health Perspect.*, **1981**, *41*, 159-165.
- ¹⁵⁷ D. J. Mercurio, R. J. Spontak, *J. Phys. Chem. B*, **2001**, *105*, 2091.
- ¹⁵⁸ E. A. Wilder, C. K. Hall, R. J. Spontak, *J. Colloid Interface Sci.*, **2003**, *267*, 509-518.
- ¹⁵⁹ M. Fahländer, K. Fucks, C. Friedrich, *J. Rheol.*, **2000**, *44*(5), 1103-1119.
- ¹⁶⁰ http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Europe_Home/Portugal.html
- ¹⁶¹ V. Sedivec, J. Flek, *Handbook of analysis of organic solvents*, John Wiley & Sons, Chichester, **1976**.
- ¹⁶² <http://www.ilo.org/public/english/protection/safework/cis/products/icsc/dtasht/>
- ¹⁶³ H. Katano, H. Tatsumi, M. Senda, *Talanta*, **2004**, *63*, 185-193.
- ¹⁶⁴ <http://physchem.ox.ac.uk/MSDS/>
- ¹⁶⁵ <http://www.asiinstr.com>
- ¹⁶⁶ http://www.fisica.uminho.pt/Pg_pessoais/mikhail/FGIII_Apontamentos_Parte2.pdf
- ¹⁶⁷ P. S. O. F. Carvalho, *Transições de fase em cristais líquidos ferroelétricos*, Tese de doutoramento, FCUP, Porto, 1998, cap. 4,
- ¹⁶⁸ R. H. Cole, *J. Chem. Phys.*, **1955**, *23*(3), 493-499.
- ¹⁶⁹ K. S. Cole, R. H. Cole, *J. Chem. Phys.*, **1941**, *341*, 9.
- ¹⁷⁰ J. Roncali, *Chem. Rev.*, **1992**, *92*, 711-738.
- ¹⁷¹ R. Singhal, A. Chaubey, K. Kaneto, W. Takashima, B. D. Malhotra, *Biotechnol. & Bioenginee.*, **2004**, *85*(3), 277-282.
- ¹⁷² A. Pelter, I. Jenkins, D. E. Jones, *Tetrahedron*, **1997**, *53*(30), 10357-10400.
- ¹⁷³ H. Meng, Z. Bao, A. J. Lovinger, B.-C. Wang, A. M. Mujsce, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 9214-9215.
- ¹⁷⁴ T. Noda, Y. Shirota, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 9714-9715.
- ¹⁷⁵ J. Hock, A. M. W. C. Thompson, J. A. McCleverty, M. D. J. Ward, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1996**, 4257-4263.
- ¹⁷⁶ J. S. Field, R. J. Hames, E. I. Lakoba, M. H. Sosabowski, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **2001**, 3352-3360.
- ¹⁷⁷ K.-T. Wong, C.-F. Wang, C. H. Chou, Y. O. Su, G.-H. Lee, S.-M. Peng, *Org. Lett.*, **2002**, *4*(25), 4439-4442.
- ¹⁷⁸ L. M. Goldenberg, A. Donat-Bouillud, M. Leclerc, M. C. Petty, *J. Electroanal. Chem.*, **1998**, *443*, 266-272.
- ¹⁷⁹ M. Rikukawa, M. Nakagawa, H. Abe, K. Ishida, K. Sanui, N. Ogata, *Thin Solid Films*, **1996**, *273*, 240-244.
- ¹⁸⁰ S. K. Sharma, R. Singhal, B. D. Mahotra, N. Sehgal, A. Kumar, *Biosens. & Bioelectron.*, **2004**, *20*(3), 651-657.
- ¹⁸¹ D.D. Baldyga, R.A. Dluhy, *Chem. Phys. of Lipids*, **1998**, *96*, 81-87.

- ¹⁸² R. A. Hann, *Molecular Structure and Monolayer Properties*, em G. Roberts, *Langmuir-Blodgett Films*, Plenum Press, New York, 1990, cap.2.
- ¹⁸³ C. Berger, *SPR and AFM Experiments on Biological Monolayers*, Foundation for Fundamental Research on Matter (FOM), Tese de Doutorado, Holanda, 1996, cap. 5.
- ¹⁸⁴ V. M. Kaganer, H. Möhwald, P. Dutta, *Rev. Modern Phys.*, **1999**, 71(3), 779-816.
- ¹⁸⁵ A. R. Balkenende, H. J. A. P. van de Boogaard, M. Schloten, N. P. Willard, *Langmuir*, **1998**, 14, 5907-5912.
- ¹⁸⁶ T. Young, *Philos. Trans. R. Soc.*, **1805**, 95, 65.
- ¹⁸⁷ KSV, contact angle, aplicação note: AN#102.
- ¹⁸⁸ J. E. Redman, Ph.D. Thesis, Universidade de Cambridge, 2000, ponto 4.3.
- ¹⁸⁹ J. Drelich, J. D. Miller, R. J. Good, *J. Colloid Interface Sci.*, **1996**, 179(1), 37-50.
- ¹⁹⁰ G. L. Mack, *J. Phys. Chem.*, **1936**, 40, 159.
- ¹⁹¹ J. Drelich, W.-H. Jang, J. D. Miller, *Langmuir*, **1997**, 13(5), 1345-1351.
- ¹⁹² C. D. Bain, E. B. Troughton, Y.-T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, R. G. Nuzzo, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 321-335.
- ¹⁹³ D. Ammann, E. Pretsch, W. Simon, E. Linder, A. Bezegh, E. Pungor, *Anal. Chim. Acta*, **1985**, 171, 119-129.
- ¹⁹⁴ <http://www.ksvltid.fi/Products/LB%20technology/KSV%20Mini/ksv%20mini.html>
- ¹⁹⁵ S. Walsh e D. Diamond, *Talanta*, **1995**, 42(4), 561-572.
- ¹⁹⁶ D. González-Salgado, J. Peleteiro, J. Troncoso, E. Carballo, L. Romaní, D. Bessièrès, *J. Chem. Eng. Data*, **2004**, 49(2), 333-338.
- ¹⁹⁷ C. M. Pereira, A. Martins, M. Rocha, C. J. Silva, F. Silva, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1994**, 90(1)-143.
- ¹⁹⁸ T. Tanaka, D. J. Fillmore, *J. Chem. Phys.*, **1979**, 70(3), 1214-1218.
- ¹⁹⁹ Paterno, L. G. et al. *Quim. Nova*, 2001, 24(2), 228-235.
- ²⁰⁰ S. Sun, P.-H. Ho-Si, D. J. Harrison, *Langmuir*, **1991**, 7, 727-737.
- ²⁰¹ D. Y. Kwok, A. W. Neumann, **1999**, 81, 167-249.
- ²⁰² J. Drelich, A. A. Atia, M. R. Yalamanchili, J. D. Miller, *J. Colloid Interface Sci.*, **1996**, 178, 720-732.
- ²⁰³ R. N. Wenzel, *Ind. Eng. Chem.*, **1936**, 28, 988-994.
- ²⁰⁴ J. R. Dann, *J. Colloid Interface Sci.*, **1970**, 32, 302.
- ²⁰⁵ S. Wu, *J. Colloid Interface Sci.*, **1979**, 71, 605.
- ²⁰⁶ A. H. Ellison, W. A. Zisman, *J. Phys. Chem.*, **1954**, 58, 503.
- ²⁰⁷ H. W. Fox, W. A. Zisman, *J. Colloid Interface Sci.*, **1952**, 7(4), 428-442.
- ²⁰⁸ B. Jańczuk, T. Białopiotrowicz, *J. Colloid Interface Sci.*, **1989**, 127(1), 189-204.
- ²⁰⁹ M. C. Petty, *Langmuir-Blodgett Films*, Editores; G. Roberts, Plenum Press, New York, 1990, cap.4.



Departamento de Química



Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Janeiro 2005