

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ

Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia

Departamento de Física e Química - Instituto de Ciências Exatas

Dissertação de Mestrado

**BIOSENSORES DE COLESTEROL BASEADOS NO  
SISTEMA POLI(ÁLCOOL  
VINÍLICO)/FTALOCIANINA**

Mayler Martins

**Orientador: Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz – UNIFEI**

**Setembro de 2006**

**Mayler Martins**

**Biossensores de Colesterol Baseados no Sistema  
Poli(Álcool Vinílico)/Ftalocianina**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da  
Universidade Federal de Itajubá, como requisito  
parcial para a obtenção do título de mestre em  
Ciências em Materiais para Engenharia.

Área de concentração: Polímeros e Cerâmicas.

**Orientador: Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz – UNIFEI**

Itajubá/MG  
Universidade Federal de Itajubá

2006



**ANEXO II**

**FOLHA DE JULGAMENTO DA BANCA EXAMINADORA**

Título da Dissertação: **"Biossensores de Colesterol Baseados no Sistema  
Poll(Álcool Vinílico) / Ftalocianina"**

Autor: **Mayler Martins**

**JULGAMENTO**

Examinadores	Conceito	Rubrica
	A = Aprovado R = Reprovado	
1º	<i>Aprovado</i>	
2º	<i>Aprovado</i>	
3º	<i>Aprovado</i>	

**Observações:**

- 1) O Trabalho será considerado Aprovado se todos os Examinadores atribuírem conceito A.
- 2) O Trabalho será considerado Reprovado se forem atribuídos pelos menos 2 conceitos R.
- 3) O Trabalho será considerado Insuficiente (I) se for atribuído pelo menos um conceito R. Neste caso o candidato deverá apresentar novo trabalho. A banca deve definir como avaliar a nova versão da Dissertação.

Resultado Final:   *A*   ou seja,   *Aprovado*  

Observações:   *O texto deverá ser revisado de acordo com as sugestões da banca.*  

Itajubá, 26 de setembro de 2006.

Prof. Dr. Carlos Frederico de Oliveira Graeff  
1º Examinador – UNESP/BAURU

Prof. Dr. Elcio Rogério Barrak  
2º Examinador – UNIFEI

Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz  
3º Examinador (Orientador) - UNIFEI



Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ**  
Criada pela Lei nº 10.435, de 24 de abril de 2002

## ANEXO I

### PRONUNCIAMENTO DA BANCA EXAMINADORA

A Banca Examinadora, abaixo assinada, nomeada pela Portaria nº 419, de 22 de setembro de 2006, considerando o resultado do Julgamento da Prova de Defesa Pública da Dissertação de Mestrado intitulada: "**Biossensores de Colesterol Baseados no Sistema Poli(Álcool Vinílico) / Ftalocianina**" apresenta pronunciamento no sentido de que o Coordenador dos Cursos de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia da Universidade Federal de Itajubá solicite ao DRA (Departamento de Registro Acadêmico) a expedição do título de **Mestre em Ciências em Materiais para Engenharia**, na Área de Concentração **Polímeros e Cerâmicas** satisfeitas as demais exigências regimentais, a **Mayler Martins**.

Itajubá, 26 de setembro de 2006.

Prof. Dr. Carlos Frederico de Oliveira Graeff  
1º Examinador – UNESP/BAURU

Prof. Dr. Elcio Rogério Barrak  
2º Examinador – UNIFEI

Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz  
3º Examinador (Orientador) - UNIFEI

Dedico este trabalho à minha  
família, em especial à minha  
irmã, Mireille Martins.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus;

À minha família, pelo constante incentivo e suporte;

Em especial, ao Prof. Dr. Álvaro A. A. de Queiroz, pelas discussões, apoio, conselhos e amizade, pelo comprometimento com minha formação pessoal e científica e por confiar em meu trabalho;

Prof. Dr. Élcio Rogério Barrak pelo fundamental auxílio nas análises térmicas, pelas boas conversas e pela amizade;

Prof. Dr. Écio J. França, pela ajuda com a modelagem molecular;

Prof. Dr. Gustavo Abel Abraham (INTEMA), Argentina, pela espectroscopia FTIR;

Prof. Dr. Demétrio Arthur Werner Soares, pela utilização do laboratório de caracterização elétrica;

Aos demais professores do curso de mestrado em Materiais para Engenharia;

Aos professores do IPEN-USP pelas análises microestruturais;

À Universidade Federal de Itajubá, pela infra-estrutura e suporte;

Aos funcionários da secretaria do ICE-UNIFEI, Matilde, Marília, Edvandra, Hélio, Roseli e Valdete;

Às funcionárias da PPG, em especial à Maria Alta;

Aos demais funcionários da UNIFEI;

Aos colegas do curso, em especial a Nirton Cristi;

Ao aluno de IC, Robson E. Faria, pela indispensável ajuda com os procedimentos experimentais;

À Jéssika Santos, pelo companheirismo, afeto e compreensão;

Aos membros da banca, pelas críticas e sugestões que valorizaram este trabalho;

À CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro;

A todos que, com seus conhecimentos, incentivos e críticas colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

## SUMÁRIO

Lista de figuras	viii
Lista de tabelas	xii
Lista de abreviaturas	xiii
Resumo	xv
Abstract	xvi
<b>CAPÍTULO 1 – ASPECTOS GERAIS DO TRABALHO</b>	<b>1</b>
1.1 – O colesterol	1
1.2 – Método clínico tradicional para dosagem de colesterol	4
1.3 – Considerações finais	5
1.4 – Referências bibliográficas	6
<b>CAPÍTULO 2 – BIOCATALIZADORES</b>	<b>7</b>
2.1 – Noções gerais	7
2.1 – Aspectos termodinâmicos dos biocatalizadores	9
2.2 – Bioquímica das reações catalisadas por enzima	13
2.3 – Métodos de imobilização de enzimas	16
2.4 – A enzima colesterol oxidase	18
2.5 – Considerações finais	20
2.6 – Referências bibliográficas	21
<b>CAPÍTULO 3 – BIOCENSORES</b>	<b>22</b>
3.1 – Conceitos fundamentais	22
3.2 – Biossensores para monitoração de colesterol	24
3.3 – Considerações finais	26

3.4 – Referências bibliográficas	27
<b>CAPÍTULO 4 – BIOFISICA DOS BIOSSENSORES</b>	<b>28</b>
4.1 – Transição sol–gel do sistema PVA/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	28
4.2 – Termodinâmica das reações químicas	31
4.3 – Temperatura de transição vítrea e fusão cristalina	33
4.4 – Estabilidade mecânica	36
4.5 – Parâmetro de solubilidade	37
4.6 – Mediadores de elétrons	38
4.7 – Considerações finais	39
4.8 – Referências bibliográficas	40
<b>CAPÍTULO 5 – FENÔMENO DE TRANSPORTE DE ÁGUA EM MEMBRANAS POLIMÉRICAS</b>	<b>42</b>
5.1 – Introdução	42
5.2 – Transição de fase volumétrica	42
5.3 – A primeira lei de Fick	45
5.4 – A segunda lei de Fick	46
5.5 – Determinação do coeficiente de difusão	49
5.6 – Mecanismo de difusão de solvente através de uma membrana polimérica	56
5.7 – Parâmetros termodinâmicos associados ao processo de difusão	57
5.8 – Densidade de reticulações	58
5.9 – Considerações finais	58
5.10 – Referências bibliográficas	59
<b>CAPÍTULO 6 – MODELAGEM MOLECULAR COMO FERRAMENTA DE PESQUISA EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS</b>	<b>61</b>
6.1 – Introdução	61
6.2 – O modelo das Partículas Independentes	62
6.3 – Aproximação de Born–Oppenheimer	63



6.4 – Aproximação de Hartree–Fock	63
6.5 – Aproximação LCAO	65
7.6 – Equações de Roothaan–Hall	67
6.7 – Limitações do modelo de Hartree–Fock	68
6.8 – Métodos semi–empíricos	69
6.9 – Modelos gráficos	70
6.10 – Considerações finais	72
6.11 – Referencias bibliográficas	72
<b>CAPÍTULO 7 – CONDUÇÃO ELÉTRICA EM POLÍMEROS</b>	<b>74</b>
7.1 – Orbitais Moleculares	74
7.2 – Transporte eletrônico em sistemas desordenados	76
7.3 – Determinação da condutividade elétrica	78
7.4 – Considerações finais	79
7.5 – Referencias Bibliográficas	80
<b>CAPÍTULO 8 – OBJETIVOS</b>	<b>81</b>
<b>CAPÍTULO 9 – MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>83</b>
9.1 – Preparo do biossensor	83
9.2 – Caracterização físico–química do biossensor	85
9.2.1 – Estudo do transporte de água em membranas de PVA	85
9.2.2 – Propriedades mecânicas e térmicas dos hidrogéis	85
9.2.3 – Caracterização espectroscópica (UV–Vis/FTIR)	90
9.2.4 – Análise microestrutural por MEV	94
9.2.5 – Transporte eletrônico em filmes de PVA/Ftc	95
9.3 – Referências bibliográficas	97
<b>CAPÍTULO 10 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>99</b>
10.1 – Caracterização físico–química do biossensor	99
10.1.1 – Análise da microestrutura por MEV	99

10.1.2 – Difusão de fluido fisiológico através da membrana	101
10.1.3 – Avaliação das propriedades mecânicas	109
10.1.4 – Caracterização térmica das membranas	116
10.1.5 – Caracterização Espectroscópica (UV/Vis, FTIR)	120
10.2 – Modelagem molecular do sistema PVA/Ftc	125
10.3 – Caracterização elétrica do biossensor	132
10.4 – Conclusões parciais	137
10.4 – Referências bibliográficas	137
<b>CAPÍTULO 11 – ANÁLISE DA PERFORMANCE DO BIOSENSOR</b>	<b>139</b>
11.1 – Análise da performance	139
11.2 – Conclusões parciais	142
11.3 – Referências bibliográficas	142
<b>CAPÍTULO 12 – PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>143</b>

## Lista de figuras

Figura 1.1: Estrutura química da molécula de colesterol (A) e estrutura obtida por modelagem molecular da molécula de colesterol (B).....	1
Figura 1.2: Colapso da parede arterial devido ao acúmulo de tecido fibro gorduroso (A).....	3
Figura 1.3: Figura esquemática das etapas envolvidas na metodologia tradicional para dosagem de colesterol no sangue.....	4
Figura 2.1: Estruturas primária (A), secundária em hélice (B), secundária em folha (C), terciária (C) e quaternária (D) das enzimas.....	8
Figura 2.2: Barreira de energia para uma reação não catalisada por enzima (A) e para uma reação catalisada por enzima (B).....	11
Figura 2.3: Mecanismo de ação enzimática segundo o modelo “chave-fechadura” (A) e a teoria do encaixe induzido (B).....	12
Figura 2.4: Efeito da concentração do substrato na velocidade de uma reação catalisada por enzima.....	13
Figura 2.5: Gráfico Lineweaver-Burk .....	15
Figura 2.6: Ilustração esquemática dos métodos de imobilização de enzimas. (A) Enzima adsorvida por uma superfície; (B) enzima ligada covalentemente a uma superfície; (C) enzima ocluída em um polímero reticulado; (D) enzima confinada por uma membrana semipermeável.....	17
Figura 2.7: Ação da enzima colesterol oxidase.....	19
Figura 2.8: Ilustração da estrutura da enzima colesterol oxidase, na forma de fitas.....	20
Figura 3.1: Representação esquemática de um biossensor: Transdutor (1), Eletrodo de trabalho (a), Matriz orgânica com enzima imobilizada (b), Eletrodo de referência (c), Amplificador (2), Processador de sinal (3) e painel análogo/digital (4).....	22
Figura 3.2: Esquema da reação amperométrica do colesterol para a colestenoa .....	25
Figura 3.3: Número de trabalhos publicados na área nos últimos cinco anos. * - Trabalhos publicados até 02 de setembro/2006. Fonte: Science Direct.....	26
Figura 4.1: Figura esquemática da transição sol-gel: (a) formação de gel particulado e (b) formação de gel polimérico.....	29
Figura 4.2: Reação de complexação do sistema PVA/Borato.....	30
Figura 4.3: Gráfico esquemático da variação do volume específico com a temperatura para um material polimérico.....	34
Figura 4.5: Estrutura da molécula de ftalocianina de cobre (Ftc).....	39
Figura 5.1: Figura esquemática do deslocamento de moléculas em uma seção transversal num fluido.....	45
Figura 5.2: Figura esquemática do deslocamento de partículas em uma seção transversal num sólido.....	47
Figura 5.3: Representação esquemática da difusão de líquido em uma membrana polimérica.....	50

Figura 5.4: Representação da extensão periódica par da condição inicial.....	52
Figura 5.4: Desenho esquemático do mecanismo de difusão “Fickiano” (A), anômalo (B) e não “Fickiano” (C).....	57
Figura 7.1: Desenho representativo da formação dos orbitais moleculares.....	74
Figura 7.2: Esquema da estrutura dos MO’s de materiais condutores (A), semicondutores (B) e isolantes (C).....	75
Figura 7.3: Mecanismos de condução possíveis em materiais desordenados .....	77
Figura 7.4: Curva <i>i</i> versus <i>V</i> típica de um material ôhmico.....	79
Figura 9.1: Ilustração esquemática do projeto do biossensor para colesterol.....	84
Figura 9.2: Fotografia do biossensor de colesterol obtido neste trabalho.....	84
Figura 9.3: Equipamento (A) e ponta de prova (B) utilizada nos ensaios de TMA.....	87
Figura 9.4: Equipamento DSC utilizado neste trabalho (INTEMA/CONICET/UnMdP).....	90
Figura 9.4: Desenho esquemático de um espectrofotômetro de duplo feixe.....	92
Figura 9.5: Espectrômetro UV/Vis Varian Serie 643 (A) e Biospectro SP-22 (B) utilizados para obtenção do espectro UV/Vis.....	94
Figura 9.6: MEV utilizado neste trabalho (IPEN/CNEN-USP).....	95
Figura 9.6: Multímetro Keithley modelo K-237 utilizado para a caracterização elétrica dos filmes de PVA, Ftc e PVA/Ftc.....	96
Figura 9.7: Câmara (A) e compartimento para amostras (B) utilizados na caracterização elétrica dos filmes de PVA, Ftc e PVA/Ftc.....	96
Figura 10.1: Micrografia MEV de uma membrana de PVA não reticulada. O filme foi seco à 25 °C sob vácuo.....	100
Figura 10.2: Micrografia MEV de uma membrana de PVA reticulada com ácido bórico. A desidratação da membrana ocorreu a 25 °C sob vácuo.....	100
Figura 10.3: Cinética de intumescimento de membranas de PVA em solução fisiológica, pH 7,4, a diferentes temperaturas: 20° C (A), 30° C (B), 40 °C (C) e 50 °C (D).....	102
Figura 10.4: Cinética de intumescimento de membranas de PVAR em solução fisiológica, pH 7,4, reticuladas por 25 min, em diferentes temperaturas: 20° C (A), 30° C (B) e 40 °C (C).....	103
Figura 10.5: Cinética de intumescimento, em solução fisiológica, pH 7,4, de membranas de PVA (A) e membranas de PVAR com diferentes tempos reticulação: 10 min (B), 25 min (C), 40 min (D) e 60 min (E).....	104
Figura 10.6: Dependência do coeficiente de difusão com a temperatura para membranas de PVAR (A) e PVA (B).....	107
Figura 10.7: Dependência do coeficiente de difusão com a densidade de reticulações das membranas de PVA.....	108
Figura 10.8: Profundidade de penetração versus tempo de exposição das membranas às forças de 0,1, 0,2 e 0,5 N para a amostra de PVAR ( $v_e=1,02 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$ ) intumescidas, à temperatura de 25°C.....	111

Figura 10.9: Profundidade de penetração versus tempo de exposição das membranas às forças de 0,1, 0,2 e 0,5 N para a amostra de PVAR ( $\nu_e = 1,09 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$ ) intumescidas, à temperatura de 25°C.....	112
Figura 10.10: Profundidade de penetração versus tempo de exposição das membranas às forças de 0,1, 0,2 e 0,5 N para a amostra de PVAR ( $\nu_e = 1,12 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$ ) intumescidas, à temperatura de 25°C.....	113
Figura 10.11: Profundidade de penetração versus tempo de exposição das membranas às forças de 0,1, 0,2 e 0,5 N para a amostra de PVAR ( $\nu_e = 1,20 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$ ) intumescidas, à temperatura de 25°C.....	114
Figura 10.12: Módulo de Young das membranas intumescidas de PVAR (20°C) em função da densidade de reticulações. O desvio padrão nos pontos é de 18,35 MPa. $\chi(\text{PVA}) = 16,18 \text{ MPa}$ .....	115
Figura 10.13: Termogramas DSC de filmes de PVA (A) e filmes reticulados de PVA: $\nu_e = 1,02 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$ (B), $\nu_e = 1,09 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$ (C), $\nu_e = 1,12 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$ (D), $\nu_e = 1,20 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$ (E).....	117
Figura 10.14: Dependência da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e da temperatura de fusão ( $T_m$ ) com a densidade de reticulações ( $\nu_e$ ) de membranas de PVA.....	118
Figura 10.15: Dependência da entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ) e porcentual de cristalinidade ( $\chi_c$ ) da densidade de reticulações ( $\nu_e$ ) de membranas de PVA.....	119
Figura 10.16: Espectro UV/Vis de soluções aquosas de Ftc, PVA e PVA/Ftc a temperatura de 25 °C.....	121
Figura 10.17: Espectro infravermelho na região de $600 \text{ cm}^{-1}$ a $2000 \text{ cm}^{-1}$ de filmes de PVA (A), PVA/Ftc 5 m/m% (B), PVA/Ftc 17 m/m% (C), PVA/Ftc 30 m/m% (D) e Ftc (E).....	123
Figura 10.18: Espectro infravermelho na região de $3500 \text{ cm}^{-1}$ a $2500 \text{ cm}^{-1}$ de filmes de PVA (A), PVA/Ftc 5 m/m% (B), PVA/Ftc 17 m/m% (C), PVA/Ftc 30 m/m% (D) e Ftc (E).....	124
Figura 10.19: Potencial de ionização mapeado numa superfície de isodensidade eletrônica para o PVA.....	126
Figura 10.20: Potencial de ionização mapeado numa superfície de isodensidade eletrônica para a Ftc.....	126
Figura 10.21: Potencial de ionização mapeado numa superfície de isodensidade eletrônica para o sistema PVA/Ftc.....	127
Figura 10.22: Superfície de potencial eletrostático para o PVA.....	127
Figura 10.23: Superfície de potencial eletrostático para a Ftc.....	128
Figura 10.24: Superfície do orbital HOMO para o PVA.....	129
Figura 10.25: Superfície do orbital HOMO para a Ftc.....	129
Figura 10.26: Superfície do orbital HOMO para o sistema PVA/Ftc.....	130
Figura 10.27: Superfície do orbital LUMO para o PVA.....	130
Figura 10.28: Superfície do orbital LUMO para a Ftc.....	131

Figura 10.29: Superfície do orbital LUMO para o sistema PVA/Ftc.....	131
Figura 10.30: Dependência de $\sigma$ com a temperatura, de filmes de PVA/Ftc com diferentes concentrações: 5 m/m % (A), 0 m/m % (B), 40 m/m % (C), 20 m/m % (D).....	134
Figura 10.31: Dependência de $\sigma$ com a concentração de Ftc, de filmes de PVA/Ftc a diferentes temperaturas: 26°C (A), 40°C (B), 55°C (C), 70°C (D).....	135
Figura 10.32: Dependência de $\Delta E$ com a concentração de ftalocianina de filmes de PVA/Ftc.....	136
Figura 11.1: Sinal obtido pelo biossensor para uma solução de colesterol com concentração de 2,58 mM, a temperatura de 37°C.....	140
Figura 11.2: Curva de calibração do sensor para colesterol.....	141

## Lista de Tabelas

Tabela 5.1: Alguns valores da função $\text{sen}(n\pi/2)$ .....	53
Tabela 9.1: Fenômenos físico-químicos determinados através de análise DSC e suas relações com a variação da entalpia.....	89
Tabela 10.1: Valores médios calculados de $n$ , e valores de $E_a$ e $H_i$ para filme de PVA e PVA reticulado.....	106
Tabela 10.2: Energias do calor de formação $\Delta H_f$ , orbitais HOMO e LUMO e largura da banda proibida, $\Delta E$ , para as moléculas de PVA, Ftc e PVA/Ftc, calculados pelo método PM3-d.....	132
Tabela 11.1: Parâmetro de solubilidade para o PVA, água e para o colesterol.....	140

## Lista de abreviaturas

- $\chi_c$  – Percentual de cristalinidade
- $T$  – Transmitância
- $\nu_e$  – densidade de reticulações
- $\Delta H$  – Variação de entalpia
- $\Delta H_f$  – Calor de formação
- $\Delta H_m$  – Entalpia de fusão
- $\Delta H_m^c$  – Entalpia de fusão do polímero 100% cristalino
- $\Delta T$  – Variação de temperatura
- [E] – Concentração de enzima
- [ES] – Concentração do complexo enzima-substrato
- [S] – Concentração de substrato
- $A$  – Absorbância
- CEs – Colesterol esterase
- COx – Colesterol oxidase
- CTC – Complexo de transferência de cargas
- $D$  – Coeficiente de difusão
- DSC – Calorimetria exploratória diferencial
- E – Enzima
- ES – Complexo enzima substrato
- $E_a$  – Energia de ativação
- EP – complexo enzima-produto
- ES – Complexo enzima-substrato
- FAD – Flavina adenina dinucleotídeo
- FH – Teoria de Flory-Huggins
- Ftc – Ftalocianina de cobre
- FTIR – Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier
- HDL – Lipoproteína de alta densidade
- $H_i$  – Entalpia associada ao intumescimento
- HOMO – Orbital molecular mais alto ocupado
- I(V) – Caracterização elétrica: monitoração da corrente elétrica I em função tensão V
- $k$  – Constante cinética de uma reação
- LDL – Lipoproteína de baixa densidade
- LUMO – Orbital molecular mais baixo desocupado
- $m$  – massa
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
- MM – Modelagem molecular
- MO – Orbitais moleculares



P – Produto

PM3 – Parametric method 3

POx – Peroxidase

PVA – Poli(álcool vinílico)

PVAR - Poli(álcool vinílico) reticulado

$R$  – Constante dos gases

S – Substrato

$T$  – Temperatura

$t$  – Tempo

$T_g$  – Temperatura de transição vítrea

$T_m$  – Temperatura de fusão cristalina

TMA – Análise termomecânica

UNIFEI – Universidade Federal de Itajubá

UV-Vis – Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível

VLDL – Lipoproteínas de densidade muito baixa

## RESUMO

---

Neste trabalho foi desenvolvido um novo biossensor para determinação de colesterol baseado na imobilização da enzima colesterol oxidase (COx) em uma matriz de poli(álcool vinílico) (PVA) reticulada com ácido bórico e com ftalocianina de cobre (Ftc) como mediador de elétrons. O biossensor foi obtido através da técnica da evaporação do solvente a partir de uma solução contendo Ftc e COx. As membranas reticuladas de PVA foram caracterizadas por calorimetria diferencial exploratória (DSC), análise termogravimétrica (TMA) e espectroscopia eletrônica (UV/Vis) e vibracional (FTIR). O transporte de água através da membrana do biossensor foi estudada. Os resultados da análise DSC e TMA indicaram que tanto a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) quanto o módulo de Young cresceram com o aumento da densidade de reticulações do hidrogel. O coeficiente de difusão de água diminuiu com o aumento da densidade de reticulações, indicando que a reticulação das membranas diminuiu a mobilidade da água na estrutura PVA/Borato. Cálculos semi-empíricos pela metodologia PM3-d foram realizados no complexo PVA/Ftc. Os parâmetros geométricos, calor de formação, potencial de ionização e orbitais HOMO-LUMO foram calculados e comparados com a o espectro vibracional (FTIR) e os resultados da caracterização elétrica. O biossensor desenvolvido foi utilizado para determinação de colesterol com grande eficiência. Sob condições ótimas, o biossensor apresentou uma resposta linear para concentrações de colesterol de 0.1 mM a 5.17 mM, com uma resposta rápida (12 s) e alta sensibilidade.

## ABSTRACT

---

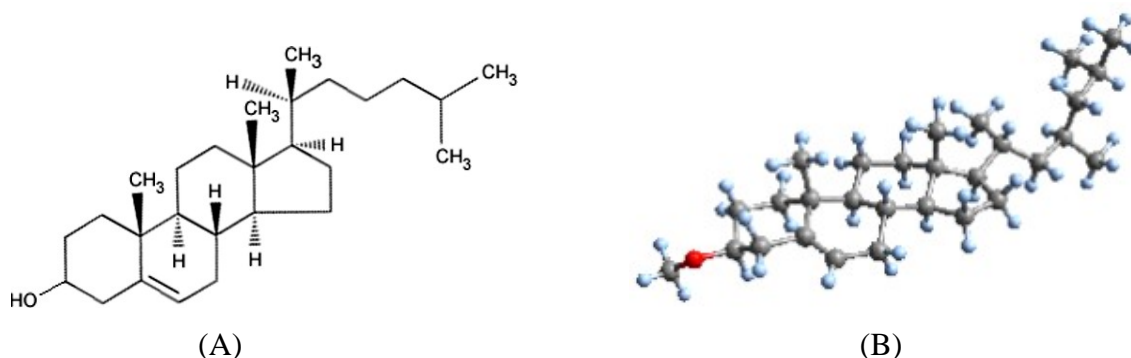
A new amperometric biosensor for the determining cholesterol based on the immobilization of cholesterol oxidase (ChOx) in a crosslinked poly(vinyl alcohol) (PVA) matrix and the charge transfer mediator copper phtahalocyanine (Ftc) is described. The biosensor was obtained by the complexation-mediated solubilization method, where Ftc was dispersed in high concentration in an organic aprotic solvent for the formation of the electron donor-acceptor complex. The crosslinked PVA membranes were characterized by differential scanning calorimetry (DSC), thermomechanical analysis (TMA), electronic spectroscopy (UV/Vis) and vibrational (FTIR) spectroscopy. The water transport through the biosensor membrane was studied by the equilibrium degree of swelling. The results of DSC and TMA indicate that both, the glass transition temperature ( $T_g$ ) and Young modulus were increased systematically with crosslinking density of the hydrogel. The water diffusion coefficient decreased with the increase in the crosslinking degree indicating that the water molecules possess a lower degree of translational mobility and are "tightly bound" in the PVA-borate complex structure. Semiempirical calculations using PM3-d have been performed on the Ftc/PVA charge transfer complex. The geometry parameters, heats of formation, ionization potential, HOMO-LUMO energy differences are also reported and compared with the vibrational (FTIR) spectra and conductivity experimental results. The developed biosensor has been used for the determination of cholesterol with an acceptable accuracy. Under optimal conditions, the biosensor shows a linear response to cholesterol in the range of 0.1 mM to 5.17 mM, with a fast response (12 s) and high sensitivity.

## CAPÍTULO 1 – ASPECTOS GERAIS DO TRABALHO

---

### 1.1 - O colesterol

Lipídios são substâncias insolúveis em água e de grande importância para o organismo humano. Os principais lipídios presentes no plasma sanguíneo são os ácidos graxos, os triglicérides e o colesterol livre e esterificado. O colesterol (Figura 1.1) é um precursor dos hormônios adrenal, ovariano e testosterona, dos ácidos biliares, da vitamina D, além de desempenhar importantes funções em membranas celulares, influenciando no estado de ativação de enzimas ligadas as membranas. Em algumas condições os lipídios podem se tornar a principal fonte de energia do organismo, como na falta absoluta de insulina, o que impede a metabolização de carboidratos.<sup>1-3</sup>



**Figura 1.1:** Estrutura química da molécula de colesterol (A) e estrutura obtida por modelagem molecular da molécula de colesterol (B).

O transporte de lipídeos no sangue é realizado por lipoproteínas. Lipoproteínas são partículas que transportam lipídeos apolares (insolúveis em água) em seu núcleo. Esses complexos são constituídos por quantidades variáveis de colesterol e seus ésteres, triglicérides, fosfolipídeos e apolipoproteínas. Devido a natureza hidrofílica da parte protéica, as lipoproteínas são solúveis em água. Com base na densidade, as lipoproteínas são classificadas como: quilomícrons, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de

alta densidade (HDL). As HDL exercem importante papel no transporte de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, onde é catabolizado e eliminado. As HDL funcionam como removedores de colesterol do sangue. Neste caso, está demonstrado pela literatura que a ocorrência de doenças cardiovasculares é maior em indivíduos com níveis reduzidos de HDL.

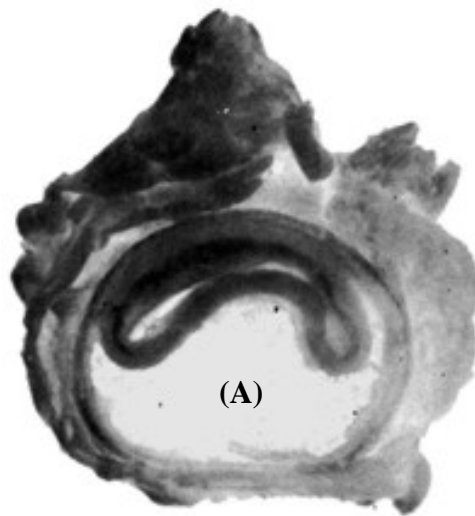
As lipoproteínas VLDL transportam colesterol e ésteres de colesterol do fígado para outros tecidos onde, através da perda de triglicerídeos, sofre a redução do tamanho da molécula e aumento da densidade, transformando em LDL. O colesterol LDL constitui dois terços do colesterol total plasmático e está diretamente relacionado a doenças vasculares.

Cerca de 25% do colesterol plasmático é proveniente da dieta e o restante é sintetizado pelo fígado. O colesterol está presente no plasma tanto na forma livre (30% do total) quanto na forma esterificada (70% do total). Nesta última forma, a molécula de colesterol está ligada a ácidos graxos. Em um indivíduo adulto, o valor de referência para o colesterol total é de 5,17 mM. O valor limítrofe é de 6,20 mM, sendo que acima deste valor, é considerado alto.

Dislipidemias são desvios anormais no valor das frações lipídicas no organismo. Os principais fatores que contribuem para a presença de valores aumentados dos níveis de colesterol HDL (hipercolesterolemia) são a ingestão de bebidas alcoólicas, ingestão de colesterol na dieta, diabetes, obesidade, hipotireoidismo e idade. Valores aumentados do colesterol HDL podem ser atribuídos também a cirrose biliar, hepatite crônica e ingestão de fármacos enquanto valores reduzidos são atribuídos ao diabetes melitos, doença renal, obesidade e sedentarismo. Valores aumentados do colesterol LDL podem ser atribuídos a anorexia nervosa, diabetes melitos e insuficiência renal. A dislipidemias podem ainda ser causadas por distúrbios genéticos, que podem se manifestar sob influencia de má alimentação, uso de medicamento ou presença de outras doenças. Valores reduzidos do colesterol são encontrados no hipertireoidismo e desnutrição crônica.

Nas últimas décadas, a desordem de uma ou mais frações lipídicas no sangue (dislipidemias) tem sido relacionadas com a mortalidade devido a doenças cardiovasculares e/ou pancreática. Estudos sugerem que cerca de 75% dos casos de enfermidade arterial coronariana (infarto do miocárdio, morte súbita) são atribuídos a três fatores principais: tabagismo, hipertensão e hipercolesterolemia. Esses mesmos fatores de risco são eficazes na aterosclerose cerebral.

A aterosclerose caracteriza-se pelo acúmulo de lipídeos dentro e ao redor das células do espaço intimal de um vaso e está associada com a proliferação celular e fibrose que provocam o seu estreitamento. O colesterol presente na parede arterial é proveniente principalmente das lipoproteínas LDL. Apesar das placas ateroscleróticas serem estruturas complexas, o colesterol-LDL pode ser apontado como uma das causas principais de sua formação. A Figura 1.2 mostra um vaso obstruído pelo acúmulo de tecido fibro gorduroso, representado pela parte mais clara da imagem.<sup>1-4</sup>



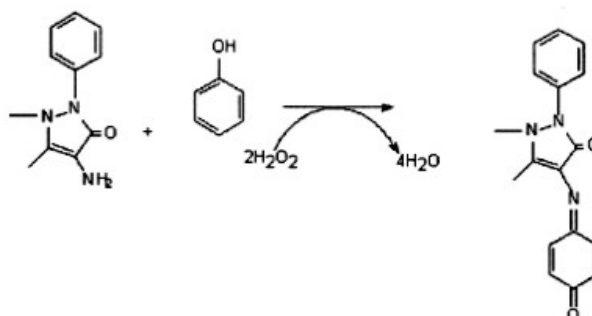
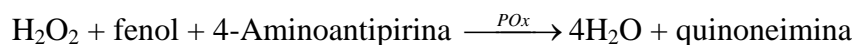
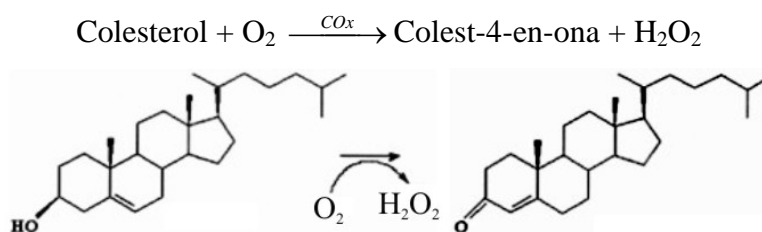
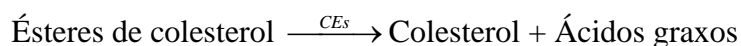
**Figura 1.2:** Colapso da parede arterial devido ao acúmulo de tecido fibro gorduroso (A).<sup>3</sup>

Atualmente existem poucos dados disponíveis na literatura quanto aos níveis de colesterol presente no sangue da população mundial, em especial sobre a brasileira. Estudos da década de 1990 indicaram que nos Estados Unidos, cerca de 41% dos indivíduos adultos possuem taxas elevadas ( $> 5,17$  mM) de colesterol no sangue, enquanto 18% dos adultos possuem um risco elevado de desenvolverem doença arterial coronariana e cerca de 7% já desenvolveram. Estudos datados de 2002, na cidade do Rio de Janeiro indicaram que, entre os indivíduos com valores mais elevados de insulina no sangue, 64,3% apresentam diagnóstico de dislipidemia.<sup>5-7</sup>

## 1.2 – Método clínico tradicional para dosagem de colesterol

Em geral, a determinação de colesterol é feita por métodos baseados em espectrofotometria na região do UV/Vis, envolvendo procedimentos complicados e de elevado custo devido à grande quantidade de enzima requerida para efetuar uma única análise.

O método tradicional enzimático-colorimétrico para determinação de colesterol total utiliza-se de soro ou plasma sanguíneo. Este método envolve uma reação de hidrólise dos ésteres de colesterol pela enzima colesterol esterase (CEs), formando colesterol livre e ácidos graxos. Em seguida, o hemometabólito sofre oxidação pela enzima colesterol-oxidase (COx), formando peróxido de hidrogênio. Este, reagindo com fenol e 4-aminoantipirina, catalisado pela peroxidase (POx) produz um complexo de cor avermelhada. A absorvância desse complexo, medida por espectrofotometria ( $\lambda=500\text{nm}$ ), é proporcional a concentração de colesterol na amostra. Estas reações se processam de acordo com a Figura 1.3, abaixo.<sup>8-9</sup>



**Figura 1.3:** Figura esquemática das etapas envolvidas na metodologia tradicional para dosagem de colesterol no sangue.

### **1.3 – Considerações finais**

O estabelecimento da relação entre os altos níveis de colesterol no sangue e o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares alerta para a necessidade do acompanhamento dos níveis de colesterol de cada indivíduo. O conhecimento do nível de colesterol sanguíneo da população permite o estabelecimento de medidas para contenção desses níveis, envolvendo a reeducação alimentar e o incentivo a prática de exercícios físicos. Entretanto, é necessária a disponibilidade de métodos rápidos, precisos e reprodutíveis para a dosagem de colesterol. Os biossensores apresentam uma alternativa interessante aos métodos tradicionais, por permitir a dosagem de colesterol com grande rapidez e sem a necessidade de mão de obra especializada e grande infra-estrutura laboratorial. As informações apresentadas neste capítulo compõem a motivação deste trabalho, que apresenta uma contribuição ao desenvolvimento de biossensores clínicos para monitoração de colesterol.

A compreensão da estrutura e mecanismo de ação dos biocatalizadores envolvidos nas reações para a quantificação de colesterol é de fundamental importância para o projeto dos biossensores, possibilitando o desenvolvimento de projetos que aproveitem ao máximo a capacidade catalítica da enzima. Estes aspectos serão abordados a seguir.



#### 1.4 – Referências bibliográficas

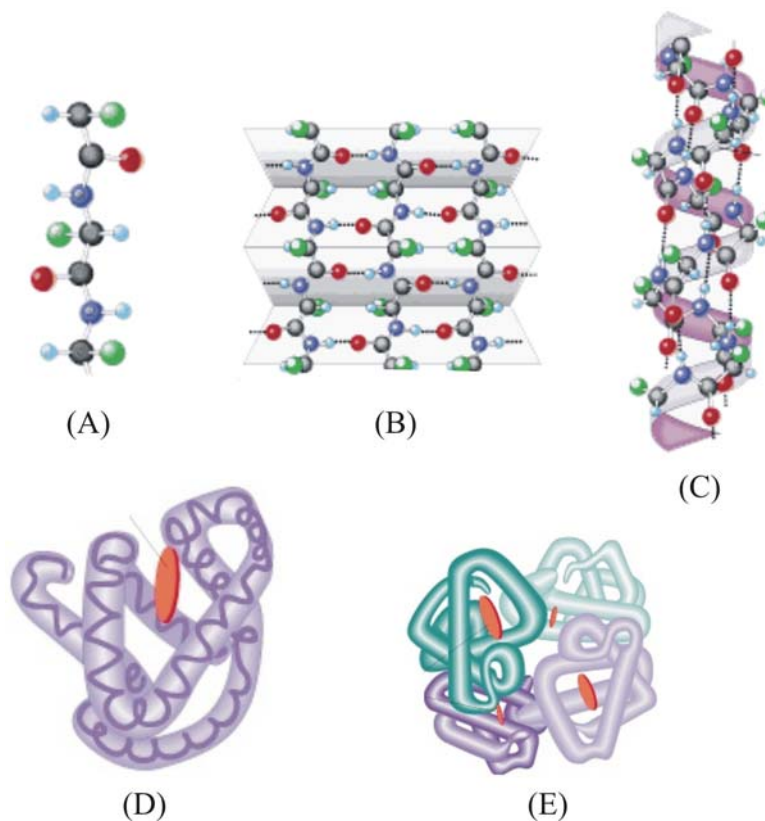
1. Motta, V. T. *Bioquímica Clínica para o Laboratório*. 4º edição. Editora médica Missau. 2003.
2. Port, C. C. *Semiologia Médica*. 4º edição. Guanabara Koogan. 2001.
3. Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. 3º edição. Sarvier. 2003.
4. Disponível em <<http://virtual01.lncc.br/monografia/monografia0/node8.html>>. Acesso em 26 agosto 2006.
5. Pearson, T. A. The epidemiologic basis for population-wide cholesterol reduction in the primary prevention of coronary artery disease. *American Journal of Cardiology*. 4 (94), 4F-8F, 2004.
6. Pearson, T. A. Population benefits of cholesterol reduction: epidemiology, economics, and ethics. *American Journal of Cardiology*. 85 (12A), 20E-3E, 2000.
7. Pozzan, R.; Pozzan, R.; Magalhães, M. E. C.; Brandão, A. A.; Brandão, A. P. Dislipidemia, Síndrome Metabólica e Risco Cardiovascular. *Revista da SOCERJ*. Abr/Mai/Jun, 97-104, 2004.
8. *Metodologia Enzimática-Colorimétrica para determinação do colesterol no soro ou plasma*. Disponível em <[www.goldanalisa.com.br/](http://www.goldanalisa.com.br/)>. Acesso em 26 agosto 2006.
9. *Colesterol – Método Enzimático*. Disponível em <[www.laborlab.com.br](http://www.laborlab.com.br/)>. Acesso em 26 agosto 2006.

## 2.1 – Noções gerais

Uma das condições fundamentais para a vida é a capacidade de catalisar reações químicas de forma eficiente e seletiva, frente a necessidade de obter energia e substâncias em um curto intervalo de tempo. Em sistemas biológicos, as moléculas encarregadas de catalisar reações são as enzimas.<sup>1,2</sup>

As enzimas são proteínas globulares e, como toda proteína, são heteropolímeros que podem ser constituídos por vinte diferentes aminoácidos. Algumas incluem em sua estrutura um grupo não-protéico. São moléculas com elevado peso molecular, variando entre 5 e 1.000 kDa. Os aminoácidos componentes das proteínas apresentam em comum um átomo de carbono ligado a uma carboxila, a um grupo amina e a um átomo de hidrogênio. O quarto grupo ligado ao carbono é uma cadeia (R), específica de cada aminoácido. O que caracteriza cada enzima é a quantidade de aminoácidos presentes em sua estrutura e a ordem em que eles se encontram.

As enzimas, graças à sua estrutura complexa, possuem um alto grau de especificidade por seus substratos e funcionam em soluções aquosas sob condições ótimas de temperatura e pH.<sup>1,3</sup> Deve-se observar que os aminoácidos reagem entre si através de seus agrupamentos carboxila e amina, formando uma estrutura polipeptídica que caracteriza a estrutura primária de uma enzima (Figura 2.1 - A). A cadeia peptídica pode se organizar em uma estrutura secundária em hélice (Figura 2.1 - B) ou em folha (Figura 2.2 - C), através do arranjo paralelo de dois ou mais segmentos de cadeias peptídicas quase totalmente distendidas, através de pontes de hidrogênio. As enzimas apresentam estas duas estruturas secundárias simultaneamente. A estrutura tridimensional que as enzimas assumem em solução é descrita pela estrutura terciária (Figura 2.2 - D). Esta estrutura é composta por dobras e enrolamentos provocadas pelas interações hidrofóbicas entre os grupos R e a água. A estrutura quaternária (Figura 2.3 - E) é a organização presente nas proteínas compostas por mais de uma cadeia polipeptídica e descreve quantos e quais monômeros compõem a molécula e como estes monômeros estão associados.



**Figura 2.1:** Estruturas primária (A), secundária em folha (B), secundária em hélice (C), terciária (D) e quaternária (E) das enzimas.<sup>2</sup>

As enzimas podem ser produzidas, industrialmente, a partir de diversas diferentes fontes. Elas podem ser extraídas de animais e plantas, porém, as principais fontes são os microorganismos. A produção a partir de fungos e bactérias permite a redução dos custos de produção, por serem uma fonte de mais fácil reposição através de uma origem segura e por oferecerem enzimas de alta pureza.

As técnicas de produção de enzimas geralmente envolvem a fermentação, para a produção de microorganismos em larga escala. A sua purificação pode ser efetuada por métodos como centrifugação, filtração e cromatografia. Atualmente, um número muito grande de enzimas possuem aplicações industriais, como nas áreas de análises químicas e clínicas, produção de detergentes, indústria alimentícia e na construção de biossensores para a monitoração de hemometabólitos.<sup>2</sup>

Para a compreensão do mecanismo de ação das enzimas, é fundamental o estudo dos fatores termodinâmicos e bioquímicos envolvidos no processo biocatalítico.

## 2.1 - Aspectos termodinâmicos dos biocatalizadores

Todos os processos que ocorrem no universo estão sujeitos às leis básicas da termodinâmica. As reações que se verificam nas células vivas não são exceções. De acordo com a primeira lei da termodinâmica, a energia não pode ser criada nem destruída. Em qualquer processo uma forma de energia pode ser convertida em outra, porém a energia total do sistema somada à de sua vizinhança permanece constante. Portanto, a primeira lei da termodinâmica é simplesmente uma lei da conservação da energia. Nada é mencionado a respeito da utilidade das diferentes formas de energia ou sobre a direção de um processo ou reação.<sup>4</sup>

A segunda lei da termodinâmica afirma que todos os processos que ocorrem naturalmente evoluem numa direção que leva a um nível mínimo de energia potencial, isto é, a uma posição de equilíbrio estável. Essas reações espontâneas liberam energia à medida que tendem ao equilíbrio e, teoricamente, a energia pode ser utilizada para produzir trabalho. A variação total de energia do sistema,  $\Delta G$ , é denominada energia Livre de Gibbs. O valor de  $\Delta G$ , dado pela Equação 2.1, indica o sentido da reação: se menor que zero, a reação ocorre espontaneamente. O fato de uma reação apresentar  $\Delta G < 0$  não significa que a reação se processa a alta velocidade.

$$\Delta G = -RT \ln k \quad (2.1)$$

A velocidade de qualquer reação química homogênea depende da frequência das colisões entre as moléculas que reagem entre si. A frequência das colisões, por sua vez, é influenciada pela concentração de moléculas reagentes, como também pela sua energia cinética. Por sua vez, a energia cinética das moléculas é influenciada pela temperatura. A frequência de colisões não é igual à velocidade da reação, pois somente uma pequena parcela das colisões ocorre com energia suficiente para provocar a reação. A energia mínima para que uma reação ocorra é chamada de energia de ativação,  $E_a$ .

A relação entre  $E_a$  e a temperatura foi formulada empiricamente por Arrhenius em 1887. A relação, denominada como equação de Arrhenius, é geralmente descrita como:<sup>5</sup>

$$k = Ae^{-E_a/RT} \quad (2.2)$$

Em sua forma linear, esta equação é escrita na seguinte forma:

$$\log k = -\frac{E_a}{2,3RT} + \log A \quad (2.3)$$

e em sua forma integrada:

$$\log \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_a}{2,3R} \left( \frac{T_2 - T_1}{T_2 T_1} \right) \quad (2.4)$$

sendo  $k_2$  e  $k_1$  as constantes de velocidade específicas da reação a  $T_2$  e  $T_1$ , respectivamente.

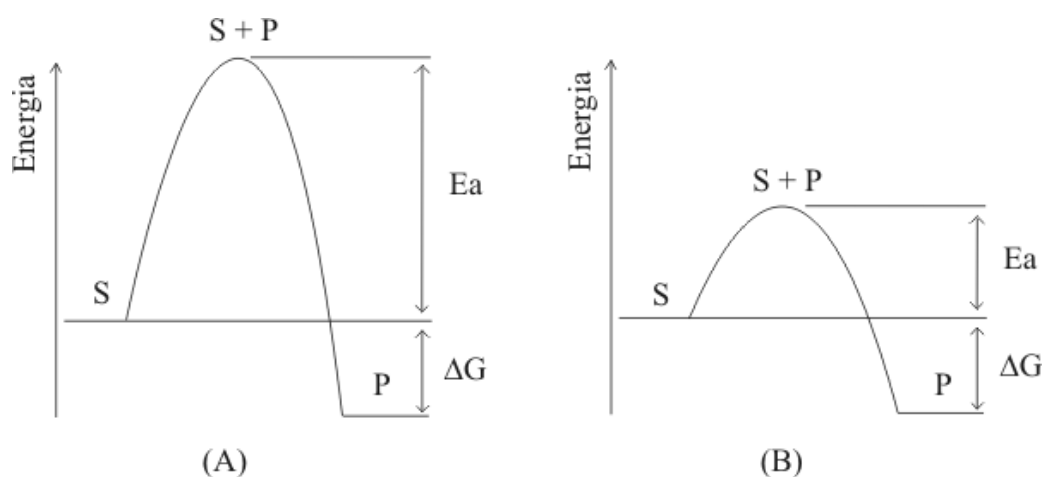
No intuito de explicar a necessidade de uma energia mínima,  $E_a$ , para que uma reação possa se processar, Fyring em 1935, propôs que uma molécula reagente de um substrato (S) deveria ultrapassar uma barreira energética passando por um estado de transição antes de se transformar no produto (P) da reação (Figura 2.1). Moléculas reagentes que atingem apenas uma fração da energia de ativação necessária simplesmente retornam ao seu estado inicial. O estado de transição é visto como uma fase a meio caminho, onde as ligações e orientações são distorcidas. Uma vez que os reagentes adquirem energia para ultrapassar a barreira energética e atingem o estado de transição, eles prosseguem para formar os produtos da reação com uma velocidade que independe da temperatura e da natureza dos reagentes, isto é, os reagentes passam para o outro lado da barreira energética, em direção a um estado de menor valor energético. No caso de uma reação catalisada por uma enzima (E), a reação passa por estados intermediários constituídos pelos complexos enzima substrato (ES) e enzima produto (EP). Esta reação pode ser representada pela seguinte relação:<sup>1,3,5,6</sup>



Na presença de uma enzima apropriada, à temperatura ambiente uma quantidade suficiente de moléculas reagentes possuem a energia de ativação necessária para ultrapassar a barreira. Neste caso, as enzimas possuem uma eficiência catalítica extraordinária. Uma reação catalisada por uma enzima pode ser processar a 25°C,  $10^8$  a  $10^{11}$  vezes mais rapidamente que a mesma reação não catalisada.

Ressalta-se que as enzimas não afetam o  $\Delta G$  ou  $k_{eq}$  de uma reação. Elas apenas reduzem a energia de ativação, aumentando a velocidade com a qual a reação alcança o equilíbrio. O gráfico apresentado pela Figura 2.1 ilustra a energia de uma reação catalisada e não catalisada por enzima.

Embora a enzima participe da seqüência da reação, ela não sofre nenhuma transformação. Desta forma, poucas moléculas de enzima são capazes de catalisar a conversão de milhares de moléculas de substrato (S) em produto (P).



**Figura 2.2:** Barreira de energia para uma reação não catalisada por enzima (A) e para uma reação catalisada por enzima (B).

A precisão da estrutura enzimática, com geometria apropriada e com grupos funcionais localizados em posições particulares a torna de grande especificidade. Para que a catálise ocorra, o reagente ou substrato deve-se ligar à molécula da enzima em uma região específica, chamada sítio ativo.

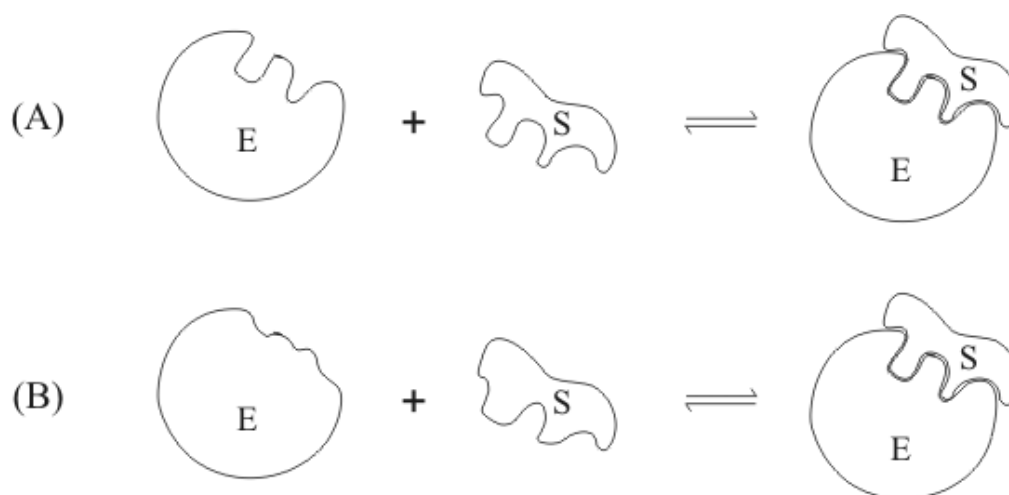
O sítio ativo é uma cavidade de forma definida constituída de grupos R de aminoácidos próximos uns dos outros, aberta na superfície da molécula globular da enzima. Para ser reconhecida como um substrato, uma molécula deve possuir a forma apropriada para acomodar-se no sítio ativo e grupos químicos capazes de se ligar aos grupos R ali presentes. Daí vem a alta especificidade das enzimas.<sup>1,3,7</sup>

O alto grau de especificidade das enzimas levou Emil Fischer, em 1894, a introduzir a noção de que as interações entre uma enzima e seu substrato seriam complementares, através do bem conhecido modelo “chave-fechadura” (Figura 2.3 - A). Este modelo considera tanto o substrato (chave) quanto a enzima (fechadura) como entidades rígidas, o que não representa a realidade. A flexibilidade da estrutura enzimática é um dos fatores que permite que moléculas estruturalmente semelhantes

apresentem conformações e orientações relativas distintas no sítio de ligação do receptor e, em consequência, atividades e afinidades também diferentes.

Koshland e colaboradores propuseram uma hipótese, conhecida como teoria do encaixe induzido na qual, através da complexação, o substrato induz uma mudança conformacional na subunidade da enzima com a qual interage, isto é, posiciona resíduos de aminoácidos em uma posição espacial correta para ligação do substrato. Esta mudança conformacional pode ser transmitida às subunidades vizinhas, induzindo na enzima a conformação responsável pelo processo catalítico (Figura 2.3 - B).

Ao mesmo tempo as enzimas possuem a propriedade de reconhecer uma ou um conjunto de conformações do substrato. Este, ao provocar uma mudança conformacional na enzima, pode estar induzindo-a a adotar a conformação responsável pelo seu reconhecimento. Assim como a enzima, o substrato tem a sua conformação tencionada e distorcida. Este é o mecanismo que leva a alta eficiência da catalise produzidas pelas enzimas.



**Figura 2.3:** Mecanismo de ação enzimática segundo o modelo “chave-fechadura” (A) e a teoria do encaixe induzido (B).

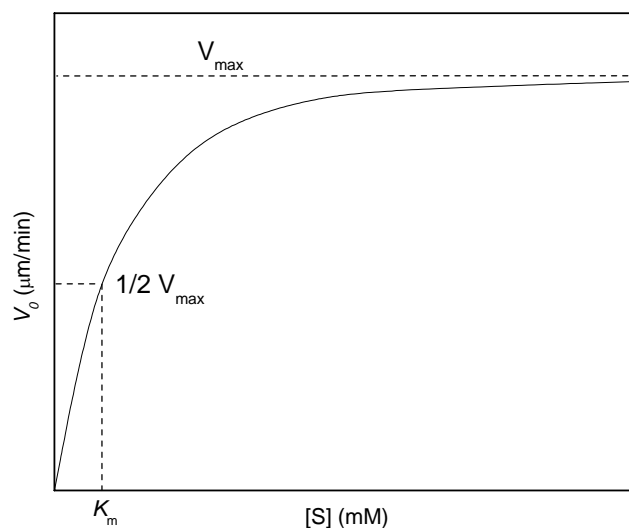
Para a compreensão dos mecanismos de uma reação catalisada por uma enzima, é de grande importância o estudo da velocidade da reação e como ela se altera em função de mudanças nos parâmetros experimentais. Um dos principais fatores que

influenciam na velocidade de uma reação *in vitro* catalisada por enzima é a concentração do substrato.

## 2.2 – Bioquímica das reações catalisadas por enzimas

Uma das formas de compreender a bioquímica das reações catalisadas pelas enzimas é através do estudo da velocidade da reação. A velocidade da reação sofre forte influencia da concentração do substrato. Entretanto, estudar os efeitos da concentração do substrato é complicado devido ao fato de [S] variar durante o curso da reação, enquanto o substrato se transforma em produto. Uma abordagem simplificada para o estudo da cinética de uma reação enzimática é medir a velocidade inicial  $V_0$  quando [S] é muito maior que a concentração da enzima [E]. Desta forma, para um tempo curto, as variações em [S] serão desprezíveis.<sup>1,3,6</sup>

A Figura 2.4 mostra o efeito de [S] sobre  $V_0$ . O aumento de  $V_0$  é aproximadamente linear para baixas [S]. A medida que [S] cresce,  $V_0$  cresce a taxas cada vez menores, até alcançar um valor de [S] em que não existe variação significativa no valor de  $V_0$ . Este valor de  $V_0$  é muito próximo da velocidade máxima,  $V_{máx}$ .



**Figura 2.4:** Efeito da concentração do substrato na velocidade de uma reação catalisada por enzima.



O complexo ES desempenha um papel fundamental para a compreensão do comportamento cinético da reação. Em 1913, Michaelis e Maud Menten desenvolveram uma teoria geral da ação enzimática. Eles postularam que a ação enzimática se dá em etapas, se iniciando pela rápida formação de um complexo reversível enzima-substrato:



A segunda etapa, mais lenta, é a quebra do complexo ES liberando a enzima livre e o produto, P, da reação:



A segunda reação, por ser mais lenta, limita a velocidade da reação enzimática. Desta forma, a velocidade da reação deve ser proporcional a [ES].

A relação entre [S] e  $V_0$  (Figura 2.4) possui a mesma forma geral para todas as enzimas. Michaelis e Menten deduziram a forma algébrica desta relação considerando a hipótese básica de que, no estado estacionário, a velocidade da reação é limitada pela quebra do complexo ES. Esta relação, denominada equação de Michaelis-Menten, é a equação da velocidade de uma reação enzimática com um único substrato, e é dada pela relação a seguir:<sup>1</sup>

$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]}{k_m + [S]} \quad (2.8)$$

onde  $k_m$  é chamada de constante de Michaelis-Menten e é dada por:

$$k_m = \frac{(k_2 + k_{-1})}{k_1} \quad (2.9)$$

Nesta equação, a velocidade inicial,  $V_0$ , a velocidade máxima,  $V_{máx}$ , e a concentração do substrato, [S], estão relacionados pela constante de Michaelis-Menten.

A constante  $k_m$  possui unidade de concentração. Esta constante permite a avaliação da afinidade de uma enzima por um substrato. De acordo com a equação 2.9,  $k_m$  varia inversamente proporcional a afinidade da enzima pelo substrato.

Uma relação interessante pode ser obtida para o caso especial em que  $V_0$  vale exatamente a metade de  $V_{máx}$ :

$$V_0 = \frac{V_{máx}}{2} \quad (2.10)$$

Substituindo a Equação 2.10 na equação de Michaelis-Menten e dividindo por  $V_{m\acute{a}x}$ , obtemos a seguinte relaao:

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{k_m + [S]} \quad (2.11)$$

Solucionando esta equaao em termos de  $K_m$ , obtemos:

$$K_m = [S] \quad (2.12)$$

Desta forma,  $K_m$  pode ser interpretado como sendo a concentraao de substrato quando  $V_0$  equivale a  $1/2 V_{m\acute{a}x}$ .

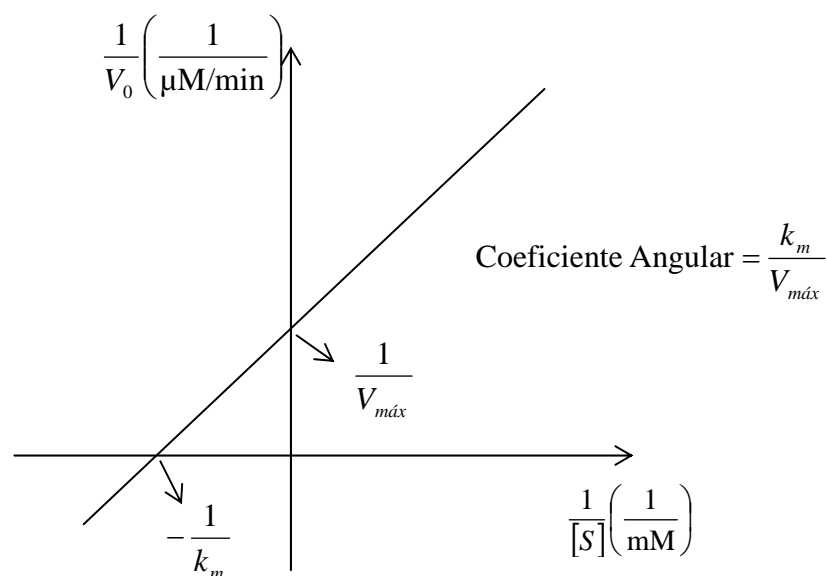
A equaao de Michaelis-Menten pode ser linearizada algebricamente de modo a permitir a determinaao experimental de  $k_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  atraves de metodos gráficos. Uma simples transformaao e a inversao da equaao, da seguinte forma:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{k_m + [S]}{V_{m\acute{a}x} [S]} \quad (2.13)$$

Atraves de simples transformaoes algebricas, esta equaao pode ser escrita na forma:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{k_m}{V_{m\acute{a}x} [S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (2.14)$$

Esta forma da equaao de Michaelis-Menten e chamada de equaao de Lineweaver-Burk e permite que  $k_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  sejam determinados graficamente, atraves de uma curva  $1/V_0$  versus  $1/[S]$ , como mostrado pela Figura 2.5.



**Figura 2.5:** Gráfico Lineweaver-Burk.

Em um biossensor para monitoração de colesterol, a enzima colesterol oxidase tem a função de catalisar a reação de oxidação do colesterol, produzindo peróxido de hidrogênio. Em um biossensor, a enzima se encontra imobilizada em uma matriz orgânica ou inorgânica. Este fato exerce influencia direta na velocidade da reação enzimática devido à menor disponibilidade de substrato provocada pela necessidade do analito (substrato) se difundir para o interior da matriz onde a enzima está imobilizada. Em uma reação com enzima imobilizada,  $[S]$  tende a ser menor que em uma reação com enzima livre. Portanto, de acordo com a equação de Michaelis-Menten (Equação 2.19), a velocidade da reação enzimática será menor. A metodologia utilizada para a imobilização da enzima no dispositivo exerce influência direta no acesso do substrato à enzima e determina a velocidade com que a reação enzimática irá ocorrer. Em consequência, o tempo de resposta do biossensor está relacionado à metodologia de imobilização da enzima.

### **2.3 - Métodos de imobilização de enzimas**

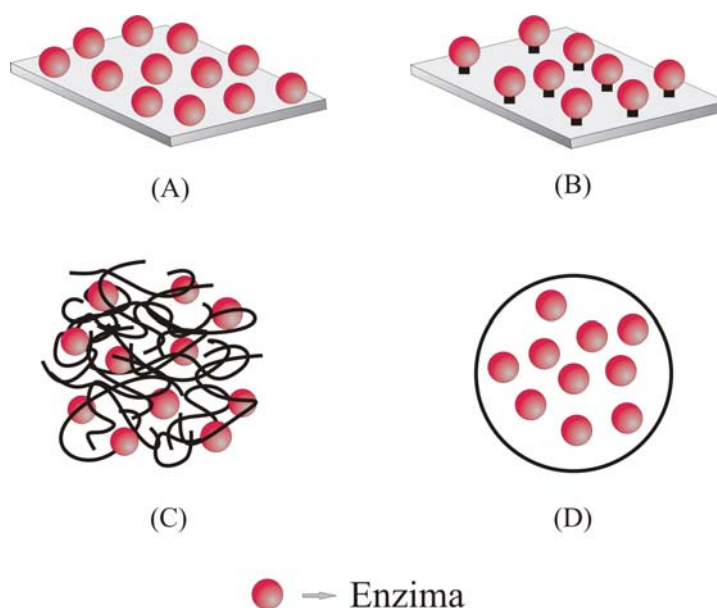
A performance do biossensor está relacionada ao processo de imobilização da enzima, o biocatalizador responsável pela reação química na superfície do eletrodo. Com a imobilização há um aumento da estabilidade da proteína devido ao menor grau de liberdade, menor sensibilidade a interferentes e maior estabilidade quanto às mudanças de pH e elevação de temperatura.

As matrizes para imobilização de enzimas usualmente são polímeros inertes ou materiais inorgânicos insolúveis em água. A matriz utilizada deve permitir a rápida difusão do substrato e produto através de si.

Os principais métodos de imobilização enzimática são a adsorção física em um transdutor, ligação covalente, a oclusão (encapsulamento) em polímero reticulado ou imobilização em uma membrana semipermeável.<sup>2,9</sup> Estes métodos são ilustrados pela Figura 2.6.

A adsorção de enzimas em suportes insolúvel é um método simples e de grande aplicabilidade. Neste método, a força motriz para a ligação da enzima ao suporte é geralmente fornecida pela combinação de efeitos hidrofóbicos com a formação de diversas ligações por molécula de enzima. O método de imobilização por adsorção, apesar da simplicidade, não permite uma boa aderência da enzima ao suporte, devido à natureza da força de interação deste com a enzima.

O método da ligação covalente consiste na formação de ligações químicas entre o substrato e a enzima. Estas ligações são geralmente feitas pela reação de grupos funcionais específicos da enzima, os quais não são essenciais para a sua atividade catalítica e não prejudicam a ação de seu sítio ativo. Normalmente são utilizados grupos reativos específicos presentes no eletrodo sendo, portanto, necessário um conhecimento prévio da estrutura química da enzima e da natureza da superfície do eletrodo.



**Figura 2.6:** Ilustração esquemática dos principais métodos de imobilização de enzimas. (A) Enzima adsorvida por uma superfície; (B) enzima ligada covalentemente a uma superfície; (C) enzima ocluída em um polímero reticulado; (D) enzima confinada por uma membrana semipermeável.

A imobilização através da oclusão em um polímero reticulado é uma metodologia conveniente para processos que envolvem substratos de baixo peso molecular. Este método proporciona uma maior estabilidade quanto à alterações do microambiente da enzima. A enzima não sofre nenhuma alteração em sua estrutura. Entretanto é necessário um rigoroso controle do processo de síntese da matriz a fim de preservar a atividade catalítica da enzima. Neste processo de imobilização, a atividade

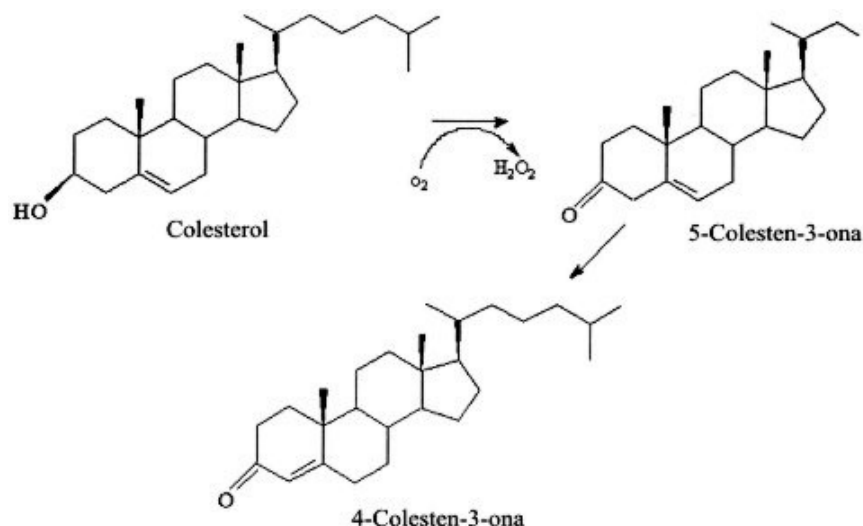
enzimática pode ser prejudicada devido à necessidade do substrato se difundir através da matriz.

A imobilização em membranas semipermeáveis consiste em envolver o biocatalizador em uma membrana impermeável às enzimas, mas que permitam a difusão do substrato e produto. Este método permite a imobilização simultânea de uma grande variedade de enzimas tornando possível a ocorrência de reações que envolvem muitas etapas.

Com o processo de imobilização, a atividade enzimática pode ser prejudicada devido a efeitos difusionais do substrato no suporte ou a efeitos eletrostáticos entre o substrato e o suporte. Neste trabalho, foi realizada a imobilização da enzima colesterol oxidase em uma matriz polimérica através do método de oclusão. Desta forma, é importante conhecer as principais propriedades desta enzima, o que permitirá o desenvolvimento de um biossensor que explore a sua máxima atividade, através da criação de um micro ambiente favorável a ação enzimática.

#### **2.4 – A enzima colesterol oxidase**

Atualmente está bem estabelecida a relação entre os altos níveis de colesterol na corrente sanguínea e o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A necessidade de métodos precisos e reprodutivos para determinação da concentração de colesterol tem motivado muitos trabalhos nos últimos anos. Os métodos analíticos convencionais e os biossensores para quantificação de colesterol, geralmente utilizam três e duas enzimas, respectivamente. Cerca de 70% do colesterol existente no plasma sanguíneo se encontra na forma esterificada. Assim, o procedimento típico para determinação do colesterol total geralmente se inicia pela quebra dos ésteres de colesterol pela enzima colesterol esterase, produzindo colesterol livre e ácidos graxos. As moléculas de colesterol podem então sofrer a ação da enzima colesterol oxidase, produzindo 4-colesten-3-ona e peróxido de hidrogênio, como ilustrado na Figura 2.7.<sup>9</sup>



**Figura 2.7:** Ação da enzima colesterol oxidase.

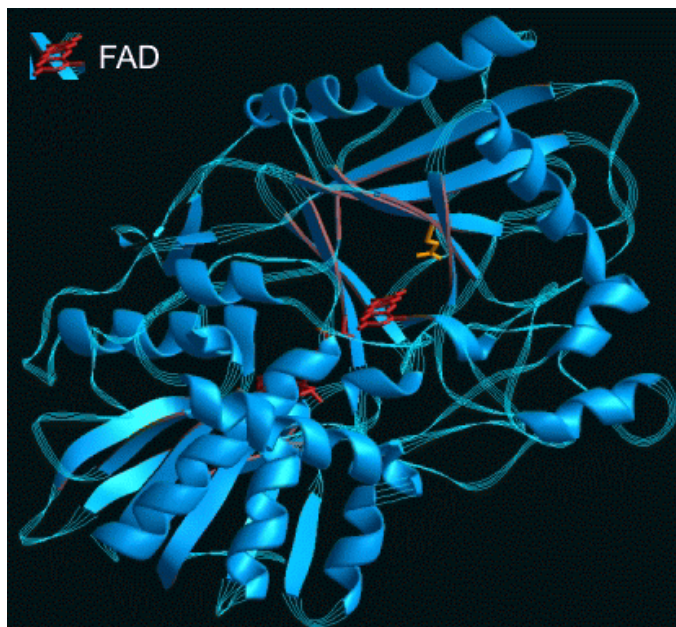
A colesterol oxidase (COx) pode ser sintetizada através de uma grande variedade de microorganismos, em ambientes completamente distintos. Turfitt, em 1994, foi o primeiro a isolar a enzima, a partir do micróbio *Nacordia erythropolis* e demonstrar seu efeito na oxidação do colesterol.<sup>9</sup> Desde então, a enzima foi encontrada e isolada a partir de um grande número de microorganismos, em especial a partir da *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Nacordia erythropolis*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* e *Rhodococcus sp.*, entre outros. Alguns microorganismos estocam a enzima em membranas intracelulares, enquanto outros a dispersam em seu meio de cultivo. Algumas linhagens de microorganismos são capazes de promover a oxidação do colesterol a taxas superiores a 70%.

O custo da enzima colesterol oxidase se mantém relativamente alto devido, principalmente, à baixa produtividade dos microorganismos e pela necessidade de adição de colesterol ao meio de cultura para induzir o aumento da produção da enzima.

As propriedades físicas da COx varia de acordo com o microorganismo de origem. Em geral a atividade da COx é ótima à temperatura de 37 °C e pH neutro em solução aquosa. Dependendo da origem, a COx pode apresentar melhor estabilidade térmica e atividade ótima em intervalos de pH entre 4 e 10.<sup>9</sup>

A COx é uma macromolécula de alto peso molecular, em torno de 60 kDa, com um pequeno centro ativo localizado nas proximidades do centro da estrutura. O centro ativo contém um cofator, que é um colaborador não protéico necessário para a

atividade enzimática. Na COx o cofator é constituído por Flavina Adenina Dinucleótido (FAD). A estrutura da COx é apresentada pela Figura 2.8.



**Figura 2.8:** Ilustração da estrutura da enzima colesterol oxidase, na forma de fitas.<sup>11</sup>

## 2.5 – Considerações finais

Em um biossensor enzimático para determinação de colesterol, o papel principal da enzima é realizar a catálise da conversão do colesterol em 4-colesten-3-ona. Esta conversão produz peróxido de hidrogênio. A atividade enzimática, em um biossensor, é altamente influenciada pela matriz utilizada para a imobilização da enzima, bem como pela metodologia de imobilização utilizada. A matriz deve oferecer proteção contra condições ambientais, como pH e temperatura, desfavoráveis a estabilidade da enzima.

Outro ponto importante do projeto de um biossensor é a forma de transdução do sinal gerado pelo eletrodo. Este é o assunto discutido no próximo capítulo.

## 2.6 – Referências bibliográficas

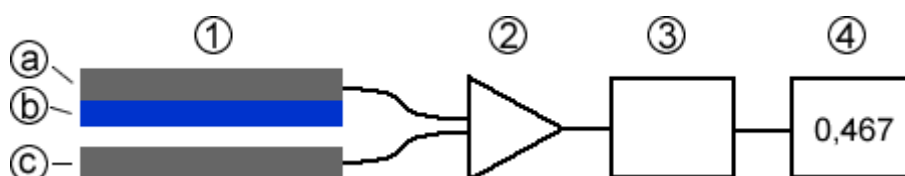
1. Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. 3ª edição. São Paulo: Sarvier. 2002.
2. *Enzyme Technology*. Disponível em: <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/>. Acesso em 06 de junho de 2005.
3. Borzani, W.; Schmidell, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E. *Biotecnologia Industrial*; Volume I; Fundamentos. 1ª Edição. São Paulo: Edgard Blucher. 2001.
4. Abbott, M. M.; Ness, H. C. *Termodinâmica*. Lisboa: McGraw-Hill. 1992.
5. Júnior, A. F. *Cinética Enzimática*. 2001. Disponível em < [www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc\\_eng\\_bioq/lista\\_exerc/cinetica\\_enzimatica.pdf](http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/lista_exerc/cinetica_enzimatica.pdf) >. Acesso em 14 agosto 2006.
6. *Introduction to Enzyme Kinetics*. Disponível em <<http://orion1.paisley.ac.uk/kinetics/contents.html>>. Acesso em 09 agosto 2006.
7. Verli, H.; Barreiro, E. J. Um Paradigma da Química Medicinal: A Flexibilidade Dos Ligantes e Receptores. *Química Nova*. 28 (1), 95-102, 2005.
8. Arroyo, M. *Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones*. Disponível em <<http://www.ugr.es/~ars/abstract/arroyo.pdf>>. Acesso em 28 agosto 2006.
9. MacLachlan, J. Wotherspoon, A. T. L.; Ansell, R. O.; Brooks, C. J. W. Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 72, 169-195, 2000.
10. Marafon, E.; Kubota, L. T., Gushikem, Y. *Comportamento eletroquímico de Flavina Adenina Dinucleótido adsorvida em SiO<sub>2</sub>/ZrO<sub>2</sub>/C-Grafite*. Disponível em < <https://sec.s bq.org.br/cd29ra/resumos/T0866-1.pdf>>. Acesso em 18 agosto 2006.
11. Disponível em <<http://www.biochem.szote.u-szeged.hu/astrojan/prot1t.htm>>. Acesso em 12 julho 2006.



### 3.1 - Conceitos fundamentais

Biossensores são dispositivos compostos por semicondutores que estão intimamente ligados a um componente biológico, geralmente uma enzima imobilizada, e que é utilizado para medir a concentração de um substrato específico. O sinal gerado pelo dispositivo é diretamente proporcional à concentração do metabólito no fluido biológico.

A Figura 3.1 mostra um diagrama esquemático de um biossensor. Um transdutor é composto por um eletrodo de trabalho (a), uma matriz orgânica ou inorgânica contendo uma enzima imobilizada sobre o eletrodo de trabalho (b) e um eletrodo de referência (c). Um analito, ao entrar em contato com o transdutor, desencadeia uma reação química gerando um sinal digitalizado pelo transdutor. A digitalização converte a reação química em um sinal elétrico. O sinal gerado pelo transdutor é então amplificado (2), processado (3) e apresentado (4).



**Figura 3.1:** Representação esquemática de um biossensor: Transdutor (1), Eletrodo de trabalho (a), Matriz orgânica com enzima imobilizada (b), Eletrodo de referência (c), Amplificador (2), Processador de sinal (3) e painel análogo/digital (4).

Os biossensores são desenvolvidos para as mais diversas aplicações em biotecnologia, incluindo análises clínicas e biomédicas, monitoração de processos fermentativos, e análises ambientais.

A indústria de alimentos e farmacêutica tem grande necessidade de métodos rápidos para estimar o tempo de vida, deterioração e contaminação de seus produtos. Abre-se então a possibilidade do monitoramento contínuo “on line” de metabólitos, drogas e proteínas.

Os biossensores eletroquímicos se destacam quanto à utilização nas áreas acima mencionadas. Os tipos mais comuns de biossensores são os potenciométricos, amperométricos, óticos e os calorimétricos.<sup>1,2,3</sup>

O biossensor potenciométrico envolve a medida da diferença de potencial entre um eletrodo de trabalho e um de referência. A interface da superfície mediadora do transdutor gera uma espécie carregada, onde um eletrodo sensível a esta espécie produzirá um sinal elétrico de diferença de potencial relacionado à espécie carregada. O transdutor pode ser um eletrodo íon seletivo, que é um sensor eletroquímico baseado em filmes finos ou membranas seletivas. A diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e de referência é proporcional ao logaritmo da atividade iônica, ou concentração, como descrito pela equação de Nernst-Donnam (Equação 3.1).

$$E = E_0 - \frac{RT}{zF} \ln([i]) \quad (3.1)$$

sendo  $E$  o potencial lido,  $E_0$  uma constante característica da membrana seletiva do biossensor,  $R$  a constante dos gases,  $T$  a temperatura absoluta,  $z$  a carga iônica,  $F$  a constante de Faraday e  $[i]$  é a concentração da espécie iônica livre, ou seja, a concentração do analito.

Um biossensor amperométrico é baseado na medida da corrente produzida pela oxidação ou redução eletroquímica de uma espécie eletroativa. Estes biossensores são geralmente construídos através de um eletrodo de trabalho e um de referência construídos de Pt, Au ou C. O eletrodo polarizado produz uma corrente elétrica relacionada à concentração da espécie eletroativa. Estes biossensores apresentam maior sensibilidade, rapidez e precisão em relação aos potenciométricos e apresentam resposta linear em uma faixa mais ampla de concentração do analito, sendo o mais empregado. A corrente  $i$  produzida por um biossensor amperométrico está relacionada com a taxa da reação  $v_A$  pela seguinte expressão:

$$i = nFAv_A \quad (3.2)$$

sendo  $n$  o número de elétrons transferido,  $A$  a área do eletrodo e  $F$  a constante de Faraday. Desta forma, a corrente elétrica produzida é proporcional a concentração do analito.

Um biossensores ótico é geralmente constituído por uma enzima ligada a um cromóforo que por sua vez está ligado a uma membrana. Uma alteração de pH gerada pela reação enzimática altera a cor do complexo cromóforo/membrana. O sistema transdutor consiste em um simples fotodiodo acoplado ao sistema.

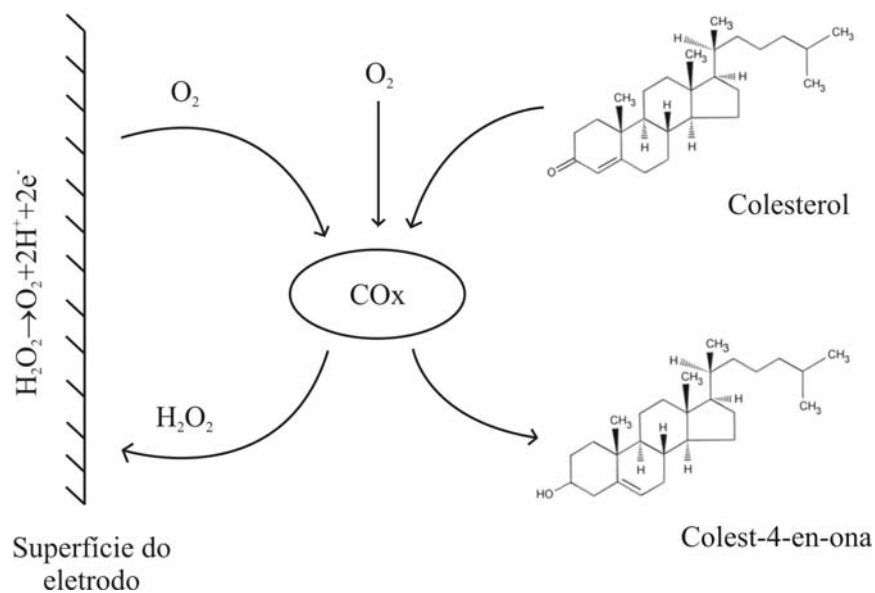
Os biossensores calorimétricos utilizam um dispositivo termistor capaz de registrar as pequenas diferenças de temperatura produzidas por uma reação bioquímica. Geralmente é obtida uma resposta linear da temperatura em função da concentração do analito, com variações de temperatura entre  $1 \times 10^{-2}$  e  $1 \times 10^{-3}$  °C.

### 3.2 – Biossensores para monitoração de colesterol

Biossensores para determinação de colesterol são uma ótima alternativa relativamente aos métodos convencionais, por possuir alta estabilidade operacional, resposta rápida e baixo custo. Estes biossensores são construídos através da imobilização da enzima colesterol oxidase em uma matriz na superfície de um eletrodo. A função da enzima colesterol oxidase é catalisar a reação de oxidação do colesterol, gerando peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, ao entrar em contato com a superfície do eletrodo, se dissocia, doando elétrons ao eletrodo segundo a reação:



Os eletrodos de trabalho e de referência são mantidos sob um potencial de aproximadamente 0,6 mV. A corrente gerada pela reação é proporcional a concentração de colesterol no analito, que pode ser quantificada através de uma curva de calibração. A Figura 3.2 mostra esquematicamente as reações envolvidas no processo de determinação de colesterol.



**Figura 3.2:** Esquema da reação amperométrica do colesterol para a colestenoa.<sup>4</sup>

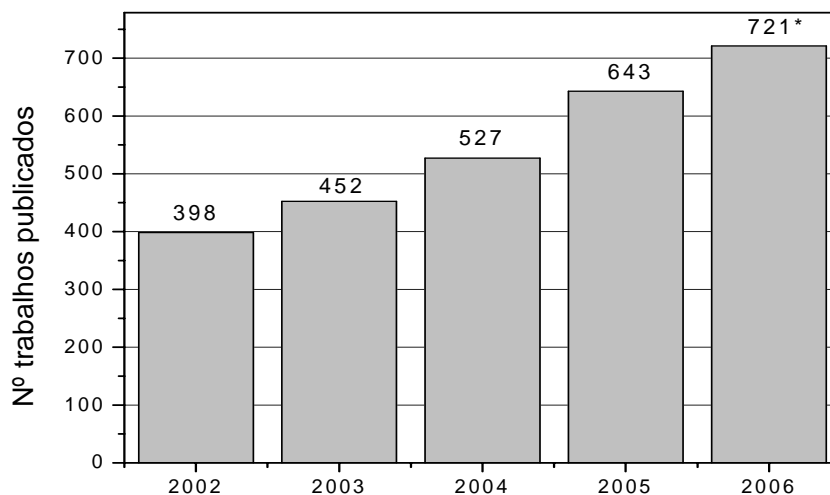
Os principais métodos de imobilização de enzimas adotados para a construção de biossensores para colesterol são a oclusão em polímero condutor, como o polipirrol e polianilina obtidos por eletropolimerização,<sup>5,6</sup> oclusão ou confinamento em filmes poliméricos produzidos pela técnica de automontagem<sup>7,8</sup>, oclusão em filmes sol-gel<sup>9,10</sup> e oclusão ou confinamento em membranas hidrogéis<sup>11</sup>.

À medida que novos dispositivos semicondutores bem como novas técnicas de imobilização são desenvolvidas, vão sendo superadas as dificuldades técnicas para o desenvolvimento de biossensores. O grande potencial de biossensores para aplicações tecnológicas, principalmente na monitoração de hemometabólitos, tem impulsionado o aumento das publicações nesta área nos últimos anos. O interesse industrial por estes dispositivos em vários países, porém, foi maior do que a literatura demonstra, pois muito dos trabalhos desenvolvidos foram mantidos confidenciais.

As pesquisas nos últimos cinco anos evoluíram da forma significativa. Conforme se verifica na Figura 3.3, existe um grande crescimento na quantidade de trabalhos publicados na área de biossensores clínicos.

O aumento observado pode ser justificado pelo grande interesse industrial que estes dispositivos têm despertado. Isto se deve principalmente ao baixo custo, facilidade de operação e baixo tempo de respostas dos biossensores. Assim,

confirma-se um interesse crescente pelo desenvolvimento de biossensores clínicos em diversas universidades e institutos de pesquisa a nível mundial.



**Figura 3.3:** Número de trabalhos publicados na área nos últimos cinco anos.

\* - Trabalhos publicados até 02 de setembro/2006. Fonte: Science Direct.

### 3.3 – Considerações finais

Os biossensores constituem uma interessante alternativa relativamente aos métodos tradicionais para monitoramento de colesterol, apresentando diversas vantagens com relação aos métodos convencionais, como a rapidez e precisão das medidas e a dispensa de mão de obra especializada.

Dentre os tipos de biossensores, o amperométrico é de especial interesse por, em geral, apresentar maior sensibilidade, rapidez e precisão, sendo ainda de fácil síntese. Para garantir a máxima eficiência do biossensor é necessário o estudo e controle de suas propriedades físico-químicas, a fim de otimizar suas propriedades mecânicas, térmicas e elétricas. Uma técnica interessante para a síntese do biossensor é o método sol-gel, por permitir a síntese à temperatura ambiente, preservando a atividade da enzima.

### 3.4 – Referências bibliográficas

1. Thévenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors & Bioelectronics*. 16, 121-131, 2001.
2. Pereira, A. C.; Santos, A. S.; Kubota, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Química Nova*. 25 (6), 1012-1021, 2002.
3. *Enzyme technology*. Disponível em <<http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/>>. Acesso em 01 setembro 2006.
4. Ram, M. K.; Bertoncello P.; Ding, H.; Paddeu, S.; Nicolini, C. Cholesterol biosensors prepared by layer-by-layer technique. *Biosensors & Bioelectronics*, 16, 849–856, 2001.
5. Singh, S.; Chaubey, A.; Malhotra, B. D. Amperometric cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on conducting polypyrrole films. *Analytica Chimica Acta*. 502, 229–234, 2004.
6. Wang, H. Y.; Mu, S. L.; Bioelectrochemical characteristics of cholesterol oxidase immobilized in a polyaniline film. *Sensors & Actuators B*. 56, 22–30, 1999.
7. Ram, M. K.; Bertoncello, P.; Ding, H.; Paddeu, S.; Nicolini, C. Cholesterol biosensors prepared by layer-by-layer technique. *Biosensors & Bioelectronics*. 16, 849–856, 2001.
8. Gobi, K. V.; Mizutani, F. Layer-by layer construction of an active multilayer enzyme electrode applicable for direct amperometric determination of cholesterol. *Sensor & Actuators B*. 80, 272–277, 2001.
9. Yao, Toshio, Takashima, K. Amperometric biosensor with a composite membrane of sol-gel derived enzyme film and electrochemically generated poly(1,2-diaminobenzene) film. *Biosensors & Bioelectronics*. 13 (1), 67-73, 1998.
10. Kumar, A.; Malhotra, R.; Malhotra, B. D.; Grover, S. K. Co-immobilization of cholesterol oxidase and horseradish peroxidase in a sol-gel film. *Analytica Chimica Acta*. 414, 43–50, 2000.
11. Brahim, S.; Narinesingh, D.; Guiseppi-Elie, A. Amperometric determination of cholesterol in serum using a biosensor of cholesterol oxidase contained within a polypyrrole-hydrogel membrane. *Analytica Chimica Acta*. 448, 27–36, 2001.

## CAPÍTULO 4 – BIOFÍSICA DOS BIOSSENSORES

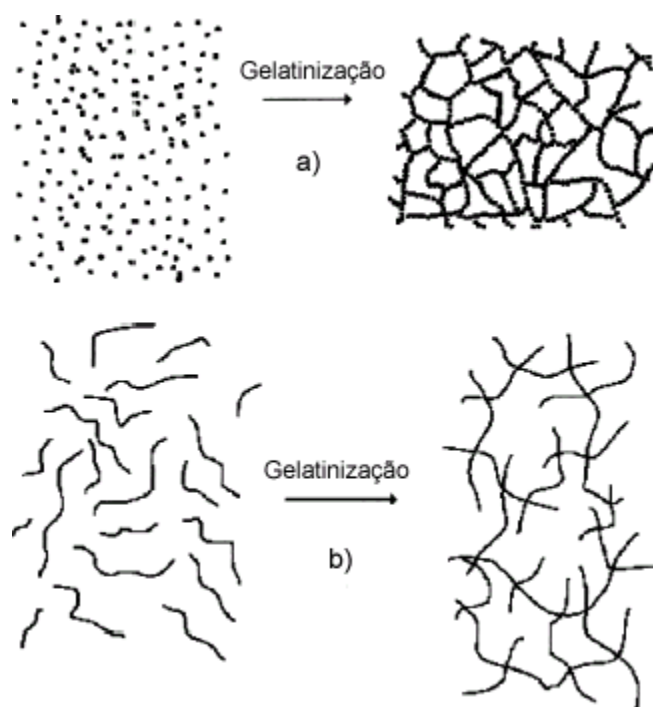
---

### 4.1 - Transição sol-gel do sistema PVA/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Uma técnica interessante para a obtenção de filmes finos para a imobilização de enzimas é o processo sol-gel. O uso do processo de sol-gel para produzir sensores para aplicações analíticas tem atraído considerável interesse devido a numerosos fatores, como a facilidade de fabricação, a flexibilidade do projeto de síntese e o fato das enzimas ocluídas na matriz sol-gel manterem a sua atividade catalítica, uma vez que a temperatura de síntese da matriz é a temperatura ambiente (25 °C). Este processo evita a lixiviação da enzima e dos mediadores de elétrons para a solução, ao contrário do que ocorre, na maioria das vezes, com filmes finos ou membranas contendo estes mesmos materiais imobilizados.

O processo sol-gel envolve uma rota de síntese de materiais onde num determinado momento ocorre uma transição de um sistema líquido “*sol*” (usualmente coloidal) para um sistema sólido “*gel*”.<sup>1</sup> O termo *sol* é empregado para definir uma dispersão de partículas coloidais (dimensão entre 1 e 100 nm) estável em um fluido enquanto o termo *gel* pode ser visto como sendo um sistema formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico) que imobiliza a fase líquida nos seus interstícios.

Os géis coloidais resultam da agregação linear de partículas primárias (Figura 4.1 - A), que só pode ocorrer pela alteração apropriada das condições físico-químicas da suspensão. Por outro lado, os géis poliméricos são, geralmente, preparados a partir de soluções onde se promovem reações de polimerização. Neste caso a gelatinização ocorre pela interação entre as longas cadeias poliméricas lineares (Figura 4.1 - B).



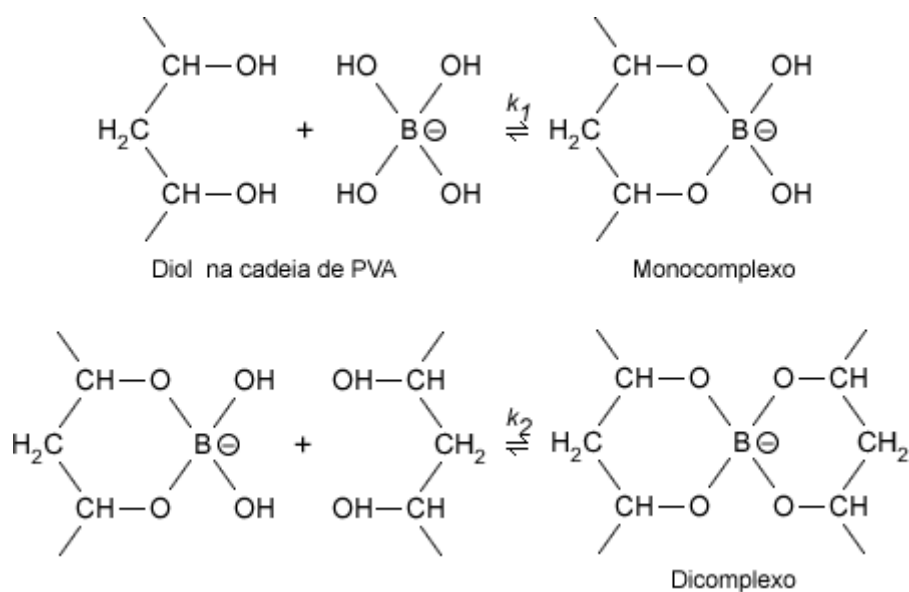
**Figura 4.1:** Figura esquemática da transição sol-gel: formação de gel particulado (A) e formação de gel polimérico (B).

O Poli(álcool vinílico) (PVA) é um polímero hidrofílico capaz de formar complexos através da transferência de cargas com ânions.<sup>2</sup> O PVA possui propriedades únicas tais como alta solubilidade em água e a capacidade de formar géis por condensação. Tais géis constituem uma barreira física ideal para o aprisionamento de enzimas.

Um íon muito interessante para a obtenção de hidrogéis de PVA é o íon borato. Acredita-se que o mecanismo da reação de complexação do íon borato com o PVA seja a complexação di-diol, formada por duas unidades de diol e um íon borato. Por protólise os ânions boratos são convertidos em  $B(OH)_4^-$ , que podem então reagir com o PVA, formando um gel termorreversível.<sup>3</sup>

O mecanismo de complexação do sistema PVA/borato pode ser dividido em duas reações<sup>2</sup>, como é descrito na Figura 4.2.





**Figura 4.2:** Reação de complexação do sistema PVA/Borato.<sup>2,4</sup>

As constantes cinéticas dessas reações são respectivamente  $k_1$  para a formação do monocomplexo e  $k_2$  para a formação do dicomplexo. A formação do complexo PVA/borato ocorre rapidamente. O sistema entra em equilíbrio em poucos minutos, o que não é comum no domínio dos géis e complexos poliméricos.<sup>4,5</sup> A constante de velocidade da reação de complexação do sistema PVA/Borato pode ser representada por uma única constante cinética  $K$ , dada por:<sup>3</sup>

$$K = \frac{[\text{reticulações}]}{[\text{diol}]^2[\text{íonborato}]} = K^0 e^{-\frac{\Delta H}{RT}}$$

A velocidade,  $v$ , da reação é dada por:

$$v = K[\text{íonborato}][\text{diol}]^2$$

No processo de reticulação do sistema PVA/Borato uma transição de fase denominada gelificação ocorre após o processo de reticulação. Essa transição é controlada termodinamicamente. Neste sentido, o processo de reticulação exerce uma influência significativa em grandezas macroscópicas como o módulo de elasticidade e temperatura de transição vítrea do sistema. A termodinâmica desse sistema é discutida nas próximas seções.

## 4.2 – Termodinâmica das reações químicas

A energia e a capacidade de realizar trabalho são fundamentais para a ocorrência de qualquer processo na natureza. Em um organismo vivo, da mesma forma, a energia é necessária para a realização dos diversos trabalhos fisiológicos. As reações catalisadas por enzimas podem ser estudadas através de uma abordagem termodinâmica. Desta forma, é possível entender o que faz com que a reação enzimática se processe e se complete, em termos das energias envolvidas no processo. Também a reação de complexação do sistema PVA/Borato pode ser entendida através de uma abordagem termodinâmica. Para este estudo é importante uma revisão nos conceitos básicos da termodinâmica, como é discutido a seguir.

Para um sistema fechado, a primeira lei da termodinâmica afirma que a variação total de energia interna,  $\Delta E$ , é igual a diferença entre o calor,  $Q$ , fornecido ao sistema e o trabalho,  $W$ , realizado pelo sistema.<sup>6-8</sup>

$$\Delta E = Q - W \quad (4.1)$$

Esta é uma expressão quantitativa do princípio de conservação da energia.

Em um processo químico, segundo a primeira lei, a diferença de energia entre reagentes e produtos resultará em energia que será absorvida ou liberada na forma de calor ou trabalho.

A variação de energia interna  $\Delta E$  pode ser dividida em diversos termos, cada um representando a variação de uma forma particular de energia, da seguinte forma:

$$\Delta E = \Delta E_K + \Delta E_P + \Delta U \quad (4.2)$$

onde  $\Delta E_K$  é a variação na energia cinética,  $\Delta E_P$  a variação na energia potencial e  $\Delta U$  a variação na energia interna do sistema. A função  $U$  de energia interna apresenta as energias cinética e potencial das partículas, em um nível microscópico. Considerando que a energia cinética e potencial do sistema são constantes, como ocorre frequentemente, e substituindo a expressão para  $\Delta E$  na primeira lei, obtemos a equação:

$$\Delta U = Q - W \quad (4.3)$$

onde  $W$  é o trabalho executado pelo sistema e  $Q$  o calor absorvido pelo sistema.

Na forma diferencial:

$$dU = dQ - dW \quad (4.4)$$

Um dos axiomas da termodinâmica relata a existência de uma propriedade chamada entropia,  $S$ , que é uma propriedade intrínseca de um sistema. Para um processo reversível, as variações desta propriedade é dada por:

$$dS = \frac{dQ}{T} \quad (4.5)$$

De acordo com outro axioma, a segunda lei da termodinâmica, a variação da entropia  $S$  de um sistema e seu exterior, tomados em conjunto é sempre positiva e aproxima-se de zero para um processo que se aproxime da reversibilidade.

O trabalho mecânico, em um sistema termodinâmico, ocorre quando uma força agindo sobre o sistema se move ao longo de certa distância. O trabalho é dado por:

$$dW = PdV \quad (4.6)$$

Combinando as equações 4.4, 4.5 e 4.6, temos:

$$dU = TdS - PdV \quad (4.7)$$

Esta é uma equação geral que relaciona as propriedades de um sistema fechado, da qual deriva as outras relações importantes. Nesta equação,  $dU$  depende de  $Q$  e  $W$ , que não são propriedades, mas manifestação de processos, ou seja, são variáveis de processo. Para o estudo de sistemas no equilíbrio, é conveniente desenvolver expressões gerais entre propriedades de equilíbrio envolvendo apenas variáveis de estado. Estas propriedades designam-se por funções de estado.

A entalpia,  $H$ , é uma função de estado dada por:

$$H = U + PV \quad (4.8)$$

Considerando pequenas alterações do estado do sistema, podemos escrever esta equação tomando a sua diferencial:

$$dH = dU + PdV + VdP \quad (4.9)$$

Através das primeira e segunda leis, tomadas em conjunto (equação 4.7) esta equação pode ser escrita como:

$$dH = TdS + VdP + dW \quad (4.10)$$

Esta expressão geral é uma forma alternativa das primeiras e segundas leis da termodinâmica tomadas em conjunto. Esta função de estado, para processos em que ocorre apenas trabalho mecânico e estão à pressão constante, permite uma medida direta do calor trocado pelo sistema e a sua vizinhança, de uma forma simples. Em uma reação química, quando  $dH$  é negativo, a reação química é chamada exotérmica. Se  $dH$  é positivo, então o calor é absorvido pelo sistema e a reação é chamada de endotérmica.

Outra importante função de estado é a energia livre de Gibbs,  $G$ , definida por:

$$G=U+PV-TS=H-TS \quad (4.11)$$

Considerando pequenas alterações do estado do sistema, a alteração na energia livre de Gibbs é dada por:

$$dG=dU+PdV+VdP-TdS-SdT \quad (4.12)$$

Da mesma forma, através das primeira e segunda leis, tomadas em conjunto (equação 4.7) esta equação pode ser escrita como:

$$dG=-SdT+VdP+dW \quad (4.13)$$

Esta é uma forma alternativa das leis da termodinâmica tomadas em conjunto. A energia livre de Gibbs simplifica a descrição de sistemas em que a temperatura e pressão são constantes. Para estes sistemas, que incluem reações químicas e transformações de fase,  $G$  fornece o trabalho total exercido sobre o sistema, com exceção de trabalho mecânico. O sinal de  $\Delta G$  indica se uma reação é capaz de realizar trabalho, com exceção do mecânico. Se for negativo, o sistema terá perdido energia livre, que pode ter sido utilizada para produzir trabalho. Se for positivo, o sistema terá recebido energia livre, portanto não pode ter realizado trabalho. De acordo com a segunda lei da termodinâmica, uma reação espontânea se caracteriza pela perda de energia livre, ou seja,  $\Delta G$  negativo.

Os potenciais termodinâmicos apresentados nesta seção são úteis para o desenvolvimento de relações que possibilitarão a compreensão e a interpretação quantitativa do processo de sorção de água e transição de fase volumétrica do biossensor. Estas relações serão desenvolvidas no próximo capítulo.

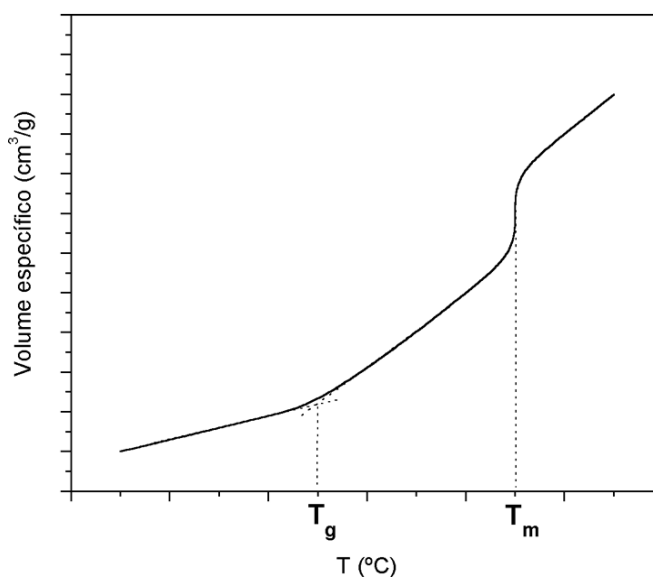
### 4.3 – Temperatura de transição vítrea e fusão cristalina

A estabilidade térmica dos biossensores pode ser avaliada através das temperaturas de transição vítrea e fusão cristalina. A temperatura de transição vítrea,  $T_g$ , é o valor médio da faixa de temperatura a partir da qual as moléculas da fase amorfa de um material polimérico adquirem mobilidade.<sup>10,11</sup> Em geral, os polímeros não reticulados, a temperaturas abaixo da  $T_g$  apresentam comportamento mecânico rígido e quebradiço e, após a  $T_g$ , comportamento dúctil e maleável. A  $T_g$  é uma característica intrínseca de materiais amorfos, enquanto a temperatura de fusão,  $T_m$ , é uma

característica de materiais cristalinos. Desta forma, polímeros semicristalinos, como o PVA, possuem  $T_g$  e  $T_m$ .

Para compreender as bases moleculares da transição vítrea, é necessário analisar os vários graus de liberdade que um polímero amorfo possui. Em temperaturas menores que a  $T_g$ , as moléculas possuem energia térmica,  $kT$ , suficiente apenas para o movimento de alguns átomos ou de grupos funcionais ao longo da cadeia principal, e para vibração dos átomos em torno de suas posições de equilíbrio. Em temperaturas a partir da  $T_g$ , a energia se torna suficiente para translação de moléculas inteiras, o que permite o escoamento, e para movimentos cooperativos de extensão e contração de segmentos da molécula, que confere elasticidade ao material.

Algumas propriedades do material sofrem alteração com a transição vítrea. Estas propriedades podem então ser utilizadas para determinação da  $T_g$ , como o calor específico, módulo de elasticidade, índice de refração, coeficiente de expansão térmica e volume específico.<sup>10</sup> A Figura 4.3 ilustra a variação do volume específico com a temperatura para um material polimérico. Neste gráfico, a  $T_g$  está associada a uma mudança no coeficiente angular da curva. A  $T_m$  é caracterizada, para um polímero, como uma descontinuidade na curva, da mesma forma que para outros materiais. Assim, a transição vítrea é conhecida como uma transição de segunda ordem, enquanto a fusão cristalina é conhecida como uma transição de primeira ordem.



**Figura 4.3:** Gráfico esquemático da variação do volume específico com a temperatura para um material polimérico.

A alteração no coeficiente de expansão térmica, ou seja, do coeficiente angular da curva, na  $T_g$ , pode ser compreendida através do conceito de volume livre do polímero. O volume livre,  $v_f$ , é definido como a soma de todo o volume vazio contido no polímero, isto é:

$$v_f = v - v_0 \quad (4.14)$$

onde  $v$  é o volume específico do polímero e  $v_0$  é o volume do polímero no zero absoluto, que pode ser determinado experimentalmente através da extrapolação da curva  $v$  versus  $T$ , entre a  $T_g$  e a  $T_m$ , até a temperatura de 0 K. O movimento de uma molécula em um polímero depende da presença de vacâncias em suas proximidades.

O volume livre do polímero aumenta com o aumento da temperatura. Quando a temperatura do material é maior que a  $T_g$ , o volume livre é levado a ponto de conferir mobilidade suficiente às cadeias de modo que elas alcancem uma configuração de equilíbrio.

Ao baixar a temperatura, a mobilidade das moléculas diminui, aumentando o tempo necessário para o rearranjo das mesmas até a configuração de equilíbrio. Em temperaturas abaixo da  $T_g$ , o sistema não pode mais alcançar a configuração de equilíbrio devido às restrições em seus movimentos. Com isso, um decréscimo na temperatura leva a uma redução menor no volume livre do polímero, causando uma alteração no coeficiente angular da curva.<sup>10,11</sup>

A fusão cristalina nos polímeros é uma transição de fase similar à observada em compostos orgânicos de baixo peso molecular, metais e cerâmicas. A energia livre de Gibbs de fusão é dada por:

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m \quad (4.15)$$

O ponto de fusão cristalina,  $T_m$ , é um ponto de equilíbrio termodinâmico,  $\Delta G_m=0$ , logo:

$$T_m = \frac{\Delta H_m}{\Delta S_m} \quad (4.16)$$

$\Delta H_m$  é a energia necessária para vencer a força de interação entre as cadeias em uma região cristalina a uma temperatura e pressão constante, e independe do tamanho das cadeias. Quanto menor forem as cadeias poliméricas, mais aleatórias elas serão e, conseqüentemente, maior será  $\Delta S_m$ . Assim, a  $T_m$  diminui com o decréscimo do grau de polimerização. A equação 4.16 também indica que polímeros com maior grau de

crystalinidade e maior força de interação entre as cadeias em regiões cristalinas, ou seja, com maior  $\Delta H_m$ , possuem maior  $T_m$ .

A transição vítrea e a fusão cristalina podem convenientemente ser caracterizadas através de técnicas como a calorimetria exploratória diferencial e análise termomecânica. Estas técnicas serão discutidas nos próximos capítulos.

No projeto de biossensores, é importante que a  $T_g$  e  $T_m$  possuam valores maiores que a temperatura de trabalho do dispositivo, pois desta forma mantido o ambiente ideal para a ação da enzima e seria garantida a resistência mecânica necessária ao bom funcionamento do dispositivo. Em biossensores construídos com enzima imobilizada por oclusão em polímero reticulado, a  $T_g$  e  $T_m$  podem ser controladas na etapa de síntese, através da escolha de uma densidade de reticulações adequada.

Um biossensor deve possuir também estabilidade mecânica. Uma forma de avaliar esta estabilidade é através do módulo de elasticidade do material, ou módulo de Young.

#### 4.4 – Estabilidade mecânica

Uma matriz para a imobilização de enzima para construção de biossensores deve possuir resistência mecânica suficiente para garantir a integridade do biossensor durante a sua utilização. A estabilidade mecânica do biossensor pode ser avaliada através do módulo de elasticidade, ou módulo de Young.

Um corpo elástico é aquele que volta à sua forma original quando as forças que deram origem a uma deformação são removidas. Quando um corpo é submetido a uma tensão (tração ou compressão), ele tende a sofrer uma alteração em seu comprimento, na direção da tensão aplicada. Se a deformação do corpo variar linearmente com a tensão aplicada, o corpo se encontra em um regime elástico. No momento em que a relação entre tensão aplicada e deformação sofrida deixa de ser linear, o corpo chegou em seu limite elástico e entra em um regime plástico, em que não retorna às suas dimensões originais depois da remoção da tensão aplicada.<sup>12,13</sup>

No regime elástico, o comportamento do corpo pode ser descrito pela lei de Hook:

$$\frac{F}{A} = \gamma \frac{\Delta l}{l} \quad (4.17)$$

onde  $F$  é a força aplicada sobre uma área  $A$ ,  $l$  é o comprimento do corpo e  $\Delta l$  a deformação sofrida pela ação da força. O módulo de Young é definido como a constante de proporcionalidade,  $\gamma$ :

$$\gamma = \frac{F / A}{\Delta l / l} = \frac{\text{tensão}}{\text{deformação}} \quad (4.18)$$

$\gamma$  é um parâmetro mecânico que permite avaliar a rigidez de um material.

O valor de  $\gamma$  calculado para uma tensão de tração é sempre o mesmo valor calculado para uma compressão. O módulo de Young é uma característica intrínseca de cada material.

Da mesma forma que a  $T_g$  e  $T_m$ ,  $\gamma$  é função da densidade de reticulação do polímero utilizado na construção do biossensor. Assim, através da densidade de reticulação,  $\gamma$  pode ser controlado.

#### 4.5 – Parâmetro de solubilidade

O parâmetro de solubilidade de um polímero,  $\delta_{pol.}$ , é uma variável termodinâmica de interesse especial no estudo da cinética de sorção de solvente pela rede polimérica. Sabe-se que um bom solvente para um polímero é aquele que possui um valor de parâmetro de solubilidade,  $\delta_{solv.}$ , próximo ao do polímero. Em um biossensor, o parâmetro de solubilidade determina a capacidade de sorção de analito pelo dispositivo, influenciando diretamente a sua performance.

Define-se o parâmetro de solubilidade de um solvente  $\delta_{solv}$  como:<sup>14</sup>

$$\delta_{solv.} = \left( \frac{\rho_{solv.} (\Delta H_{solv.}^v - RT)}{M_{solv.}} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4.19)$$

onde  $M_{solv.}$  é a massa molecular do solvente e  $\rho_{solv}$  a densidade do solvente. Esta expressão é conhecida como expressão de Hildebrand.

O calor de vaporização  $\Delta H$  é a energia necessária para evaporar 1 mol de um líquido. O calor de vaporização está diretamente relacionado a amplitude das forças intermoleculares existentes em um líquido. Quando as atrações moleculares são fortes, as moléculas do líquido não podem facilmente escapar para a fase vapor.

Quando as forças intermoleculares são fracas, o  $\Delta H^v$  é pequeno e  $\delta$  é pequeno – caso dos polímeros com cadeias flexíveis, elastômeros. Quando as forças



intermoleculares são fortes, as cadeias são rígidas. Se as forças intermoleculares são muito grandes, os materiais exibem grande resistência às tensões mecânicas, características típicas das fibras, especialmente quando a simetria molecular é favorável para a cristalização. Costumamos exprimir as unidades de  $\delta$  em Hildebrand (H), que significa  $(\text{cal.cm}^{-3})^{1/2}$ .

O processo de dissolução de um polímero num solvente é um processo lento e que ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, as moléculas do solvente difundem-se para dentro do polímero, formando-se um gel. Se as interações entre as moléculas de solvente são mais fortes do que as existentes entre as cadeias do polímero (Energia de Gibbs de mistura muito negativa), então ocorre a segunda etapa do processo, o gel degenera gradualmente numa solução verdadeira. Este processo pode ser muito lento (semanas a meses) para materiais de massa molecular média muito elevada. Em casos em que as forças moleculares atrativas entre as cadeias dos polímeros são muito fortes, como o caso de polímeros reticulados ou com elevada cristalinidade, a segunda etapa não ocorre, ou seja, o material é insolúvel.

Um bom solvente para um dado polímero é aquele que possui um valor do parâmetro de solubilidade,  $\delta_{\text{solv}}$ , muito próximo do valor do parâmetro de solubilidade do polímero,  $\delta_{\text{pol}}$ . Como regra de trabalho:

$$\delta_{\text{pol}} - 1,1 < \delta_{\text{solv}} < \delta_{\text{pol}} + 1,1$$

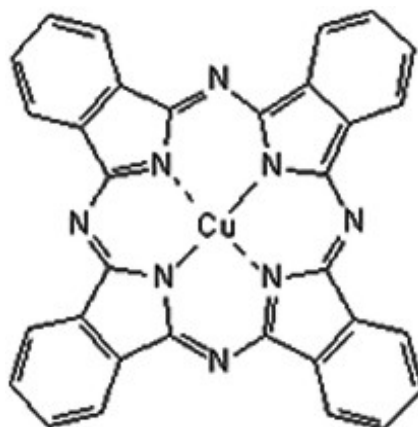
#### 4.6 – Mediadores de elétrons

Mediadores de elétrons são moléculas de grande atividade eletroquímica que permitem uma rápida troca de elétrons com o analito e a superfície do eletrodo.<sup>15</sup> O mediador de elétrons age como uma ponte para transporte de elétrons entre o analito e a superfície do eletrodo. Um mediador de elétrons pode também contribuir para as propriedades elétricas da matriz utilizada para construção do biossensor.

Em um biossensor, o mediador de elétrons é imobilizado na matriz polimérica, juntamente com a enzima, e tem a função de promover a redução catalítica do peróxido de hidrogênio gerado a partir da reação bioquímica. Os elétrons produzidos pela redução do peróxido de hidrogênio, através do mediador, são elevados à superfície do eletrodo. Alguns dos mediadores de elétrons comumente utilizados na literatura são o polipirrol<sup>16,17</sup> e a polianilina<sup>18</sup>.

Neste trabalho foi proposta uma nova classe de materiais para utilização como mediadores de elétrons em biossensores, a molécula ftalocianina de cobre (Ftc). A Ftc é um macrociclo orgânico contendo um átomo central de cobre coordenado por quatro átomos de nitrogênio. Esta molécula é utilizada como semiconductor intrínseco para opto-eletronica<sup>19</sup>, por possuir características óticas singulares, sensores de gases<sup>20</sup> e extensivamente utilizado na indústria para a produção de discos ópticos<sup>21</sup> e como pigmento para tintas<sup>22</sup>.

A molécula de Ftc tem a capacidade de produzir a redução catalítica do peróxido de hidrogênio<sup>24</sup>, além de possuir grande similaridade com moléculas orgânicas como a hemoglobina. Estas características tornam a Ftc uma molécula interessante quanto à sua utilização como mediador de elétrons em biossensores enzimáticos.



**Figura 4.5:** Estrutura da molécula de ftalocianina de cobre (Ftc).

#### 4.7 – Considerações finais

Hidrogéis de PVA constituem uma matriz interessante para a imobilização de enzimas na construção de biossensores, devido a sua capacidade de formar complexos com  $H_3BO_3$  a temperatura ambiente, preservando a enzima imobilizada. A Ftc é uma molécula interessante para a utilização como mediador de elétrons no biossensor, por ser um material de baixo custo e capaz de reduzir o peróxido de hidrogênio.

Para a utilização desses materiais no projeto de biossensores, suas propriedades físico-químicas deverão ser estudadas. Uma característica dos hidrogéis de PVA é sua alta capacidade de sorção de água, que é essencial para o desempenho do biossensor por permitir a formação do ambiente aquoso ideal para a ação da enzima e facilitar a sorção do analito. Esta e outras características dos hidrogéis de PVA serão estudadas nos próximos capítulos.

#### 4.8 – Referências bibliográficas

1. Alfaya, A. A. S.; Kubota, L. A Utilização de Materiais Obtidos pelo Processo de Sol-Gel na Construção de Biossensores. *Quim. Nova*, 25(5): 835-841, 2002.
2. Lin, H.; Liu, W.; Liu, Y.; Cheng, C. Complexation Equilibrium Constants of Poly(vinyl alcohol)-Borax Dilute Aqueous Solutions – Consideration of Electrostatic Charge Repulsion and Free Ions Charge Shielding Effect. *Journal of Polymer Research*. 9: 233–238, 2002.
3. Nijenhuis, K. TE. Calculation of Network Parameters in Thermoreversible Gels. *Polymer Gels and Networks*. 4: 415-433, 1996.
4. Keita, G.; Ricard, A.; Audebertt, R.; Pezron, E.; Leibler, L. The poly(vinyl alcohol)-borate system: influence of polyelectrolyte effects on phase diagram. *Polymer*. 36 (1), 49-54, 1995.
5. Shibayama, M.;Yoshizawa, H.; Kurokawa, H.; Fujiwara, H.; Nomura, S. Sol-gel transition of poly(vinyl alcohol)-borate complex. *Polymer*. 29, November, 1988.
6. Abbott, M. M.; Ness, H. C. *Termodinâmica*. Lisboa: McGraw-Hill. 1992.
7. DeHoff, R. T. *Thermodynamics in Materials Science*. McGraw-Hill.1993.
8. Stanley, H. E. *Introduction to Phase Transitions and Critical Phenomena*. London: Clarendon Press – Oxford. 1971.
9. Borzani, W.; Schmidell, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E. *Biotecnologia Industrial*; Volume I; Fundamentos. 1ª Edição. São Paulo: Edgard Blucher. 2001.
10. Rosen, S. L. *Fundamental Principles of Polymeric Materials*. New York: John Wiley & Sons. 2ª ed, 1993.
11. Yamaki, S. B.; Pedroso, A. G.; Atvars, T. D. Z. O Estado Vítreo Dentro da Perspectiva do Curso de Graduação em Química (Físico-química). *Química Nova*. 25 (2), 330-334, 2002.

12. Martínez, P.; Azuaya, M. *Medición del módulo de elasticidad de Young*. Disponível em: <[http://www.fisicarecreativa.com/informes/infor\\_mecanica/young97.pdf](http://www.fisicarecreativa.com/informes/infor_mecanica/young97.pdf)>. Acesso em 14 junho 2006.
13. Callister, W. D. Jr. *Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução*. Rio de Janeiro, LTC. 5, 328-329, 2002.
14. *HandBook of Physics and Chemistry*. 63° Edition. 1982-1983.
15. Berchmans, S.; Vijayavalli, R. Surface Modification of Glassy Carbon by Riboflavin. *Langmuir*. 11, 286-290, 1995.
16. Brahim, S.; Narinesingh, D.; Guiseppi-Elie, A. Amperometric determination of cholesterol in serum using a biosensor of cholesterol oxidase contained within a polypyrrole-hydrogel membrane. *Analytica Chimica Acta*. 448, 27-36, 2001.
17. Singh, S.; Chaubey, A.; Malhotra, B. D. Amperometric cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on conducting polypyrrole films. *Analytica Chimica*. 502, 229-234, 2004.
18. Wang, H.; Mu, S. Bielectrochemical characteristics of cholesterol oxidase immobilized in a polyaniline film. *Sensors and Actuators B*. 56, 22-30, 1999.
19. Xia, H.; Nogami, M. Copper phthalocyanine bonding with gel and their optical properties. *Optical Materials*. 5, 93-98, 2000.
20. Fedoruk, G. G.; Sagaidak, D. I.; Misevich, A. V.; Pochtenny, A. E. Electrical and gas sensing properties of copper phthalocyanine-polymer composites. *Sensors and Actuators B*. 48, 351-355, 1998.
21. Disponível em <<http://www.digit-life.com/articles/cdrdisktest4/index.html>>. Acesso em 01 setembro de 2006.
22. Disponível em <<http://www.basf.com.br>>. Acesso em 01 setembro de 2006.
23. Disponível em <<http://www.lona.com/pigments.htm>>. Acesso em 01 setembro de 2006.
24. Sotomayor, M. D. P. T., Tanaka, A. A., Kubota, L. T. Development of an enzymeless biosensor for the determination of phenolic compounds. *Analytica Chimica Acta*. 455, 215-223, 2002.
25. Liao, M.; Scheiner, S. Electronic structure and bonding in metal phthalocyanines, Metal=Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mg. *Journal of Chemical Physics*. 114(22), 9780-9791, 2001.

## CAPÍTULO 5 – FENÔMENO DE TRANSPORTE DE ÁGUA EM MEMBRANAS POLIMÉRICAS

---

### 5.1 - Introdução

A caracterização do transporte de água em membranas poliméricas possui um importante papel tecnológico na caracterização e desenvolvimento de hidrogéis para aplicações em biotecnologia. Quando empregado na construção de biossensores enzimáticos, espera-se que o hidrogel apresente uma máxima sorção de água, o que influencia diretamente na performance do dispositivo, já que a reação enzimática deve se realizar em meio aquoso. Hidrogéis, como o PVA, são polímeros com elevada capacidade de sorção de água.

Quando um hidrogel é submerso em água, as moléculas de água difundem-se na matriz polimérica causando seu intumescimento. A sorção de água por um hidrogel pode ser justificada em termos da pressão osmótica, de acordo com a teoria de Flory-Huggins<sup>1</sup>. Este modelo pode ser utilizado para justificar a sorção da solução aquosa de ácido bórico pelo PVA, no momento de sua reticulação, e a sorção de solução de colesterol pelo dispositivo, no momento de sua utilização.

O estabelecimento de um modelo matemático para o processo de sorção de água por uma membrana polimérica permite a avaliação de propriedades físico-químicas deste sistema, como o coeficiente de difusão, a energia de ativação associada ao processo de difusão e o mecanismo de difusão da água na membrana.

### 5.2 - Transição de fase volumétrica

Através da teoria de Flory-Huggins (FH) do equilíbrio de intumescimento, é possível efetuar uma interpretação qualitativa do processo de intumescimento (transição de fase volumétrica) de hidrogéis. A teoria de FH não considera efeitos do volume livre e de interações de hidrogênio. Devido a este fato, a teoria de FH não é capaz descrever quantitativamente o processo de intumescimento.<sup>2</sup>

A transição de fase volumétrica de um polímero é governada por pelo menos três diferentes termos de energia livre, ou seja, por alterações na energia livre de

mistura  $\Delta G_m$ , na energia livre de deformações elásticas  $\Delta G_{el}$ , e alterações na energia livre de interações eletrostáticas  $\Delta G_i$ .<sup>2,3</sup>

$$\Delta G = \Delta G_m + \Delta G_{el} + \Delta G_i \quad (5.1)$$

A energia livre de mistura,  $\Delta G_m$ , é dada por:

$$\Delta G_m = RT \left( \sum_i n_i \ln v_i + \sum_{i<j} n_i v_j \chi_{ij} \right) \quad (5.2)$$

sendo  $R$  a constante dos gases e  $T$  a temperatura.

Para o sistema PVA/Ácido bórico, o índice  $i = 1, 2$  e  $3$  representam o solvente (água), o PVA e o ácido bórico (ou colesterol) respectivamente.  $\chi_{ij}$  é o parâmetro de interação entre o polímero e o solvente. Este parâmetro indica a alteração da energia de interação quando o polímero e o solvente são misturados, ou seja, indica a interação termodinâmica entre o polímero e o solvente. Em um sistema aquoso, quanto maior o valor de  $\chi_{ij}$ , menor é a interação entre o polímero e a água e maior a interação entre os grupos hidrofílicos do polímero ou entre as cadeias poliméricas.  $\chi_{ij}$  é dado por:<sup>4</sup>

$$\chi = 1 \frac{\ln(1 - \phi_2) + \phi_2 + v_e V_1 (\phi_2^{1/3} - 2\phi_2 J^{-1})}{\phi_2^2}$$

Sendo  $J$  a funcionalidade do componente 2 da solução.

A energia livre de alterações elásticas  $\Delta G_{el}$  é dada por:

$$\Delta G_{el} = \left( \frac{3}{2} \right) \left( \frac{RT}{NV_1} \right) \left( \left( \frac{v_2^0}{v_2} \right)^{\frac{2}{3}} - 1 - \ln \left( \frac{v_2^0}{v_2} \right)^{\frac{1}{3}} \right) \quad (5.3)$$

sendo  $N$  é o grau de polimerização,  $V_1$  é o volume molar de solvente,  $v_2^0$  a fração de volume de polímero antes do processo de intumescimento e  $v_2$  a fração de volume de polímero em equilíbrio de inchamento.

Para um gel iônico fracamente carregado, a energia livre de interações eletrostáticas  $\Delta G_i$  é dada por:

$$\Delta G_i = RT \frac{f}{N} \frac{v_2}{v_1} n_1 \ln \left( \frac{f v_2}{N} \right) \quad (5.4)$$

onde  $f$  é o número médio de unidades iônicas na cadeia.

O potencial químico  $\Delta \mu_1$  relativo ao componente puro 1 na solução é dado por:

$$\Delta\mu_1 = \left( \frac{\partial \Delta G}{\partial n_1} \right)_{Y,P,n_2,3} \quad (5.5)$$

Uma Equação similar existe para os potenciais químicos  $\Delta\mu_2$  e  $\Delta\mu_3$ .

Substituindo as Equações 5.2, 5.3 e 5.4 na Equação 5.5 e diferenciando com relação ao número de mols de solvente  $n_1$  e de moléculas de polímero  $n_3$  chegamos ao seguinte conjunto de equações para o excesso de potencial químico para o solvente e para o polímero nas fases sol e gel:<sup>2</sup>

$$\frac{\Delta\mu_1^{gel}}{RT} = N^{-1} \left( v_2^{1/3} v_2^{0^{2/3}} - \frac{v_2}{2} \right) + \ln v_1 + (1 - v_1) - \frac{v_3}{y} + (\chi_{12} v_2 + \chi_{13} v_3)(1 - v_1) - \chi_{23} v_2 v_3 - \frac{v_2 f}{N} \quad (5.6a)$$

$$\frac{\Delta\mu_1^{sol}}{RT} = \ln(1 - \phi) + \phi \left( 1 - \frac{1}{y} \right) + \chi_{13} \phi^2 \quad (5.6b)$$

$$\frac{\Delta\mu_3^{gel}}{yRT} = N^{-1} \left( v_2^{1/3} v_2^{0^{2/3}} - \frac{v}{2} \right) + \left( \frac{1}{y} \right) \ln v_3 + \left( \frac{1}{y} \right) (1 - v_3) - v_1 + (\chi_{13} v_1 + \chi_{23} v_2)(1 - v_3) - \chi_{12} v_1 v_2 - v_2 \frac{f}{N} \quad (5.6c)$$

$$\frac{\Delta\mu_3^{sol}}{yRT} = \left( \frac{1}{y} \right) \ln \phi - (1 - \phi) + \left( \frac{1}{y} \right) (1 - \phi) + \chi_{13} (1 - \phi)^2 \quad (5.6d)$$

sendo  $y$  o número de segmentos no componente 3 da solução e  $\phi$  a sua fração volumétrica na solução.

O estado de equilíbrio de inchamento de uma rede (fase gel) imersa em uma solução é obtido quando os componentes 1 (solvente) e 3 (ácido bórico ou colesterol) contidos da rede polimérica estão em equilíbrio termodinâmico com esses mesmos componentes exteriores a rede. O estado de equilíbrio é descrito pela igualdade do potencial químico,  $\mu$ , destes componentes em ambas as fases. Então, no equilíbrio de inchamento, se pode escrever:

$$\Delta\mu_1^{gel} - \Delta\mu_1^{sol} = 0 \quad (5.7a)$$

$$\Delta\mu_2^{gel} - \Delta\mu_2^{sol} = 0 \quad (5.7b)$$

$$\Delta\mu_3^{gel} - \Delta\mu_3^{sol} = 0 \quad (5.7c)$$

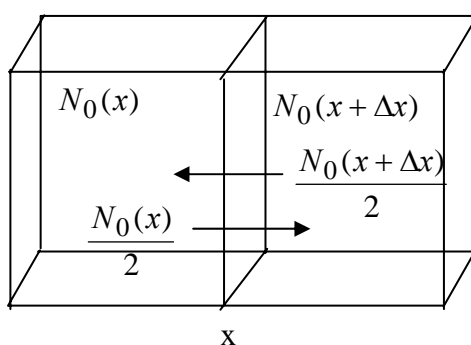
Em termos de pressão osmótica  $\pi$ , a Equação 5.7a pode ser escrita como:

$$\pi = -\frac{(\mu_1^{gel} - \mu_1^{sol})}{V_1} = 0 \quad (5.8)$$

A pressão osmótica  $\pi$  de um gel determina quando este tende a expandir ou a contrair. Quando diferente de zero,  $\pi$  fornece a força motriz para a difusão de solvente no hidrogel, provocando a sua transição de fase volumétrica. O solvente se move para dentro ou para fora do gel até que  $\pi$  se iguale a zero, isto é, até que as forças agindo no gel sejam balanceadas. Se  $\pi$  é positivo a solução tende a se difundir para o hidrogel, se  $\pi$  é negativo, a solução tende a sair do hidrogel.

### 5.3 - A primeira lei de Fick

A difusão de um solvente em um polímero se dá através do movimento randômico de moléculas individuais. Se um gradiente de concentração é estabelecido em uma seção qualquer de um polímero, surge a transferência de massa na direção da maior para a de menor concentração. Se o processo de transferência de massa for estacionário, ou seja, o gradiente de concentração for constante, este processo pode ser descrito através da primeira lei de Fick. A primeira lei de Fick pode ser deduzida considerando-se a difusão em uma dimensão, como ilustrado na Figura 5.1.<sup>5,6</sup>



**Figura 5.1:** Figura esquemática do deslocamento de moléculas em uma seção transversal num fluido.

De acordo com o deslocamento linear estatístico, durante um intervalo de tempo  $\Delta t$  metade das partículas estão se movendo  $\Delta x$  nas duas direções, de tal forma



que o fluxo total através da área  $A$  em  $x$  é dado pela diferença entre os números de partículas movendo-se da esquerda para a direita e aquelas movendo da no sentido oposto:

$$J_0(x,t) = \frac{1}{A} \frac{N_0(x) - N_0(x + \Delta x)}{2 \Delta t} \quad (5.9)$$

Multiplicando a Equação 5.9 por  $\Delta x / \Delta x$  e lembrando que a concentração de uma substância é dada por

$$C_0 = \frac{N_0}{A \Delta x}$$

Obtem-se:

$$-J_0(x,t) = \frac{\Delta x^2}{2 \Delta t} \frac{C_0(x + \Delta x) - C_0(x)}{\Delta x} \quad (5.10)$$

O coeficiente de difusão é definido como

$$D = \frac{\Delta x^2}{2 \Delta t}$$

Tomando o limite para  $\Delta x \rightarrow 0$  e  $\Delta t \rightarrow 0$ , a Equação 5.9 se torna:

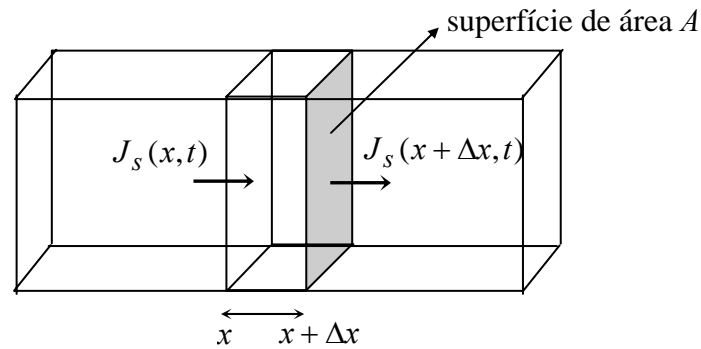
$$J_s = -D \frac{\partial C}{\partial x} \quad (5.11)$$

ou seja, o fluxo  $J_s$  de um soluto S é proporcional ao gradiente de concentração.  $D$  é chamado coeficiente de difusão. Esta Equação é análoga a Equação de fluxo de calor entre dois corpos e é conhecida como *primeira lei de Fick*. A primeira lei de Fick é aplicável ao estado estacionário, onde a concentração não se altera com o tempo.

#### 5.4 - A segunda lei de Fick

A segunda lei de Fick é capaz de descrever o processo de difusão de um solvente em um polímero em um estado não estacionário, ou seja, onde a concentração do solvente no interior do polímero é variável com o tempo. A dedução da segunda lei de Fick é apresentada a seguir.<sup>5,6</sup>

Considerando no interior de um sólido, um elemento de volume retangular de espessura  $\Delta x$ , suficientemente pequena para que a concentração não varie significativamente com a posição dentro do elemento, como ilustrado na Figura 5.2:



**Figura 5.2:** Figura esquemática do deslocamento de partículas em uma seção transversal num sólido.

O número de partículas que passa pela superfície de área  $A$ , entrando no elemento de volume, na posição  $x$  em um intervalo de tempo  $\Delta t$  é dado por  $J_s(x, t) \cdot A \cdot \Delta t$ .

O número de partículas que passa pela superfície de área  $A$ , saindo do elemento de volume, em  $x + \Delta x$  no mesmo intervalo de tempo pode ser escrito como  $J_s(x + \Delta x, t) \cdot A \cdot \Delta t$ . Portanto, o fluxo líquido de partículas para dentro do elemento de volume (o número de partículas que entra menos o número de partículas que sai) no intervalo de tempo  $\Delta t$  é dado por:  $(J_s(x, t) - J_s(x + \Delta x, t)) \cdot A \cdot \Delta t$  (5.12)

A variação líquida de partículas dentro do elemento de volume durante o intervalo de tempo  $\Delta t$  também pode ser expressa em termos da concentração  $C(x, t)$  aproximando o número de partículas dentro do elemento de volume  $A \cdot \Delta x$  em qualquer instante de tempo por  $C(x + \Delta x / 2, t) \cdot A \cdot \Delta x$ .

Desta forma, podemos escrever a variação líquida do número de partículas dentro do elemento de volume no intervalo  $\Delta t$  como o número de partículas em  $t + \Delta t$  menos o número de partículas em  $t$

$$(C(x, \Delta x / 2, t + \Delta t) - C(x, \Delta x / 2, t)) \cdot A \cdot \Delta x \quad (5.13)$$

Considerando o princípio da conservação da matéria, a variação do número de partículas dentro do volume em um intervalo de tempo  $\Delta t$  é dado pela quantidade de partículas que entra menos a quantidade de partículas que sai. Sendo assim, podemos igualar as Equações 5.12 e 5.13.

$$\frac{J_s(x,t) - J_s(x + \Delta x, t)}{\Delta x} = \frac{C(x + \Delta x/2, t + \Delta t) - C(x + \Delta x/2, t)}{\Delta t} \quad (5.14)$$

A expressão (14) pode ser reescrita como:

$$\frac{J_s(x + \Delta x, t) - J_s(x, t)}{\Delta x} = - \frac{C(x + \Delta x/2, t + \Delta t) - C(x + \Delta x/2, t)}{\Delta t}$$

Tomando-se os limites para  $\Delta x \rightarrow 0$  e  $\Delta t \rightarrow 0$ , a Equação 5.14 toma a forma:

$$\frac{\partial J_s(x, t)}{\partial x} = - \frac{\partial C(x, t)}{\partial t} \quad (5.15)$$

que é a Equação da continuidade

Derivando a *primeira lei de Fick* (Equação 5.11) em relação a  $x$ , obtêm-se:

$$\frac{\partial J_s(x, t)}{\partial x} = - \frac{\partial}{\partial x} D \frac{\partial C(x, t)}{\partial x} \quad (5.16)$$

Combinando as equações 5.15 e 5.16, obtêm-se

$$\frac{\partial C(x, t)}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} D \frac{\partial C(x, t)}{\partial x} \quad (5.17)$$

que é a *segunda lei de Fick*

Se  $D$  não depende de  $x$  e for constante com o tempo, podemos escrever a Equação 5.17 como:

$$\frac{\partial C(x, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C(x, t)}{\partial x^2} \quad (5.18)$$

Lembrando-se que  $\frac{\partial^2}{\partial x^2}$  é a definição do operador Laplaciano em

coordenadas cartesianas em uma dimensão ( $x$ ). A Equação 5.18 pode ser reescrita na forma geral como:

$$\frac{\partial C(x, t)}{\partial t} = D \nabla^2 C(x, t)$$

## 5.5 – Determinação do coeficiente de difusão

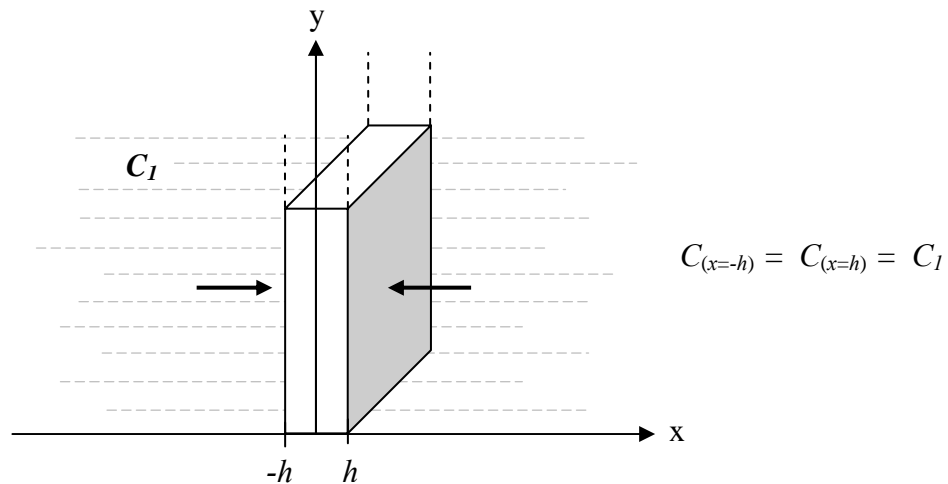
É comum realizar o estudo da difusão de líquidos orgânicos em polímeros através do método gravimétrico. Neste método é realizada a medida da massa de uma membrana polimérica imersa em um líquido em função do tempo, em vez de se considerar a transferência de matéria.

O estudo do transporte de água em membranas poliméricas pode ser tratado quantitativamente pela segunda lei de Fick (Equação 5.18). A solução desta equação para membranas permite o cálculo do coeficiente de difusão de um solvente em uma membrana. O método para solução da segunda lei de Fick para uma membrana encontrado na literatura faz uso das funções de Green, o que torna o método complexo.<sup>5</sup> Desta forma, o Prof. Luiz F. Pontin, do Departamento de Matemática da UNIFEI, juntamente com a aluna do curso Materiais para Engenharia, Maria L. C. Falcão, desenvolveu uma nova metodologia para a solução da segunda lei de Fick para uma membrana.<sup>7</sup> Esta nova metodologia contorna as dificuldades introduzidas pelas funções de Green e possibilita a sua fácil compreensão. A seguir é apresentado o desenvolvimento da solução da segunda lei de Fick para uma membrana segundo esta nova metodologia, introduzindo algumas modificações e correções no desenvolvimento das expressões.

A segunda lei de Fick pode ser solucionada considerando-se uma membrana semi-infinita imersa em um banho semi-infinito, como mostrado na Figura 5.3. Se o volume do recipiente é muito grande em relação às dimensões de amostra, a concentração da espécie difusora pode ser considerada constante, como também a sua concentração sobre as duas faces principais do filme. A metodologia utilizada para resolução deste problema é o método de separação de variáveis acoplado à série de Fourier.<sup>8</sup> Este método consiste em propor uma solução  $C(x,t)$ , constituída pelo produto de duas funções, sendo a primeira função apenas de  $x$  e a segunda função apenas de  $t$ . Desta forma:

$$C(x,t) = M(x)N(t) \quad (5.19)$$

sendo  $M(x)$  uma função apenas da variável  $x$  e  $N(t)$  uma função apenas da variável  $t$ .



**Figura 5.3:** Representação esquemática da difusão de líquido em uma membrana polimérica.

A segunda lei de Fick então assume a seguinte forma:

$$M(x) \frac{dN(t)}{dt} = DN(t) \frac{d^2 M(x)}{dx^2}$$

Que pode ser reescrita como:

$$\frac{1}{DN(t)} \cdot \frac{dN(t)}{dt} = \frac{1}{M(x)} \cdot \frac{d^2 M(x)}{dx^2} \quad (5.20)$$

Observa-se que, na Equação 5.20, o primeiro membro depende apenas de  $t$  e o segundo membro apenas de  $x$ . Assim, para que a igualdade seja satisfeita ambos os membros devem ser constantes. Essa constante, denominada constante de separação, por conveniência, será chamada de  $-\omega^2$ . Assim, obtêm-se as seguintes expressões:

$$\frac{1}{DN(t)} \cdot \frac{dN(t)}{dt} = -\omega^2$$

Que pode ser reescrita como:

$$\frac{dN(t)}{dt} + D\omega^2 \cdot N(t) = 0 \quad (5.21a)$$

e

$$\frac{1}{M(x)} \cdot \frac{d^2 M(x)}{dx^2} = -\omega^2$$

Que pode ser reescrita como:

$$\frac{d^2M(x)}{dx^2} + \omega^2.M(x) = 0 \quad (5.21b)$$

A Equação 5.21a é uma Equação diferencial ordinária linear de primeira ordem, cuja solução geral é:

$$N(t) = e^{-\omega^2 Dt}$$

A Equação 5.21b é uma Equação diferencial ordinária linear de segunda ordem, cuja solução geral é:

$$M(x) = a \cos \omega x + b \sin \omega x$$

onde os coeficientes  $a$  e  $b$  podem ser determinados considerando a condição inicial

$$C(x, t) = 0, \quad -h < x < h$$

e a condição de contorno

$$C(\pm h, t) = 0, \quad \text{para } t \geq 0$$

A solução geral da segunda lei de Fick (Equação 5.18), para uma membrana é dada por:

$$C(x, t) = (a \cos \omega x + b \sin \omega x) e^{-\omega^2 Dt} \quad (5.23)$$

A solução dada pela Equação 5.23 não satisfaz condições de contorno arbitrárias. Assim, para satisfazer condições de fronteira não homogêneas, segundo Fourier, deve ser proposta uma solução do tipo:

$$C(x, t) = a_0 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (a_n \cos \omega_n x + b_n \sin \omega_n x) e^{-\omega_n^2 Dt} \quad (5.24)$$

As constantes  $a_n$ ,  $b_n$  e  $\omega = n2\pi/P$  podem ser determinadas através das condições de contorno.

Como a membrana é homogênea e simétrica, tem-se que:

$$C(-x, t) = C(x, t), \quad \text{para } -h \leq x \leq h \text{ e } t \geq 0$$

Assim, a Equação 5.24 pode ser reescrita como:

$$C(-x, t) = a_0 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (a_n \cos \omega_n(-x) + b_n \sin \omega_n(-x)) e^{-\omega_n^2 Dt}$$

$$C(-x, t) = a_0 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (a_n \cos \omega_n x - b_n \sin \omega_n x) e^{-\omega_n^2 Dt} \quad (5.25)$$

Para que a igualdade acima seja verificada para  $-h \leq x \leq h$  e  $t \geq 0$  é necessário que  $b_n = 0$  para  $n = 1, 2, 3, \dots$

Desta forma, a Equação 5.24 torna-se:

$$C(x,t) = a_0 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (a_n \cos \omega_n x) e^{-\omega_n^2 D t} \quad (5.26)$$

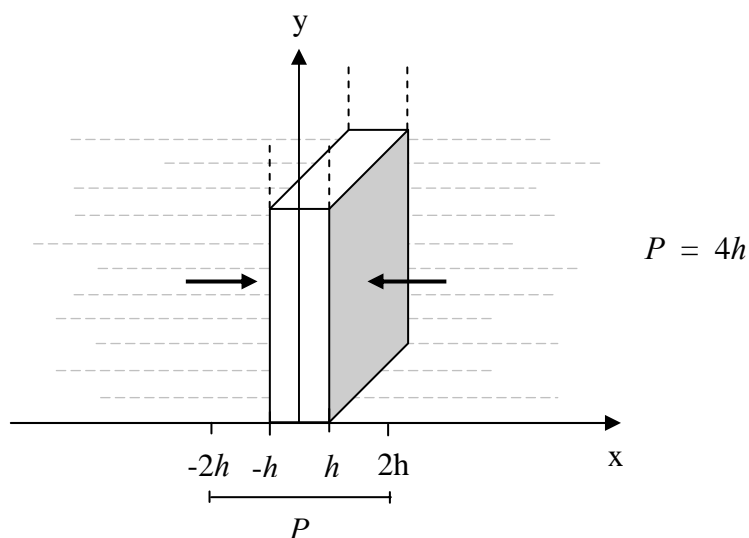
Para o cálculo da solução particular da segunda lei Fick, as seguintes condições de contorno podem se aplicadas:

$$C(x,0) = 0, \quad -h < x < h$$

$$C(\pm h, t) = C_1$$

Para se determinar as constantes  $a_n$  e  $P$  (período da função), é necessário efetuar a extensão periódica par da condição inicial, ou seja, estender o valor da concentração  $C_1$  até  $\pm 2h$ , como mostrado na Figura 5.4.

A constante  $P$  é dada por  $P = 4h$ .



**Figura 5.4:** Representação da extensão periódica par da condição inicial.

Os coeficientes  $a_n$  para  $n = 1, 2, 3, \dots$  são dados por:

$$a_n = \frac{2}{P} \int_{-P/2}^{P/2} C(x,0) \cos\left(\frac{2n\pi}{P} x\right) dx \quad (5.27)$$

Sabendo-se que  $C(x,0)$  é uma função par e que  $P = 4h$ , a Equação 5.27 pode ser escrita como:

$$\begin{aligned}
 a_n &= \frac{1}{2h} \int_{-2h}^{2h} C(x,0) \cdot \cos\left(\frac{n\pi}{2h}\right) x \cdot dx \\
 a_n &= \frac{1}{2h} \int_{-2h}^{2h} C_1 \cdot \cos\left(\frac{n\pi}{2h}\right) x \cdot dx = \frac{C_1}{n\pi/2h} \left[ \frac{\sin(n\pi/2h)x}{n\pi/2h} \right]_{-2h}^{+2h} \\
 a_n &= \frac{2C_1}{n\pi} \left( \text{sen}n\pi - \text{sen}\frac{n\pi}{2} \right) = -\frac{2C_1}{n\pi} \cdot \text{sen}\frac{n\pi}{2} \quad (5.28)
 \end{aligned}$$

Os valores de  $a_n$  podem ser obtidos a partir de uma tabela da função seno. A Tabela 5.1 apresenta o valor de  $\text{sen}\left(\frac{n\pi}{2}\right)$  para alguns valores de  $n$ .

**Tabela 5.1:** Alguns valores da função  $\text{sen}(n\pi/2)$ .

$n$	$\text{sen}(n\pi/2)$
0	0
1	1
2	0
3	-1
4	0

De acordo com a Tabela 5.1, percebe-se que os valores de  $\text{sen}(n\pi/2)$  são diferentes de zero apenas para valores de  $n$  inteiro e ímpar.

Para  $n = 0$ , tem-se:

$$a_0 = \frac{1}{h} \int_h^{2h} C_1 dx = \frac{C_1}{hx} \Big|_h^{2h} = \frac{C_1}{h} (2h - h) = C_1$$

Assim, a partir da Equação 5.26, a seguinte relação pode ser obtida:

$$C(x,t) = C_1 - \frac{4C_1}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^{n+1}}{(2n-1)} \cos \frac{(2n-1)\pi x}{2h} \cdot e^{-D \left[ \frac{(2n-1)\pi}{2h} \right]^2 t} \quad (5.29)$$



A concentração de saturação, no tempo de equilíbrio ( $t \rightarrow \infty$ ), é:

$$C(x, t) \xrightarrow{t \rightarrow \infty} C_1 \equiv C_\infty$$

Então, no tempo de equilíbrio e para  $-h \leq x \leq h$  e  $t \geq 0$ , a Equação 5.29 pode ser escrita como:

$$\frac{C(x, t)}{C_\infty} = 1 - \frac{4}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^{n+1}}{(2n-1)} \cos \frac{(2n-1)\pi x}{2h} e^{-D \left[ \frac{(2n-1)\pi}{2h} \right]^2 t} \quad (5.30)$$

Esta equação exprime a razão entre a concentração de solução dentro da membrana em uma posição  $x$  e tempo  $t$  e a concentração de solução no tempo de equilíbrio.

Para se obter a quantidade total de matéria absorvida pela membrana por unidade de tempo,  $M(t)$ , basta integrar a Equação 5.30 em toda a espessura da membrana, obtendo-se a seguinte expressão:

$$M(t) = \int_{-h}^h C(x, t) dx = \int_{-h}^h \left[ C_1 - \frac{4C_1}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^{n+1}}{(2n-1)} \cos \left[ \frac{(2n-1)\pi x}{2h} \right] e^{-D \left[ \frac{(2n-1)\pi}{2h} \right]^2 t} \right] dx$$

$$M(t) = \int_{-h}^h C_1 dx - \frac{4C_1}{\pi} \int_{-h}^h \left[ \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^{n+1}}{(2n-1)} \cos \left[ \frac{(2n-1)\pi x}{2h} \right] e^{-D \left[ \frac{(2n-1)\pi}{2h} \right]^2 t} \right] dx \quad (5.31)$$

Para solucionar a segunda integral da relação acima, é necessário extrair o somatório da integral. Para que isto seja realizado, é necessário que a série seja convergente uniformemente no intervalo  $[-h, h]$ . A convergência dessa série é garantida

pelo termo  $\exp \left( \left[ -D \frac{(2n-1)\pi}{2h} \right]^2 t \right)$ , portanto:

$$M(t) = 2hC_1 - \frac{4C_1}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^{n+1}}{(2n-1)} e^{-D \left[ \frac{(2n-1)\pi}{2h} \right]^2 t} \int_{-h}^h \cos \frac{(2n-1)\pi x}{2h} dx \quad (5.32)$$

Resolvendo a integral existente na relação (5.32), obtem-se:

$$\int_{-h}^h \cos \frac{(2n-1)\pi x}{2h} .dx = 2 \int_0^h \cos \frac{(2n-1)\pi x}{2h} .dx = 2 \operatorname{sen} \frac{\left(\frac{2n-1}{2h}\right) \pi x}{\frac{(2n-1)\pi}{2h}} \Big|_0^h = \frac{4h}{(2n-1)\pi} (-1)^{n+1}$$

A Equação 5.32 assume então a forma:

$$M(t) = 2hC_1 - \frac{4C_1}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^{n+1}}{(2n-1)} e^{-D \left[ \frac{(2n-1)\pi}{2h} \right]^2 t} \frac{4h}{(2n-1)\pi} (-1)^{n+1} =$$

$$M(t) = 2hC_1 - \frac{16hC_1}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n-1)^2} e^{-D \left[ \frac{(2n-1)\pi}{2h} \right]^2 t} \quad (5.33)$$

Na concentração de saturação ( $t \rightarrow \infty$ ):

$$M(t) \xrightarrow{t \rightarrow \infty} C_1 \cdot 2h \equiv M_{\infty}$$

a Equação 5.33 pode ser escrita como:

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp \left[ \left( - \frac{D(2n+1)^2 \pi^2}{(2h)^2} \right) t \right] \quad (5.34)$$

Os termos da Equação 5.34 convergem rapidamente com o crescimento de  $t$ . Desta forma, o coeficiente de difusão ( $D$ ) pode ser calculado, aproximadamente, tomando-se o primeiro termo da série ( $n = 0$ ) apresentada pela Equação 5.34. Assim, a seguinte expressão pode ser obtida:

$$1 - \frac{M_t}{M_{\infty}} = \frac{8}{\pi^2} .e^{-D \left[ \frac{\pi}{2h} \right]^2 t}$$

Aplicando o logaritmo nesta Equação, obtemos:

$$\ln \left( 1 - \frac{M_t}{M_{\infty}} \right) = \ln \left( \frac{8}{\pi^2} \right) - \frac{D\pi^2 t}{h^2} \quad (5.35)$$

A Equação 5.35 pode ser comparada com a Equação de uma reta em um gráfico  $\ln \left[ 1 - \frac{M_t}{M_{\infty}} \right]$  versus  $t$ , através do qual  $D$  pode ser obtido em função do coeficiente angular,  $\alpha$ , da reta, segundo a relação:

$$D = - \frac{\alpha h^2}{\pi^2} \quad (5.36)$$

## 5.6 – Mecanismo de difusão de solvente através de uma membrana polimérica.

O mecanismo de difusão em um polímero é fenômeno complexo que, a um nível microscópico, pode ser classificado em três categorias:<sup>9-13</sup>

1 - Difusão “Fickiana”, ou Caso I (Figura 5.4 - A). Se refere ao processo no qual a taxa de difusão do solvente é muito menor que a taxa de relaxação das cadeias poliméricas devido a fatores estruturais e mecânicos. Neste mecanismo, o equilíbrio de sorção é rapidamente atingido. O processo de sorção é independente da cinética de intumescimento.

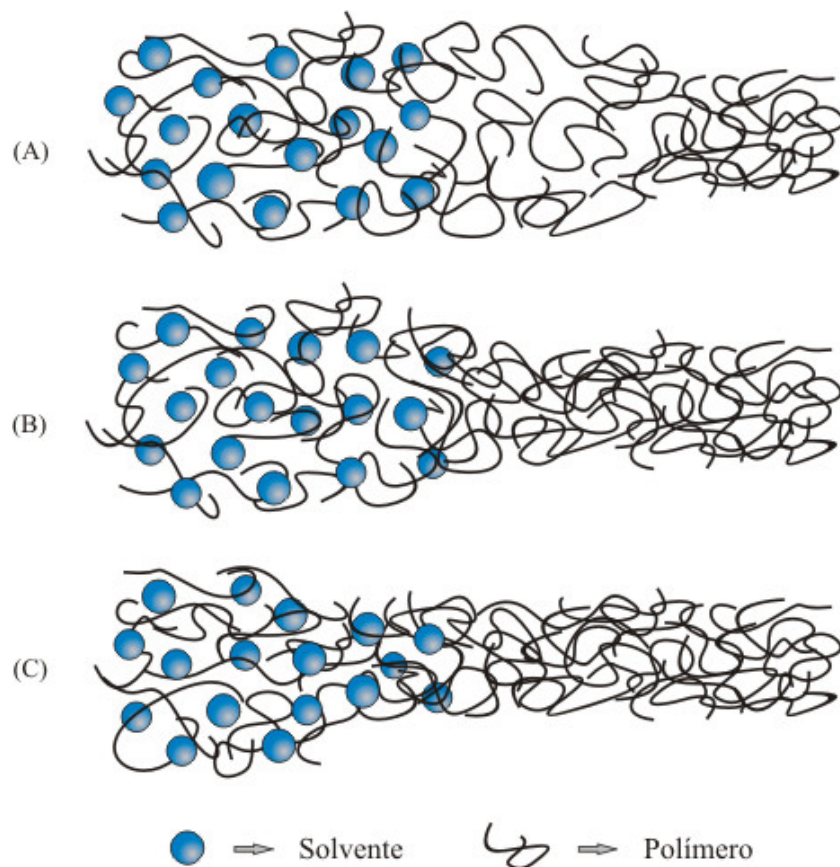
2 - Difusão não “Fickiana”, ou Caso II (Figura 5.4 - C). Se refere ao processo no qual a taxa de difusão é maior que o processo simultâneo de relaxação das cadeias poliméricas. O processo de sorção é fortemente dependente da cinética de intumescimento.

3 – Difusão anômala (Figura 5.4 - B). Se refere ao processo no qual a taxa de difusão do solvente é comparável a taxa de relaxação das cadeias poliméricas. Neste caso, o processo de difusão no solvente é afetado apenas pela presença de porosidades na matriz polimérica.

O mecanismo de difusão de um solvente através de uma membrana polimérica pode ser estudado através da seguinte relação empírica:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad (5.37)$$

sendo  $K$  uma constante que depende das características estruturais do polímero.  $n$  determina o mecanismo de transporte:  $n = 0,5$  mecanismo de Fick e  $n = 1$  mecanismo de difusão não “Fickiano”. Quando  $0,5 < n < 1$  a difusão é anômala. A Equação 5.37 é somente válida para análise até os primeiros 60% de intumescimento ( $M_t/M_\infty \leq 0,6$ ) e não pode ser utilizada na análise nos pontos de inflexão tipicamente observados nas curvas de intumescimento.



**Figura 5.4:** Desenho esquemático do mecanismo de difusão “Fickiano” (A), anômalo (B) e não “Fickiano” (C).

### 5.7 – Parâmetros termodinâmicos associados ao processo de difusão

A energia de ativação para o processo de difusão de um solvente em um polímero é uma medida da energia gasta para vencer as forças coesivas do polímero para que haja a formação de vacâncias através das quais a difusão irá ocorrer.

A energia de ativação ( $E_a$ ) para o processo de difusão de solvente em um polímero pode ser calculada através da equação de Arrhenius. Esta Equação fornece a dependência do coeficiente de difusão com a temperatura. A Equação de Arrhenius é dada por:<sup>11,13,15</sup>

$$D = D_0 e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (5.38)$$

onde  $D$  é o coeficiente de difusão a uma temperatura  $T$ ,  $D_0$  um fator pré-exponencial,  $E_a$  é a energia de ativação para o processo de difusão e  $R$  a constante dos gases.

A entalpia,  $H_i$ , associada ao intumescimento do hidrogel pode ser calculada através da Equação de Gibbs-Helmholtz:<sup>8,9,12</sup>

$$\frac{d \ln(M_\infty)}{d(1/T)} = \frac{H_i}{R} \quad (5.39)$$

sendo  $M_\infty$  a massa da membrana no tempo de equilíbrio  $t$  de intumescimento,  $T$  a temperatura (K) e  $R$  a constante dos gases.

### 5.8 – Densidade de reticulações

A densidade de reticulações,  $\nu_e$ , é uma importante propriedade dos materiais poliméricos. A densidade de reticulações está intimamente relacionada com as propriedades físico-químicas do material, como propriedades mecânicas e térmicas.

A densidade de reticulações pode ser calculada através da expressão:<sup>4,12,15</sup>

$$\nu_e = \frac{\gamma \phi^{-1/3}}{3RT} \quad (5.40)$$

sendo  $\gamma$  o módulo de Young do polímero no equilíbrio de intumescimento,  $\phi$  a fração de polímero no hidrogel,  $R$  a constante dos gases e  $T$  a temperatura (K). Por sua vez,  $\phi$  é dado por:

$$\phi = \frac{m_b / \rho_p}{m_b / \rho_p + (m_a - m_b) / \rho_s}$$

sendo  $m_a$  e  $m_b$  as massa do filme antes a após o processo de intumescimento, respectivamente.  $\rho_p$  é a densidade do polímero e  $\rho_s$  a densidade do solvente. A densidade de reticulação de um polímero é dada em unidades de mols de reticulações por centímetro cúbico de polímero.

### 5.9 – Considerações finais

Neste capítulo foi descrita a fenomenologia de transporte de água em membranas poliméricas. Através da segunda lei de Fick foram desenvolvidas relações que permitem o estudo da sorção de analito por um biossensor, bem como a descrição deste mecanismo do ponto de vista da física-matemática.

Dando prosseguimento ao estudo das bases teóricas necessárias para o projeto de um biossensor, no próximo capítulo será apresentada a fundamentação teórica da modelagem molecular. Através da modelagem molecular é possível uma melhor compreensão da interação entre o polímero e o mediador de elétrons utilizados na construção do biossensor, auxiliando na interpretação das propriedades ópticas e elétricas do dispositivo.

### 5.10 - Referências bibliográficas

1. *Flory-Huggins-Theorie*. Disponível em <<http://www.e13.physik.tu-uenchen.de/Muellerb/Uebung/polymerv04neu.pdf>>. Acesso em 30 agosto 2006.
2. Kayaman, N.; Okay, O.; Baysal, B. M. Phase transition of polyacrylamide gels in PEG solutions. *Polymer Gels and Networks*. 5, 167-184, 1997.
3. Oh, K. S.; Bae, Y. C. Volume phase transition of submicron sized copolymer gel particles. *European Polymer Journal*. 35, 1653-1659, 1999.
4. Wang, J.; Wu, Wenhui. Swelling Behaviors, tensile properties and thermodynamics studies of water sorption of 2-hydroxyethyl methacrylate/epoxy methacrylate copolymeric hydrogels. *European Polymer Journal*. 40, 1143-1151, 2005.
5. J. Philibert, A. C. S. Sabioni, F. Dymont. *Difusão em Materiais*. Ouro Preto: REM. 1996.
6. Descrição Microscópica da Difusão. Disponível em <<http://neuron.ffclrp.usp.br/2004-I-NC-difusao.pdf>>. Acesso em 03 de outubro de 2006.
7. FALCÃO, M. L. C. Síntese e Caracterização de Estruturas Porosas de Quitosana pela Técnica de Separação de Fase Para Aplicações Biomédicas. 120. Dissertação – Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2003.
8. Butkov, E. *Física Matemática*. Rio de Janeiro: LTC – Livros técnicos e científicos.
9. Aminabhavi, T.; Aithal, U. S. An Overview of the Theoretical Models Used to Predict Transport of Small Molecules Through Polymer Membranes. *Rev. Macromol. Chem. Phys.* 28, 421-474, 1988.
10. de Queiroz, A. A. A.; Soarez, D. A. W.; Trzesniak, P.; Abraham, G. A. Resistive-Type Humidity Sensors Based on PVP-Co and PVP-I<sub>2</sub> Complexes. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*. 39, 459-469, 2001.

11. Gan, L. H.; Deen, G. R.; Gan, Y. Y.; Tam, K. C. Water sorption studies of new pH-responsive N-acryloyl-N'-methyl piperazine and methyl methacrylate hydrogels. *European polymer Journal*. 37, 1473-1478, 2001.
12. Bajpai, S. K. Johnson, S. Superabsorbent hydrogels for removal of divalent toxic ions. Part I: Synthesis and swelling characterization. *Reactive & Functional Polymers*. 62, 271-283, 2005.
13. de Queiroz, A. A. A.; Gallardo, A.; Román, J. S. Vinylpyrrolidone-N,N'-dimethylacrylamide water-soluble copolymers: synthesis, physical-chemical properties and proteic interactions. *Biomaterials*. 21, 1631-1643, 2000.
14. Hedenqvist, M.; Gedde, U. W. Diffusion of Small-Molecule Penetrants in Semicrystalline Polymers. *Pergamon*. 0079-6700(95)00022-4, 1996.
15. Ding, Z. Y.; Aklonis, J. J.; Salovey, R. Model Filled Polymers. VI. Determination of the Crosslink Density of Polymeric Beads by Swelling. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*. 29, 1035-1038, 1991.

## CAPÍTULO 6 - MODELAGEM MOLECULAR COMO FERRAMENTA DE PESQUISA EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

---

### 6.1 - Introdução

A modelagem molecular (MM), baseada nos métodos da química quântica, constitui uma ferramenta poderosa para o desenvolvimento de novos materiais<sup>1</sup>. Esta ferramenta permite prever, por exemplo, a estrutura química, propriedades e reatividade de um material antes que este seja sintetizado. A MM é utilizada para complementar, interpretar, prever ou até substituir medidas experimentais com uma conseqüente economia de tempo e material, e sem a necessidade de laboratórios especializados. Em conseqüência, encontramos aplicações em MM em diversas áreas, desde a indústria farmacêutica, no desenvolvimento de novos medicamentos, até a indústria química, no desenvolvimento de catalisadores e novos produtos. As técnicas de MM permitem criar modelos virtuais de materiais diversos, tanto a nível molecular quanto a atômico, através da resolução da equação de Schrödinger. A MM fornece informações acerca da geometria mais estável, energia, distribuição de cargas elétricas, dados termodinâmicos e cinéticos, propriedades espectroscópicas e mecânicas.

Neste trabalho, a interação entre o polímero e o mediador de elétrons utilizados na construção do biossensor será estudada através da MM. O estudo da interação entre essas duas moléculas permitirá a melhor compreensão das características físico-químicas do biossensor. Através de mapa do potencial de ionização das moléculas envolvidas, será estudada a interação entre elas, auxiliando na interpretação de dados espectroscópicos. A localização e energias dos orbitais de fronteira permitirão a compreensão do mecanismo de transporte elétrico no biossensor.

Os procedimentos da MM para cálculo de estruturas moleculares e suas energias, podem ser classificados basicamente de duas formas<sup>3</sup>: Modelos mecânico-moleculares e modelos químico-quânticos. Os modelos mecânico-moleculares tratam a molécula como um conjunto de átomos e suas ligações. As interações são representadas por potenciais clássicos, como osciladores harmônicos. Os modelos químico-quânticos tratam a molécula como um conjunto de núcleos e elétrons.



O desenvolvimento dos modelos químico-quânticos se dá a partir da mecânica quântica, que descreve as moléculas em termos das interações entre núcleos e elétrons, e a geometria molecular em termos do arranjo de menor energia entre os núcleos. A solução da equação de Schrödinger (Equação 6.1) leva diretamente à estrutura molecular e energia, entre outros observáveis. Contudo, para solucionar a equação de Schrödinger para sistemas multieletrônicos, são necessárias aproximações. Estas aproximações são introduzidas pelo modelo das partículas independentes, levando a simplificações que permitem o tratamento matemático da equação de Schrödinger para sistemas multieletrônicos.

$$-\frac{\hbar}{2m}\nabla^2\Psi + E_p\Psi = E\Psi \quad (6.1)$$

## 6.2 – O modelo das Partículas Independentes

Na formulação independente do tempo e em unidades atômicas, a equação de Schrödinger é descrita como<sup>3</sup>:

$$\hat{H}\Psi(R, r) = E\Psi(R, r) \quad (6.2)$$

sendo  $R$  e  $r$  respectivamente as coordenadas dos  $M$  núcleos e dos  $N$  elétrons e  $H$  é o operador Hamiltoniano, dado por:

$$\hat{H} = -\frac{1}{2}\sum_i^{\text{elétrons}}\nabla_i^2 - \frac{1}{2}\sum^{\text{núcleos}}\frac{1}{M_A}\nabla_A^2 - \sum_i^{\text{elétrons}}\sum_A^{\text{núcleos}}\frac{Z_A}{R_{iA}} + \sum_{i<j}^{\text{elétrons}}\frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A<B}^{\text{núcleos}}\frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (6.3)$$

sendo  $Z$  a carga nuclear,  $M_A$  a razão entre a massa dos núcleos,  $A$  é a massa de um elétron,  $R_{AB}$  a distância entre os núcleos  $A$  e  $B$ ,  $r_{ij}$  a distância entre os elétrons  $i$  e  $j$  e  $r_{iA}$  a distância entre um elétron  $i$  e um núcleo  $A$ . Os termos desta equação são respectivamente, o operador de energia cinética dos elétrons, operador de energia cinética dos núcleos, operador de energia potencial de atração núcleo-elétron, repulsão elétron-elétron e repulsão núcleo-núcleo. Nesta expressão observam-se termos  $(1/r_{ij})$  onde as coordenadas dos elétrons  $i$  e  $j$  estão acopladas, termos  $(1/R_{AB})$  onde as coordenadas de núcleos  $A$  e  $B$  estão acopladas e termos  $(1/r_{iA})$ , onde as coordenadas dos elétrons  $i$  e núcleos  $A$  estão acopladas.

O Modelo das Partículas Independentes propõe a construção de um modelo físico-matemático para contornar as dificuldades criadas por estes acoplamentos

de variáveis através da introdução de aproximações na equação de Schrödinger. As principais aproximações serão apresentadas a seguir.

### 6.3 - Aproximação de Born-Oppenheimer

A aproximação de Born-Oppenheimer parte da consideração de que os elétrons e núcleos, interpretados como partículas clássicas, possuem velocidades diferentes ( $v_{\text{núcleo}} \ll v_{\text{elétron}}$ ). Desta forma, assumimos que o núcleo não se move, o que leva a uma equação de Schrödinger “eletrônica”.

$$\hat{H}^{el} \Psi^{el}(R, r) = E^{el} \Psi^{el}(R, r) \quad (6.4)$$

Os termos do Hamiltoniano relacionados à energia cinética são desprezados e os termos relacionados à interação eletrostática dos núcleos se tornam uma constante. O Hamiltoniano então assume a seguinte forma:

$$\hat{H}^{el} = -\frac{1}{2} \sum_i^{elétrons} \nabla_i^2 - \sum_i^{elétrons} \sum_A^{núcleos} \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i < j}^{elétrons} \frac{1}{r_{ij}} \quad (6.5)$$

O termos relacionados à interação eletrostática dos núcleos devem ser somados a energia eletrostática total:

$$E = E^{el} + \sum_{A < B}^{núcleos} \sum \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (6.6)$$

A equação de Schrödinger ainda é intratável e outras aproximações são necessárias. A obtenção da função de onda “eletrônica”  $\Psi^{el}(R, r)$  se dá através da formulação matemática desenvolvida por Douglas Hartree e Vladimir Fock, sendo conhecida como método de Hartree-Fock (HF).

### 6.4 - Aproximação de Hartree-Fock

A dificuldade para solucionar a equação de Schrödinger para sistemas multieletrônicos está associada ao termo de repulsão intereletrônica do Hamiltoniano<sup>4</sup>. Esta dificuldade pode ser contornada substituindo a interação entre um elétron e os demais  $N-1$  elétrons pela interação deste elétron com o campo médio gerado pelos elétrons restantes<sup>3,4</sup>. A posição instantânea dos elétrons não é considerada. A função de onda total do sistema de  $N$  elétrons é escrita na forma de um determinante chamado Determinante de Slater<sup>3</sup>. O determinante indica que a função eletrônica deve mudar de

sinal quando duas coordenadas são intercambiadas, introduzindo a anti-simetria, que é um requisito do princípio da exclusão de Pauli.

$$\Psi = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \phi_1(1) & \phi_2(1) & \dots & \phi_n(1) \\ \phi_1(2) & \phi_2(2) & \dots & \phi_n(2) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \phi_1(N) & \phi_2(N) & \dots & \phi_n(N) \end{vmatrix} \quad (6.7)$$

Os elementos  $\phi_i$  do determinante são chamados spin-orbitais do átomo e é definido pelo produto entre a função espacial, ou orbital molecular,  $\psi_i$ , e a função de spin,  $\alpha$  ou  $\beta$ . O termo  $1/\sqrt{N!}$  é a constante de normalização da função de onda<sup>6</sup>.  $\Psi$  exprime o orbital molecular como uma combinação linear dos orbitais atômicos. Desta forma obtém-se a dependência do operador Hamiltoniano com o spin do elétron<sup>3</sup>.

O método de Hartree-Fock busca uma solução aproximada do estado fundamental de um sistema de elétrons num átomo ou numa molécula considerando apenas um determinante de Slater<sup>5</sup>. Para obter a melhor aproximação possível nesta forma “monodeterminante” é preciso desenvolver um critério de escolha das funções de estado de uma partícula, ou seja, dos spin-orbitais, que comporão o determinante de Slater. Este critério é obtido minimizando a energia  $E$  do sistema com relação aos spin-orbitais através do método variacional.

Segundo o método variacional, a energia calculada a partir de uma aproximação de uma função de onda real, será sempre maior que a energia real<sup>6</sup>. Conseqüentemente, a melhor função de onda aproximada será aquela que leva a uma energia mínima. Como resultado da aplicação deste método à expressão para a, obtém-se as equações de Fock<sup>3</sup>:

$$\hat{F}(i)\phi(x_i) = \varepsilon_i\phi(x_i) \quad (6.8)$$

$\phi(x_i)$  são funções de apenas um elétron com energia  $\varepsilon$ , chamadas de *funções orbitais*.  $\phi(x_i)$  é uma autofunção do operador de Fock  $f(i)$ , definido como sendo:

$$\hat{F}(i) = -\frac{1}{2}\nabla_i^2 + v^{ef}(i) \quad (6.9)$$

onde  $v^{ef}(i)$  é o potencial médio gerado pelos  $N-1$  elétrons do sistema. Este termo depende das demais funções  $\phi(x_i)$  relativas a estes elétrons, existindo portanto acoplamento neste sistema de equações. O operador de Fock é efetivamente o hamiltoniano de um único elétron de um sistema polieletrônico<sup>6</sup>.

As equações de Hartree-Fock são uma série de equações diferenciais acopladas que envolvem a coordenada de um único elétron e podem ser resolvidas numericamente<sup>3</sup>. Como o método de Hartree-Fock obtém-se uma solução aproximada para a equação de Schrödinger, ou seja, um produto anti-simétrico de funções de um elétron ou orbitais.

## 6.5 - Aproximação LCAO

J. J. Rothraan sugeriu que os orbitais moleculares fossem expandidos como uma combinação linear de um conjunto finito de funções previstas, conhecidas como *funções de base*  $\chi$ , que representam os orbitais atômicos, ou orbitais de Hartree-Fock<sup>2,3,4</sup>. A expansão é chamada combinação linear de orbitais atômicos (**LCAO** – Linear Combination of Atomic Orbitals) e pode ser escrita como:

$$\phi_i = \sum_k^{\text{funções de base}} c_{ki} \chi_k \quad (6.10)$$

onde  $c$  são coeficientes de combinação linear que representarão os orbitais moleculares  $\phi_i$  como combinação linear de  $\mu$  funções bases  $\chi$  (orbitais atômicos) previamente escolhidas.

Os orbitais atômicos e moleculares são considerados como vetores em um espaço não euclidiano<sup>4</sup>. Por analogia com o espaço euclidiano, pode-se imaginar que um vetor qualquer em um espaço de  $k$  dimensões possa ser escrito como uma combinação linear de vetores ortonormais que formem uma base no espaço. Os orbitais atômicos e moleculares apresentam características vetoriais, mas como são funções matemáticas, não estão em um espaço vetorial euclidiano.

A idéia de uma base no espaço euclidiano deve ser substituída por uma base construída por funções matemáticas linearmente independentes e ortonormais. Desta forma, os orbitais atômicos e moleculares devem ser obtidos como combinação linear dessa base de funções.

Considerando que  $\phi$  será sempre centralizado nas posições dos núcleos, eliminamos a necessidade de especificar a sua localização<sup>3</sup>. Desta forma, a resolução das equações de um elétron obtidas com o método HF é transformada em uma álgebra de matrizes, ou seja, requer a determinação do conjunto de coeficientes  $\{C_{ui}\}$ .

Um ponto importante do método do Hartree-Fock é a escolha das funções base a serem utilizadas para representar os orbitais de Hartree-Fock<sup>4</sup>. O conjunto de funções base deve fornecer a melhor representação possível da distribuição eletrônica do sistema e apresentar possibilidade de implementação computacional através de expressões matemáticas analíticas. Ao escolher o conjunto de funções base, devemos considerar basicamente os seguintes aspectos:

1) As funções base devem permitir fácil ajuste com relação ao sistema utilizado e levar a propriedades físicas compatíveis com as observadas experimentalmente. 2) O número de funções de base a ser utilizado deve corresponder ao de uma série completa, ou tão próximo desta quanto possível. No entanto, a número de funções base deve ser o menor possível. O número de integrais de energia cinética e atração núcleo-elétron cresce na ordem de  $n^2$ , enquanto que o número de integrais de repulsão elétron-elétron cresce na ordem de  $n^4$ , onde  $n$  é o número de funções base. 3) O tipo e o número de funções bases devem permitir que todas as integrais necessárias ao cálculo de propriedades do sistema sejam obtidas sem grandes dificuldades. Este último aspecto é puramente computacional.

O tipo de funções base mais comumente utilizada é a função gaussiana do tipo<sup>2,4</sup>:

$$\phi_{\mu} = \left( \frac{B\alpha^L}{\pi^T} \right)^S f \exp(-\alpha r^2) \quad (6.11)$$

sendo  $B$ ,  $L$ ,  $T$  e  $S$  constantes e  $f$  uma função que caracteriza o tipo de função gaussiana (s, p, d, f, etc). As funções  $\Psi_i$  possuem um comportamento radial oscilante, dificultando a resolução de integrais de energia por métodos numéricos. A utilização de bases gaussianas possibilita que as integrais sejam calculadas analiticamente, contornando este problema e tornando o modelo ideal para ser resolvido computacionalmente<sup>2</sup>.

O produto de duas funções gaussianas  $G(\alpha_i, r_a)$  e  $G(\alpha_j, r_b)$  centradas respectivamente nas coordenadas  $A=(A_x, A_y, A_z)$  e  $B=(B_x, B_y, B_z)$ , será uma função gaussiana  $G(\alpha_k, r_c)$  centrada em  $C=(C_x, C_y, C_z)$ <sup>4</sup>. Desta forma, a função gaussiana possibilita que os produtos de integrais multidimensionais sejam fatorados e reescritos em termos de centros alternativos.

As aproximações de Hartree-Fock e LCAO tomadas em conjunto e aplicadas às equações eletrônicas de Schrödinger, conduzem às equações de Roothaan-Hall<sup>3</sup>.

## 6.6 - Equações de Roothaan-Hall

Substituindo a Equação 6.8 na Equação 6.10, obtemos<sup>4</sup>:

$$\hat{F} \sum_k c_{ik} \chi_k = \varepsilon_i \sum_k c_{ik} \chi_k \quad (6.12)$$

A solução da Equação 6.12 é obtida pela metodologia de ajuste variacional, obtendo-se os coeficientes de combinação linear em função da minimização da energia eletrônica total do sistema, e é dada por:

$$FC_i = ESC_i \quad (6.13)$$

sendo  $C$  a matriz dos coeficientes dos orbitais moleculares da aproximação LCAO,  $S$  é a matriz de sobreposição (uma medida de quanto as funções de base “sentem” umas as outras),  $E$  é a matriz de energias moleculares e  $F$  a matriz de Fock (análoga ao Hamiltoniano na equação de Schrödinger). A Equação 6.13 apresenta características que permitem a aplicação de técnicas numéricas eficientes para determinação dos coeficientes de combinação linear e as energias dos orbitais moleculares. Esta representação matricial é denominada de equação secular.

Os elementos de  $F$  são dados por<sup>3</sup>:

$$F_{\mu\nu} = H_{\mu\nu}^{\text{núcleo}} + J_{\mu\nu} - K_{\mu\nu} \quad (6.14)$$

$H^{\text{núcleo}}$  é o chamado hamiltoniano do núcleo, cujos elementos são dados por:

$$H_{\mu\nu}^{\text{núcleo}} = \int \phi_{\mu}(r) \left[ -\frac{1}{2} \nabla^2 - \sum_A \frac{Z_A}{r} \right] \phi_{\nu}(r) dr \quad (6.15)$$

Elementos coulombianos e de troca,  $J_{k\nu}$  e  $K_{k\nu}$ , são dados por:

$$J_{k\nu} = \sum_{\lambda} \sum_{\sigma}^{\text{funçõesdebase}} P_{\lambda\sigma}(\mu\nu | \lambda\sigma) \quad (6.16)$$

$$K_{k\nu} = \frac{1}{2} \sum_{\lambda} \sum_{\sigma}^{\text{funçõesdebase}} P_{\lambda\sigma}(\mu\lambda | \nu\sigma) \quad (6.17)$$

$P$  é a chamada matriz densidade, cujos elementos envolvem a soma, sobre todos os orbitais moleculares ocupados, do produto de dois coeficientes dos orbitais moleculares.

Neste caso,  $P$  é dado por:

$$P_{\lambda\sigma} = 2 \sum_i^{\text{Orbitaismoleculares ocupados}} c_{\lambda i} c_{\sigma i} \quad (6.18)$$

Em geral,  $P$  será a menor energia  $1/2 N$ , onde  $N$  é o número total de elétrons. A soma, em todos os orbitais, dos produtos de um elemento da matriz densidade e o seu orbital

atômico associado leva a densidade eletrônica.  $(\mu\nu|\lambda\sigma)$  são integrais de dois elétrons, dadas pela Equação 6.19. O número dessas integrais aumenta com o número de funções base.

$$(\mu\nu|\lambda\sigma) = \iint \chi_\mu(r_1)\chi_\nu(r_1) \left[ \frac{1}{r_{12}} \right] \chi_\lambda(r_2)\chi_\sigma(r_2) dr_1 dr_2 \quad (6.19)$$

Os métodos resultantes das soluções das equações de Roothaan-Hall são chamados de modelos Hartree-Fock-Roothaan, que consistem na aplicação da combinação linear de orbitais atômicos usando o modelo de Hartree-Fock. A energia correspondente a um sistema infinito (completo) de bases é chamada de energia de Hartree-Fock. O de modelo Hartree-Fock permite que as funções de onda e a energia, como também a sua primeira e segunda derivada, sejam calculadas através de uma metodologia puramente analítica. Isso desempenha um papel importante em rotinas computacionais para otimização da geometria (que requer primeiras derivadas) e determinação de frequências vibracionais (que requer segundas derivadas).

Embora o modelo Hartree-Fock permita o cálculo das funções de onda e energia analiticamente, este método apresenta algumas limitações importantes. Tais limitações são apresentadas a seguir.

### 6.7 - Limitações do modelo de Hartree-Fock

O modelo de Hartree-Fock proporciona resultados com boa concordância com dados experimentais para determinadas propriedades moleculares, como a geometria molecular, energia de ionização e outras. Entretanto, o modelo não garante uma descrição adequada de propriedades mais sensíveis a qualidade da função de onda, como propriedades que envolvam diferenças de energia. Isso se deve ao fato de que o modelo de Hartree-Fock não considera a correlação eletrônica<sup>4</sup>. Os movimentos dos elétrons em um átomo não são independentes. Desta forma o modelo permite a perda da energia proveniente da interação que seria causada pela posição dos elétrons no espaço.

Os efeitos dessa correlação eletrônica se manifesta em diversas propriedades atômicas, como na polarizabilidade e momento dipolar. Métodos que levam em consideração a correlação eletrônica possuem um formalismo matemático complexo, impedindo uma interpretação física simples. Uma interpretação mais próximo do químico sobre a correlação eletrônica envolve os orbitais de fronteira

HOMO-LUMO. O orbital molecular HOMO é definido com o orbital de mais alta energia que contém elétrons. O orbital molecular LUMO é o orbital de mais baixa energia que não contém elétrons.

Neste modelo, os orbitais LUMO e suas energias, obtidas através da Equação 6.13, não são caracterizados corretamente. O operador de Fock leva em consideração a interação de cada um dos elétrons nos orbitais ocupados com o campo médio gerado pelos outros elétrons. Desta forma, os orbitais LUMO são obtidos através da experimentação da interação de um elétron no orbital desocupado com todos os orbitais ocupados. Em consequência os orbitais LUMO apresentam características mais próximas de um íon negativo no estado excitado do que de um sistema neutro.

Apesar das limitações citadas, o modelo de Hartree-Fock oferece uma aproximação consideravelmente boa, que permite a compreensão do comportamento de elétrons e núcleos em átomos e sistemas moleculares, bem com a formação de ligações químicas.

## 6.8 - Métodos semi-empíricos

Os métodos semi-empíricos seguem diretamente o modelo de Hartree-Fock<sup>3</sup>. Neste método, novas aproximações são incorporadas ao modelo Hartree-Fock com o objetivo de reduzir o elevado número de integrais de repulsão elétron-elétron. O tratamento é feito apenas nos elétrons de valência, elétrons associados ao núcleo são ignorados<sup>3</sup>. A validade desta aproximação está relacionada ao fato de que os elétrons envolvidos em uma ligação química ou em propriedades moleculares de interesse estão localizados na camada de valência.

A principal aproximação, com o objetivo de reduzir o tempo de processamento computacional, é considerar que os orbitais moleculares residentes em diferentes centros atômicos não se sobrepõem.

$$\int \chi_k \chi_v d\tau = 0 \quad (6.20)$$

com  $\chi_k$  e  $\chi_v$  em diferentes átomos.

Essa é a chamada aproximação NDDO (Neglect of Diatomic Differential Overlap). Esta aproximação reduz o número de interações entre elétrons nas equações de Hoothaan-Hall de  $N^4$  para  $N^2$ , onde  $N$  é o número total de funções de base. Os



métodos semi-empíricos NDDO aplicam um conjunto de bases sp, não tratando orbitais d em suas implementações. Desta forma, esses métodos não podem ser aplicados na maioria dos metais de transição.

Outras aproximações são introduzidas a fim de promover uma simplificação nos cálculos de uma forma mais geral e para permitir a introdução de parâmetros semi-empíricos. Os métodos semi-empíricos utilizam algumas constantes determinadas experimentalmente, como a massa atômica do isótopo mais abundante e o calor de atomização de cada átomo envolvido. A parametrização é feita de maneira que reproduza uma série de valores experimentais, como geometria de equilíbrio, calor de formação, momento de dipolo e potencial de ionização.

Para facilitar a interpretação dos resultados obtidos através da mecânica molecular (MM), foram desenvolvidos modelos que permitem a apresentação dos resultados graficamente.

## 6.9 - Modelos gráficos

Através da MM podemos obter informação de uma molécula com relação aos orbitais moleculares, densidade eletrônica, densidade de spin (para radicais ou moléculas com elétrons emparelhados), potencial eletrostático, potencial de ionização e outros<sup>3</sup>. Estas informações podem ser apresentadas graficamente, através de modelos relacionados à carga e dimensões moleculares e a distribuição de cargas na molécula.

As informações são apresentadas como funções tridimensionais das coordenadas em termos de uma superfície de valor constante, ou seja, em uma isosuperfície:

$$f(x,y,z) = \text{constante}$$

O valor da constante pode ser escolhido de forma a refletir um observável físico de interesse. Como exemplo, ao escolher como constante uma determinada densidade de elétrons, a isosuperfície representaria a forma da molécula. Uma isosuperfície pode mostrar apenas uma grandeza física. Grandezas adicionais podem ser apresentadas na forma de mapas de cores na isosuperfície, onde diferentes cores estão relacionadas a diferentes valores.

A seguir serão apresentadas as funções responsáveis pela geração de gráficos associados a cada um dos principais observáveis físicos.

O orbital molecular HOMO mostra quais regiões da molécula são mais ricas em elétrons e, conseqüentemente, mais sujeitas a ataque eletrofílico.

Os orbitais moleculares são dados pela seguinte função:

$$\phi_i = \sum_{\mu}^{funções.de.base} c_{\mu i} \chi_{\mu} \quad (6.21)$$

Os orbitais moleculares  $\sigma$  e  $\pi$  são comumente associados às ligações  $\sigma$  e  $\pi$ , respectivamente. Porém, isto não corresponde à realidade. A razão é que os orbitais moleculares são escritos como combinações lineares de funções de base centradas nos núcleos e serão, em geral, completamente delocalizadas do esqueleto nuclear.

A densidade eletrônica  $\rho(r)$  é uma função da coordenada  $r$  definida de forma que  $\rho(r)dr$  é o número de elétrons contidos no volume  $dr$ . Isso é o que é medido em experimentos de difração de raios-x. Para uma molécula,  $\rho(r)$  é escrito em termos da soma dos produtos das funções de base  $\chi$ .

$$\rho(r) = \sum_{\mu}^{funções.de.base} \sum_{\nu} P_{\mu\nu} \chi_{\mu}(r) \chi_{\nu}(r) \quad (6.22)$$

onde  $P$  é a matriz densidade (Equação 6.18)

A densidade eletrônica pode ser exibida através de uma isosuperfície (uma superfície isodensidade) com o tamanho e forma dada de acordo com um valor escolhido da densidade.

O potencial eletrostático  $\varepsilon_p$  é definido como a energia de interação de um ponto  $p$  de carga positiva com os núcleos e elétrons da molécula.

$$\varepsilon_p = \sum_A^{nucleo} \frac{Z_A}{R_{Ap}} - \sum_k \sum_{\nu}^{funções.de.base} P_{k\nu} \int \frac{\chi_k^*(r) \chi_{\nu}(r)}{r_p} dr \quad (6.23)$$

O primeiro somatório na equação é sobre o núcleo  $A$ .  $Z$  é o número atômico e  $R_{Ap}$  é a distância entre o núcleo e o ponto da carga. O segundo somatório é sobre as funções de base,  $\chi$ .  $P$  é a matriz densidade (Equação 6.18) e a integral reflete a interação coulombiana entre os elétrons e o ponto de carga, onde  $r_p$  é a distância entre o elétron e o ponto de carga.

Potenciais eletrostáticos negativos (superfície de potencial negativa) mostram as regiões ricas em elétrons (sujeitas a ataques eletrofílicos). Delimita a localização dos elétrons de maior energia. Potenciais eletrostáticos positivos (superfície de potencial positiva) mostram regiões deficientes em elétrons (sujeitas a ataques nucleofílicos).

O potencial eletrostático é mostrado como um mapa de cores na isosuperfície de densidade de elétrons. O potencial de ionização local  $I(r)$  é definido como a soma sobre a densidade de elétrons do orbital,  $\rho_i(r)$ , multiplicada pela energia absoluta do orbital,  $|E_i|$ , dividido pela densidade total de elétrons,  $\rho(r)$ :

$$I(r) = \frac{\sum_i^{\text{orbitais moleculares ocupados}} \rho_i(r) |E_i|}{\rho(r)}$$

O potencial de ionização representa a facilidade de remoção de elétrons em um local ao redor da molécula. Uma superfície com baixo potencial de ionização apresenta uma área mais facilmente ionizável. O potencial de ionização é uma alternativa ao potencial eletrostático como um indicador de reatividade eletrofílica da molécula.

### 6.10 – Considerações finais

A modelagem molecular permite a criação de modelos virtuais de estruturas moleculares através da resolução aproximada da equação de Schrödinger para diversas partículas. Esta ferramenta é de grande importância para pesquisas em ciência dos materiais, por auxiliar na compreensão das propriedades físico-químicas dos materiais, além de possibilitar a previsão de suas propriedades.

Os mapas de potencial de ionização permitem investigar a interação química entre diferentes moléculas, indicando os sítios mais prováveis de ligação. A modelagem dos orbitais moleculares auxilia na interpretação de propriedades elétricas dos materiais, revelando os possíveis mecanismos promotores do transporte elétrico. Estes mecanismos serão abordados no próximo capítulo.

### 6.11 – Referencias bibliográficas

1. Casanovas, J.; Alemán, C.; Liesa, F. La modelización Molecular como Herramienta para el Diseño de Nuevos Polímeros Conductores. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 15 (4), 239-244, 2005.

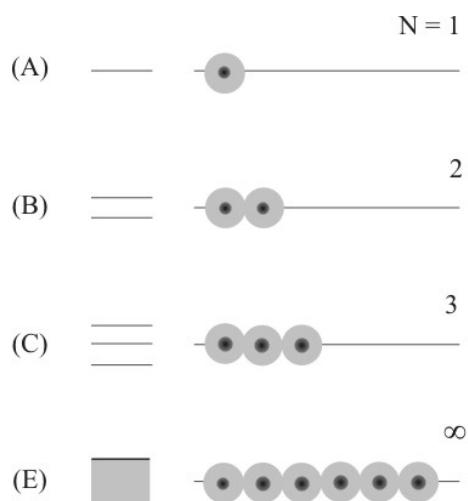
2. Freitas, L. C. G. Prêmio Nobel de Química em 1998: Walter Kohn e John A. Pople. *Química Nova*. 22 (2), 293-298, 1999.
3. Hehre, W. J. *A Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations*. Wavefunction, Inc, 2003.
4. de Andrade, J. C.; Custódio, R. *Tópicos de Química Quântica*. Disponível em: <[http://www.chemkeys.com/bra/md/tdqq\\_4/tdqq\\_4.htm](http://www.chemkeys.com/bra/md/tdqq_4/tdqq_4.htm)>. Acesso em: 04 maio 2006.
5. Vianna, J. D. M.; Fazzio, A.; Canuto, S. *Teoria Quântica de Moléculas e Sólidos: Simulação computacional*. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2004.
6. Leach, A. R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. 2. ed. Pearson Education, 2001.

## CAPÍTULO 7 - CONDUÇÃO ELÉTRICA EM POLÍMEROS

---

### 7.1 - Orbitais Moleculares

A formação dos orbitais moleculares em materiais poliméricos ocorre da mesma forma que a formação de bandas de energia em materiais cristalinos. Esse processo pode ser descrito através de um simples modelo de sólido, em uma dimensão, que consiste em uma linha infinita de átomos. A partir de um átomo (Figura 7.1 - A), a medida que aumentamos a quantidade de átomos no sistema, os níveis de energias se sobrepõem em um número cada vez maior de orbitais (Figura 7.1 - C). Para uma cadeia de poucos átomos, o número de energias possíveis no sistema é finito, mas para grandes números de átomos, que pode ser considerado infinito, como em um sólido macroscópico, o número de energias possíveis é infinito, dando origem aos orbitais moleculares (MO) (Figura 7.1 - D).<sup>1</sup>

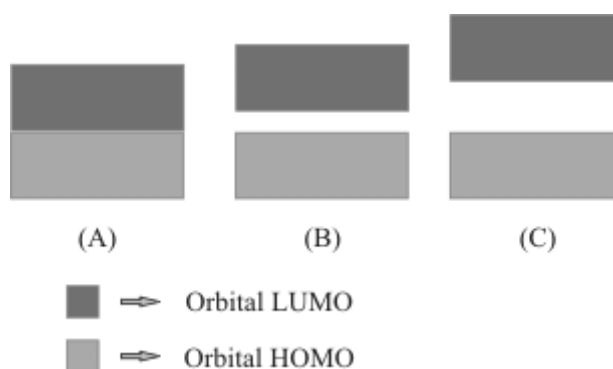


**Figura 7.1:** Desenho representativo da formação dos orbitais moleculares.

O orbital HOMO é definido como o orbital molecular de mais alta energia que contém elétrons. O orbital HOMO age como um doador de elétrons, já que este é o orbital mais externo que contém elétrons. O orbital LUMO é o orbital molecular de mais baixa energia que não contém elétrons, e age como um receptor de elétrons.

Através de uma analogia à teoria das bandas em materiais cristalinos, é possível compreender a condução elétrica em materiais poliméricos. Os elétrons excitados para o orbital LUMO são considerados “livres” e, assim como os buracos deixados no orbital HOMO, participam do processo de condução elétrica. A diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO é chamada de banda proibida.

A condutividade do material está relacionada à largura da banda proibida. Se a largura da banda proibida for nula, como é típico de materiais condutores, uma quantidade de energia muito pequena poderá promover elétrons para estados não ocupado no orbital LUMO (Figura 7.2 - A). Desta forma, sob uma pequena diferença de potencial, estes elétrons, que possuem grande mobilidade, podem produzir uma corrente elétrica. Se a largura da banda proibida for diferente de zero, mas ainda pequena, uma quantidade de energia um pouco maior será necessária para promover elétrons para o orbital LUMO. O material então se comportará como um semicondutor (Figura 7.2 - B). Se a largura da banda proibida for grande, será necessária uma grande quantidade de energia, o material então se comportará como um isolante elétrico (Figura 7.2 - C).<sup>1,2</sup>



**Figura 7.2:** Esquema da estrutura dos MO's de materiais condutores (A), semicondutores (B) e isolantes (C).

Independentemente do material se comportar como um condutor ou semicondutor, a energia para excitação de elétrons para estados energéticos no orbital LUMO pode ser de origem térmica e, à temperatura ambiente, o material poderá possuir grande condutividade elétrica. Neste caso, a população nos orbitais moleculares é dada pela distribuição de Fermi-Dirac:

$$P = \frac{1}{e^{(E-\mu)/kT} + 1} \quad (7.1)$$

sendo  $\mu$  é o potencial químico do sistema.

## 7.2 - Transporte eletrônico em sistemas desordenados

Um conceito fundamental para o entendimento do mecanismo de transporte de cargas em sistemas desordenado é o de estados localizado. Um estado localizado é descrito por uma função de onda bem localizada na rede. Os elétrons estão bem presos numa determinada região do material e não se acoplam com outros estados eletrônicos. Para materiais caracterizados pela presença de estados localizados, a condução eletrônica se dá através da locomoção dos elétrons por estes estados. A locomoção dos elétrons é realizada através de processos de tunelamento, ou saltos. Ou seja, os elétrons saltam através dos estados localizados quando recebem energia de fônons ou de campos elétricos externos.<sup>3</sup>

Os elétrons que participam da condução por saltos sempre tentarão percorrer a menor distância de salto e a menor energia de ativação. Porém, essas duas condições não podem ser satisfeitas simultaneamente.<sup>4</sup> Contudo, existe uma distância ótima de salto  $r$ , onde a probabilidade de salto é máxima. Esta probabilidade é dada por:

$$P \sim \exp\left(-\frac{2r}{a} - \frac{\Delta E}{kT}\right) \quad (7.2)$$

sendo  $k$  é a constante de Boltzmann,  $T$  a temperatura e  $\Delta E$  a energia de ativação envolvida no processo de salto e  $a$  é raio de localização dos estados.

Existem três tipos de mecanismos termicamente ativados pelos quais os elétrons saltam através de estados eletrônicos localizados. Estes mecanismos são mostrados na figura 1.<sup>3-6</sup> O primeiro mecanismo é o mecanismo de ativação térmica, onde os elétrons situados nos estados localizados saltam para uma região de estados estendidos no orbital LUMO, podendo então participar do processo de condução (Figura 7.3 - A). Este mecanismo é governado pela equação de Arrhenius:

$$\sigma = \sigma_0 \exp\left(\frac{-\Delta E}{kT}\right) \quad (7.3)$$

sendo  $\sigma_0$  é uma constante pré-exponencial. Este mecanismo é típico de materiais semicondutores com estrutura de bandas bem definida e pode ser chamado de modelo de Arrhenius.

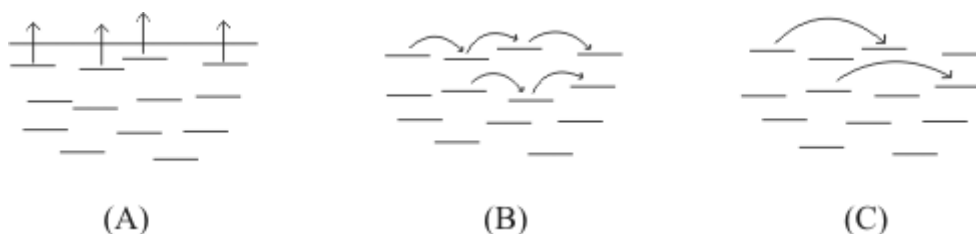
O segundo é o Mecanismo de ativação térmica entre estados espacialmente mais próximos, onde os elétrons saltam por estados entre os quais existe a superposição das funções de onda (Figura 7.3 - B). Este mecanismo pode ser descrito pela seguinte relação:

$$\sigma = \sigma_0 \exp\left(\frac{T_0}{T}\right)^\alpha \quad (7.4)$$

sendo  $T_0$  e  $\alpha$  são constantes. Para este mecanismo de condução,  $\alpha$  vale  $\alpha = 0,5$ . Este mecanismo de condução em sistemas desordenado foi proposto por A. L. Efros e B. I. Shklovskii e é comumente referido na literatura como mecanismo de Efros.

O terceiro mecanismo possível é o de saltos entre estados vizinhos não necessariamente mais próximos, mas entre estados com energia característica mais próxima (Figura 7.3 - C). Este mecanismo pode ser descrito também pela Equação 7.2, porém, caracteriza-se por  $\alpha = 0,25$ . Este mecanismo foi proposto por N. F. Mott e E. A. Davis e é comumente referido na literatura como mecanismo de Mott. Este mecanismo é também chamado de mecanismo de saltos de alcance variado, já que os saltos não ocorrem necessariamente entre os primeiros vizinhos.

Esta discussão foi desenvolvida considerando-se os elétrons como portadores de carga, porém, o mesmo raciocínio pode ser aplicado em sistemas cujos buracos são os portadores de carga.



**Figura 7.3:** Mecanismos de condução possíveis em materiais desordenados.



### 7.3 – Determinação da condutividade elétrica

A condutividade elétrica de um material pode ser determinada através da análise de uma curva da corrente em função da tensão, da forma que se segue.

A resistência elétrica entre dois pontos de um material isotrópico pode ser obtida aplicando-se uma diferença de potencial, ou tensão,  $V$ , entre esses dois pontos e medindo-se a corrente elétrica,  $i$ , que flui no material. A resistência elétrica do material é dada pela lei de Ohm:

$$V = Ri \quad (7.5)$$

A lei de Ohm indica que a corrente elétrica em um material varia linearmente com a tensão aplicada. A constante de proporcionalidade entre essas duas grandezas é a resistência elétrica  $R$ . Os materiais que obedecem a lei de Ohm são chamados materiais ôhmicos.

Rearranjando a lei de Ohm (Equação 7.5), podemos escrever:

$$i = \frac{V}{R} \quad (7.6)$$

Esta equação pode ser comparada com a equação de uma reta. Desta forma, através da curva  $i$  versus  $V$  característica de um material (Figura 7.4), é possível obter a resistência elétrica pelo inverso do coeficiente angular da curva.

A resistividade,  $\rho$ , é uma característica intrínseca do material, ou seja, independe de suas dimensões, e é definida por:

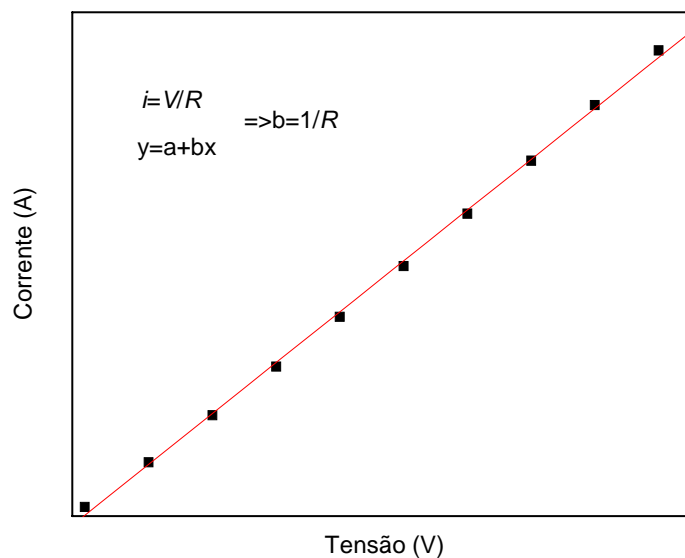
$$\rho = \frac{VA}{\phi} \quad (7.7)$$

onde  $A$  é a área superficial da amostra e  $\phi$  a sua espessura.

A condutividade elétrica,  $\sigma$ , é definida como o inverso da resistividade:

$$\sigma = \frac{1}{\rho} \quad (7.8)$$

Desta forma, é possível obter a condutividade elétrica de uma material a partir de uma curva  $i$  versus  $V$ .



**Figura 7.4:** Curva  $i$  versus  $V$  típica de um material ôhmico.

#### 7.4 – Considerações finais

Neste capítulo foram apresentados os modelos pelos quais o mecanismo de condução elétrica de um material com estrutura desordenada pode ser interpretado. Os modelos dos orbitais moleculares e de saltos termicamente ativados fornecem abordagens diferentes da condução elétrica, porém, complementares.

Em um biossensor, o mediador de elétrons desempenha um papel importante na condutividade do polímero que constitui a matriz hospedeira. O mediador de elétrons pode promover a criação de estados energéticos acessíveis dentro da banda de energia proibida do polímero. Isto pode provocar a diminuição da largura da banda proibida, tornando mais fácil a excitação de elétrons para o orbital LUMO, aumentando a condutividade do material. Por outro lado, a criação desses estados pode facilitar a promoção de elétrons de estados localizados para estados estendidos, criando portadores de carga nos estados localizados que podem participar da condução elétrica, aumento assim; a condutividade elétrica do material.

## 7.5 – Referencias Bibliográficas

1. Disponível em: <<http://www.biophys.leidenuniv.nl/aartsma/hand-outs-B/aa-chap4x.ppt>> Acessado em outubro 2004.
2. Callister, W. D. Jr. *Ciência e Engenharia de Materiais*: Uma Introdução. Rio de Janeiro, *LTC*. 5, 328-329, 2002.
3. Chiquito, A. J.; Lanciotti Jr., F. Super-redes semicondutoras: Um laboratório de Mecânica Quântica. *Revista Brasileira de Física*. 26 (4), 315-322, 2004.
4. Yu, D.; Wand, C.; Wehrenberg, B. L.; Guyot-Sionnest, P. Variable range hopping conduction in semiconductor nanocrystal solids. *Physical Review Letters*. 92 (21), 2004
5. Shklovskii, B. I.; Efros, A. L. *Electronic Properties of Doped Semiconductors*. New York: Springer-Verlag. 1984.
6. Mott, N. F.; Davis, E. A. *Electronic Processes in Non-Crystalline Materials*. London: Clarendon Press – Oxford. 1971.

## CAPÍTULO 8 - OBJETIVOS

---

Dispositivos para o controle e a automação de processos analíticos no laboratório clínico ou na monitoração de cirurgias de grande porte são considerados atualmente uma área estratégica da biotecnologia. Neste sentido, o desenvolvimento de novos materiais para a utilização no desenvolvimento de biossensores tem recebido importantes investimentos dos órgãos governamentais bem como de empresas químico-farmacêuticas dos países desenvolvidos.

O uso potencial de biossensores para aplicações biotecnológicas é reconhecido desde a década de 70 com o surgimento de dispositivos semicondutores acoplados a enzimas para análise de penicilina e constituintes do fluido biológico, sendo vários dispositivos patenteados, ao longo de mais de três décadas de pesquisa e desenvolvimento.

Ressalta-se que o campo de aplicação dos biossensores estende-se desde a área clínica até o controle e automação de processos biotecnológicos que envolvam a produção de fármacos e medicamentos. Um elemento importante quanto ao projeto de um biossensor é a matriz orgânica/inorgânica utilizada na imobilização da enzima, molécula esta responsável seletivamente pela reação química envolvida na análise do metabólito a ser quantificado quanto às suas características clínicas e biotecnológicas.

O principal objetivo deste trabalho é efetuar a obtenção de biossensores amperométricos para monitoração de colesterol baseados no complexo de boro PVA/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, contendo ftalocianina de cobre como mediadora de elétrons. Estes biossensores serão obtidos via transição de fase sol-gel.

Os principais objetivos específicos deste trabalho são:

- Obtenção de um biossensor amperométrico para determinação de colesterol total no sangue;
- Caracterização físico-química do dispositivo, biossensor;
- Análise da performance do biossensor, por ensaios *in vitro*.

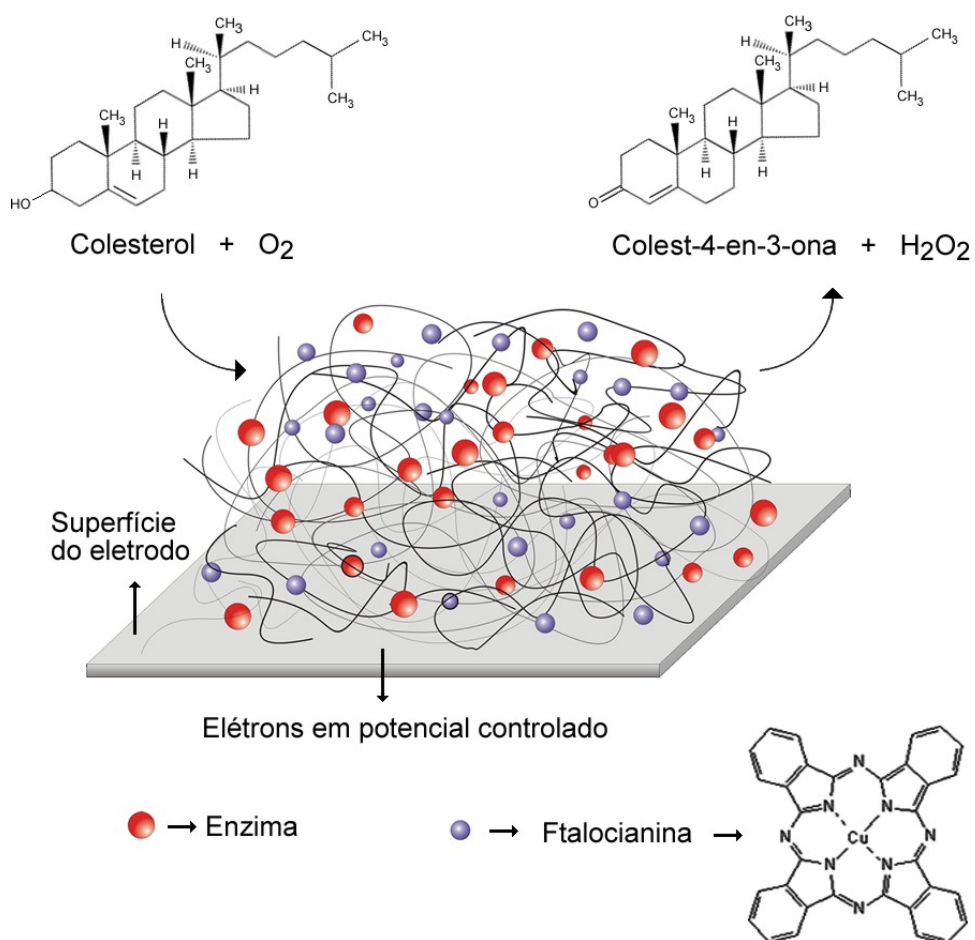
### 9.1 - Preparo do biossensor

Os biossensores para colesterol foram obtidos através da transição sol-gel do sistema PVA/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> contendo ftalocianina de cobre (Ftc). A Ftc desempenhará o papel de mediador de elétrons no biossensor.

A síntese do biossensor foi realizada através de um processo multietapas. Inicialmente, foi preparada uma solução de PVA (72,0 kDa, Merck-Schuchardt) com concentração de 0,1g/mL em água destilada. Uma solução com concentração de 50 mg/mL de ftalocianina de cobre (Sigma-Aldrich) em clorofórmio foi preparada simultaneamente. As duas soluções foram misturadas e em seguida, após sonificação, foi aquecida sob agitação constante para evaporação do clorofórmio e dispersão da ftalocianina na solução de PVA. Em seguida, à temperatura ambiente (25°C) foi acrescentada à solução de PVA/Ftc 100 µl de solução enzimática composta por colesterol oxidase e colesterol esterase (Laborlab). Após homogeneização, foi depositado 10 µl desta solução na extremidade de um eletrodo de alumínio de 0,3 mm x 2,5 cm.

Após a evaporação do solvente à temperatura e atmosfera ambiente (90,66 kPa, 25 °C), a transição sol-gel do sistema foi promovida através da imersão do sensor em solução de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Merck) 0,64 M à temperatura ambiente. Após a reação de reticulação os sensores foram secos à temperatura ambiente (25 °C).

A Figura 9.1 ilustra a obtenção do biossensor de colesterol. A Figura 9.2 apresenta uma fotografia de um dos biossensores obtidos.



**Figura 9.1:** Ilustração esquemática do projeto do biossensor para colesterol.



**Figura 9.2:** Fotografia do biossensor de colesterol obtido neste trabalho.

## 9.2 - Caracterização físico-química do biossensor

### 9.2.1 - Estudo do transporte de água em membranas de PVA

O estudo do transporte de água em membranas de PVA foi realizado através do método gravimétrico. Os ensaios foram realizados em membranas de PVA de espessura entre 220  $\mu\text{m}$  e 300  $\mu\text{m}$  com tempos de reticulação entre 10 min e 60 min a temperatura de 20 °C e em membranas, reticuladas por 25 min, a temperaturas entre 20 °C e 50 °C. As membranas foram imersas em uma solução de NaCl 0,9%, para simular as condições fisiológicas, até atingir o equilíbrio de intumescimento. Durante o processo de intumescimento, foi acompanhado o aumento de massa das membranas devido à sorção de água. O intumescimento,  $I$ , das membranas foi calculado através da seguinte expressão:

$$I = \frac{M_t - M_0}{M_0} \quad (9.1)$$

sendo  $M_t$  a massa da membrana no tempo  $t$  e  $M_0$  a massa inicial da membrana.

### 9.2.2 – Propriedades mecânicas e térmicas dos hidrogéis

Diversas aplicações têm sido propostas para polímeros hidrogéis, tais como sistemas de liberação controlada de fármacos, músculos artificiais e lentes de contatos. Os hidrogéis possuem ainda, potencial para aplicações como materiais estruturais. No entanto, suas aplicações são limitadas devido a suas más propriedades mecânicas. Várias propostas têm sido apresentadas para a melhoria das propriedades mecânicas dos hidrogéis, entre elas a sínteses de compósito orgânicos/inorgânicos<sup>1</sup>, redes poliméricas interpenetrantes<sup>2</sup> e através do uso de agentes reticuladores<sup>3</sup>. Esta última proposta é de especial interesse, por permitir o controle das propriedades mecânicas de um hidrogel de forma simples, bastando variar a quantidade do agente reticulador na síntese do material, e por possibilitar a preservação das características intrínsecas do polímero.

No estado intumescido, um hidrogel apresenta rápida resposta a tensões externas através do rearranjo dos segmentos poliméricos.<sup>4</sup> Este comportamento, típicos de borrachas, permite a utilização da teoria da elasticidade da borracha para relacionar o módulo de Young,  $\gamma$ , de um hidrogel com a taxa de extensão,  $\lambda$ , quando submetido a



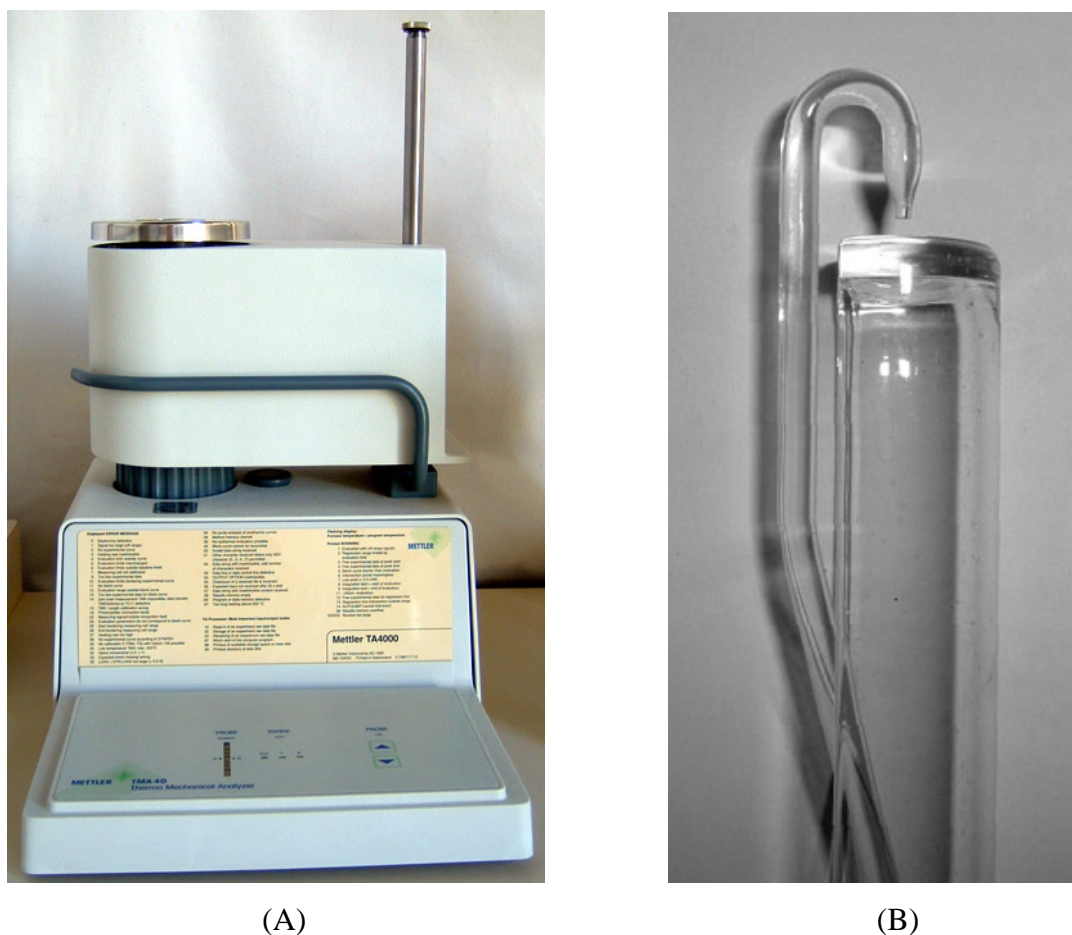
uma e tensão,  $\tau$ , aplicada durante um ensaio mecânico, e parâmetros estruturais como sua densidade de reticulações,  $\nu_e$  (Equação 9.2). Esta relação é dada pela seguinte equação:<sup>4-6</sup>

$$\gamma = \frac{3\tau}{\lambda - \lambda^{-2}} = 3RT\nu_e\phi^{1/3} \quad (9.2)$$

sendo  $R$  a constante dos gases,  $T$  a temperatura e  $\phi$  a fração de polímero no hidrogel.

Através da Equação 9.2, percebemos que o módulo de Young cresce proporcionalmente à densidade de reticulações e inversamente proporcional à taxa de extensão do hidrogel quando submetido a uma tensão.

As propriedades mecânicas de membranas de PVA não reticulada e com diferentes densidades de reticulações, não intumescidas e em seu máximo de intumescimento, foram determinadas em um equipamento Metler TMA 40 (Figura 9.3 - A) em modo de penetração. Foi utilizada uma ponta de prova de quartzo cuja área de secção transversal é de  $1,428 \times 10^{-7} \text{ m}^2$  (Figura 9.3 - B). O intumescimento das membranas foi efetuado através da imersão em solução fisiológica a temperatura de 20 °C, por tempo suficiente para intumescimento até o equilíbrio. As membranas de hidrogéis em seu máximo de intumescimento, com espessura entre 0,04 mm e 0,60 mm, foram então submetidas a forças de 0,1, 0,2 e 0,5 N à temperatura ambiente.



**Figura 9.3:** Equipamento (A) e ponta de prova (B) utilizada nos ensaios de TMA.

A estabilidade térmica da matriz utilizada na construção de um biossensor desempenha um papel fundamental para o desempenho do dispositivo. A temperatura de transição vítrea da matriz deve estar a uma temperatura maior que a temperatura de trabalho do biossensor, a fim de manter a sua estabilidade térmica e o ambiente ideal para a enzima. O percentual de cristalinidade da matriz deve ser o menor possível, já que as regiões cristalinas oferecem resistência a difusão do analito para o interior da matriz do biossensor.

Nesta seção, onde discutiremos a determinação das propriedades térmicas do biossensor, as nomenclaturas e abreviaturas seguem o padrão sugerido por Ionashiro e Giolito.<sup>7,8</sup> A calorimetria exploratória diferencial (do inglês Differential Scanning Calorimetry - DSC) é uma técnica na qual se acompanha a variação de entalpia que ocorre entre a amostra e uma referência durante um processo de

aquecimento ou resfriamento por um programa controlado, o que nos permite observar os principais eventos térmicos ocorridos na amostra.<sup>7-11</sup>

A técnica DSC pode ser separada em duas modalidades: 1) DSC com compensação de potência: Nesta modalidade a amostra e a referência são mantidas na mesma temperatura através de aquecedores elétricos individuais. A potência dissipada pelos aquecedores é relacionada com a energia envolvidas nos processos endotérmicos ou exotérmicos. 2) DSC com Fluxo de calor: No arranjo experimental mais simples desta modalidade, a amostra e a referência, contidas em seus respectivos suportes, são colocados em um disco de metal, através do qual ocorre a troca de calor entre as amostras e o forno. Para uma condição de fluxo de calor no estado estacionário, a diferença de temperatura,  $\Delta T$ , entre a amostra e a referência é proporcional ao fluxo de calor,  $\Delta\phi$ , entre a amostra,  $\phi_A$ , e a referência,  $\phi_R$ , dada pela expressão:

$$\Delta\phi = \phi_A - \phi_R = -k\Delta T \quad (9.3)$$

Para um processo endotérmico,  $\Delta T < 0$  e  $\Delta\phi > 0$ , enquanto para um processo exotérmico vale o recíproco. A constante  $k$  deve ser determinada por calibração, usando-se padrões com uma constante física conhecida, por exemplo a entalpia de fusão.

Caso não ocorra nenhum fenômeno físico-químico com a amostra durante a variação de temperatura, a curva DSC será uma reta horizontal. Quando ocorre um processo endotérmico, surge um pico positivo, enquanto no processo exotérmico, surge um pico negativo. Isto torna necessário indicar o sentido dos processos na curva. A forma dos picos dependem de parâmetros da amostra e do equipamento, como a capacidade calorífica. A área dos picos em uma curva DSC relaciona-se com as energias dos processos, desta forma o DSC permite a determinação quantitativa de um evento físico-químico. Dentre as várias teorias apresentadas que relacionam as áreas dos picos com as energias envolvidas nos processos físico-químicos, a Equação 9.4 é uma das mais simples:<sup>9</sup>

$$\frac{m\Delta H}{gk} = \int_{T_1}^{T_2} \Delta T dT \quad (9.4)$$

sendo  $\Delta H$  é a variação de entalpia,  $m$  é a massa da amostra,  $\Delta T$  é a variação de temperatura entre o início ( $T_1$ ) e final ( $T_2$ ) do processo,  $g$  e  $k$  são constantes referentes à amostra, ao porta amostras e ao equipamento utilizado.

O percentual de cristalinidade,  $\chi_c$ , de uma amostra pode ser obtido comparando-se o seu valor de entalpia de fusão,  $\Delta H_m$ , com o valor da entalpia de fusão do polímero 100% cristalino,  $\Delta H_m^c$ , como na relação:<sup>12</sup>

$$\chi_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^c} \quad (9.5)$$

A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) caracteriza-se pelo aumento repentino do calor específico do material, requerendo maior energia, com relação à referência, para manter a temperatura. A  $T_g$  é vista na curva DSC como uma mudança de linha base (endotérmica), sem pico. Na fusão cristalina, a fase cristalina da amostra se funde a uma temperatura constante. Durante a fusão, é necessária uma maior quantidade de calor para manter a mostra a mesma temperatura que a referência. A  $T_m$  então se caracteriza por um pico de fusão endotérmico.<sup>11</sup> Tabela 9.1 apresenta alguns exemplos de fenômenos físico-químicos que podem ocorrer em uma análise DSC e suas relações com a variação de entalpia.<sup>10</sup>

**Tabela 9.1:** Fenômenos físico-químicos determinados através de análise DSC e suas relações com a variação da entalpia.<sup>9</sup>

Variação de entalpia	
Fenômenos endotérmicos	Fenômenos exotérmicos
Fusão, vaporização e sublimação	Cristalização
Dessorção e absorção	Combustão
Desidratação	Adsorção
Decomposição	Polimerização
Reação de óxido-redução	Degradação oxidativa

Os termogramas DSC de filmes de PVA reticulados foram efetuados em um equipamento Shimadzu DSC-50. Foram realizadas duas varreduras a uma taxa de aquecimento de 10°C/min e taxa de resfriamento de 320°C/min. As curvas DSC foram obtidas no intervalo de temperatura de 30°C a 250°C em atmosfera de nitrogênio. A  $T_g$  foi determinada durante a segunda varredura. O calor de fusão,  $\Delta H_m$  foi obtido pela integração da área do pico de fusão da curva DSC e o grau de cristalinidade,  $\chi_c$ ,

calculado através da Equação 9.5, considerando o calor de fusão do PVA 100% cristalino ( $\Delta H_m^c = 138,6 \text{ J/g}$ ).<sup>13</sup> A Figura 9.4 apresenta o equipamento DSC utilizado neste trabalho.



**Figura 9.4:** Equipamento DSC utilizado neste trabalho (INTEMA/CONICET/UnMdP)

### 9.2.3 – Caracterização espectroscópica (UV-Vis/FTIR)

Neste trabalho, as técnicas espectroscópicas UV/Vis e FTIR foram utilizadas para verificar a formação de um complexo de transferência de carga entre o PVA e Ftc.

A espectrofotometria nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho são importantes técnicas de caracterização de sistemas moleculares. Informações sobre a estrutura molecular e interações entre moléculas podem ser extraídas dos espectros de absorção gerados pela interação da radiação com a matéria. A espectrofotometria se trata de um ensaio não destrutivo, já que a radiação não destrói ou altera a estrutura da amostra.<sup>14</sup>

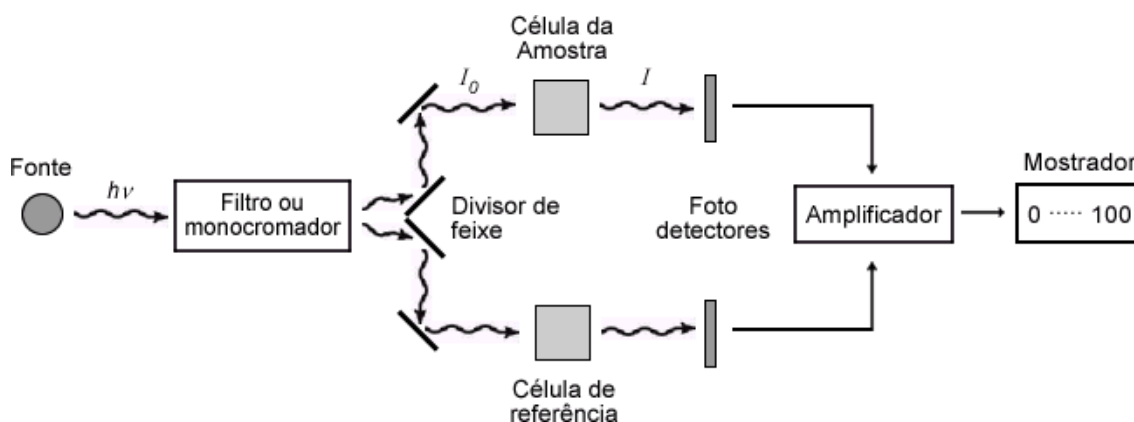
A radiação ultravioleta compreende a faixa de espectro eletromagnético com comprimentos de onda entre  $3,8 \times 10^{-7}$  m e  $6 \times 10^{-10}$  m, a radiação visível entre  $3,8 \times 10^{-7}$  m a  $7,8 \times 10^{-7}$  m (380 nm a 780 nm) e a radiação infravermelha entre  $10^{-3}$  m e  $7,8 \times 10^{-7}$  m.<sup>2</sup>

A energia total de excitação de uma molécula pode ser descrita como a soma da energia associada à rotação da molécula como um todo, à vibração dos núcleos em torno de suas posições de equilíbrio e às transições eletrônicas. Assim, podemos distinguir três tipos de espectros óticos:<sup>15,16</sup> Espectro rotacional, rotacional-vibracional e eletrônico. Os espectros rotacionais são atribuídos a transições entre níveis rotacionais adjacentes em um estado eletrônico e nível vibracional particular. Apenas o número quântico rotacional,  $J$ , sofre alteração. Os espectros rotacionais-vibracionais são atribuídos a transições de um estado rotacional de um nível vibracional para um estado rotacional de um nível vibracional adjacente, em um mesmo nível eletrônico. Os números quânticos rotacionais,  $J$ , e vibracionais,  $\nu$ , sofrem alteração. Os espectros eletrônicos estão associados a alterações nas energias eletrônica, vibracional e rotacional da molécula. Um estado eletrônico possui muitos estados vibracionais correspondentes, e um estado vibracional possui vários estados rotacionais correspondentes. A isso se dá o nome de Bandas. O espectro de absorção eletrônico contém todas as bandas vibracionais da transição eletrônica, sendo que todos os números quânticos mudam nessas transições.

Na espectroscopia UV/Vis, quando um feixe de luz atravessa um material, a luz incidente será mais intensa que a luz transmitida. A atenuação da luz incidente pode ser atribuída aos fenômenos de espalhamento pelas partículas em suspensão na amostra, reflexão entre as interfaces e absorção da luz pela amostra. Este último, em soluções verdadeiras, é o principal fator de atenuação da luz incidente.<sup>14</sup>

A espectrofotometria de absorção molecular é baseada na medida da fração de luz transmitida (transmitância),  $T$ , ou da fração de luz absorvida (absorbância),  $A$ , por uma amostra contida em um recipiente translúcido.<sup>14,17</sup> A Figura 9.4 mostra um desenho esquemático de um espectrofotômetro de duplo feixe. O funcionamento do equipamento consiste basicamente na passagem de um feixe de luz monocromática por uma cubeta contendo a amostra e um feixe de mesma intensidade por uma cubeta contendo uma referência. A luz transmitida pela amostra e pela referência é detectada e sua diferença calculada e mostrada. A amostra de referência tem a função de minimizar

o efeito da luz refletida nas medidas, como também a de eliminar as bandas de absorção do solvente da amostra.



**Figura 9.4:** Desenho esquemático de um espectrofotômetro UV/Vis de duplo feixe.

Desprezando a atenuação da luz incidente proveniente da reflexão e espalhamento, os valores de  $T$  e  $A$  são relacionados com a concentração  $c$  da solução e pelo caminho óptico  $b$  no recipiente pela seguinte expressão:<sup>14,17</sup>

$$A = -\log T = \frac{I_0}{I} = \epsilon bc \quad (9.6)$$

sendo  $\epsilon$  é a absorvitividade molar,  $c$  a concentração molar,  $I_0$  a intensidade da luz incidente e  $I$  a intensidade da luz transmitida. A expressão

$$A = \epsilon bc \quad (9.7)$$

é conhecida como lei de Beer.

Um gráfico da absorbância (ou da transmitância) de uma substância em função do comprimento de onda,  $\lambda$ , da luz incidente é chamado de espectro de absorção. A espectrofotometria molecular na região do UV/Vis consiste na media da absorbância (ou da transmitância) de uma amostra em cada comprimento de onda compreendido na região do espectro do ultravioleta ao visível (200 nm a 700 nm).

A intensidade da absorção de luz monocromática por uma molécula é dependente de sua estrutura. Desta forma, a espectrofotometria UV/Vis pode ser utilizada para identificar uma substância através de seu espectro ou até mesmo para verificar a interação entre duas ou mais substâncias. A absorção de luz pela amostra se deve às transições atômicas entre os orbitais moleculares da amostra (espectro eletrônico). Um composto absorve luz na região do espectro ultravioleta/visível quando

a radiação incidente possui energia da mesma ordem da energia,  $\Delta E$ , de sua banda proibida.

A espectrofotometria na região do infravermelho é uma das técnicas de maior importância para a caracterização da estrutura molecular. O espectro infravermelho de um sistema desempenha o papel de uma “impressão digital”, podendo ser utilizado para identificação do material.<sup>14</sup>

Através da espectroscopia FTIR é possível observar bandas relativas a ligações específicas entre átomos do material. Desta forma, a espectroscopia FTIR é útil, no projeto de um biossensor, para observar interações entre as moléculas da matriz polimérica e do mediador de elétrons, como também interações entre a matriz e a enzima.

Todas as substâncias orgânicas e algumas inorgânicas absorvem radiação infravermelha. A radiação absorvida afeta os níveis rotacionais e vibracionais da molécula. A faixa do espectro infravermelho compreendida entre  $10^{-3}$  m e  $10^{-4}$  m, chamada de infravermelho distante, é aplicável a excitação de espectros rotacionais, enquanto a faixa de comprimentos de onda menores, entre  $10^{-4}$  m e  $10^{-7}$  m, chamada infravermelho próximo, é aplicável a excitação de espectros vibracionais.<sup>15,16</sup>

A frequência fundamental de vibração,  $\nu$ , de uma molécula pode ser expressão pela seguinte equação:<sup>18</sup>

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (9.8)$$

sendo  $k$  a constante de força, e  $\mu$  a massa reduzida, dada por  $\mu = m_1 m_2 / (m_1 + m_2)$ , sendo  $m_1$  e  $m_2$  as massas dos átomos envolvidos na ligação química de interesse. Esta equação simples fornece uma conexão entre a força de uma ligação covalente, a sua frequência de vibração e as massas dos átomos. Porém, ela não considera a repulsão e atração das nuvens de elétrons e não incorpora o conceito de dissociação da ligação em altas absorções de energia.

Na prática, um espectro é composto de mais que apenas modos normais de vibração, ou estiramento das ligações. Deformações angulares também desempenham grande importância, sendo estes relacionados à absorção de radiação de menores frequências.<sup>18</sup>

Cada grupo funcional em uma molécula possui sua frequência de absorção característica. Desta forma, uma análise qualitativa de um espectro



infravermelho nos fornece importantes informações sobre a presença ou não de grupos funcionais em uma molécula desconhecida. Leves alterações nas frequências características de grupos podem indicar a ocorrência de eventos físicos ou químicos, que podem ser relacionados à formação de complexos, solventes e outros efeitos.<sup>14</sup>

O espectro eletrônico de filmes de PVA, CuFtc e PVA/CuFtc foram obtidos através de uma varredura entre 200 nm e 1000 nm a temperatura ambiente (25 °C) utilizando um espectrofotômetro UV/Vis Varian Serie 643 (200 nm a 400 nm) e um espectrofotômetro UV/Vis Biospectro SP-22 (400 nm a 100 nm) (Figura 9.5).

O espectro infravermelho de filmes de PVA, CuFtc e PVA/CuFtc foram obtidos a temperatura ambiente em um equipamento Mattson Genesis II. Os espectros foram coletados após 32 varreduras com resolução de 2 cm<sup>-1</sup>.



**Figura 9.5:** Espectrômetro UV/Vis Varian Serie 643 (A) e Biospectro SP-22 (B) utilizados para obtenção do espectro UV/Vis.

#### 9.2.4 – Análise microestrutural por MEV

A caracterização morfologia das membranas reticuladas de PVA foi realizada nos laboratórios do IPEN/USP através de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) modelo Phillips XL 30. A Figura 9.6 ilustra o MEV utilizado neste trabalho.

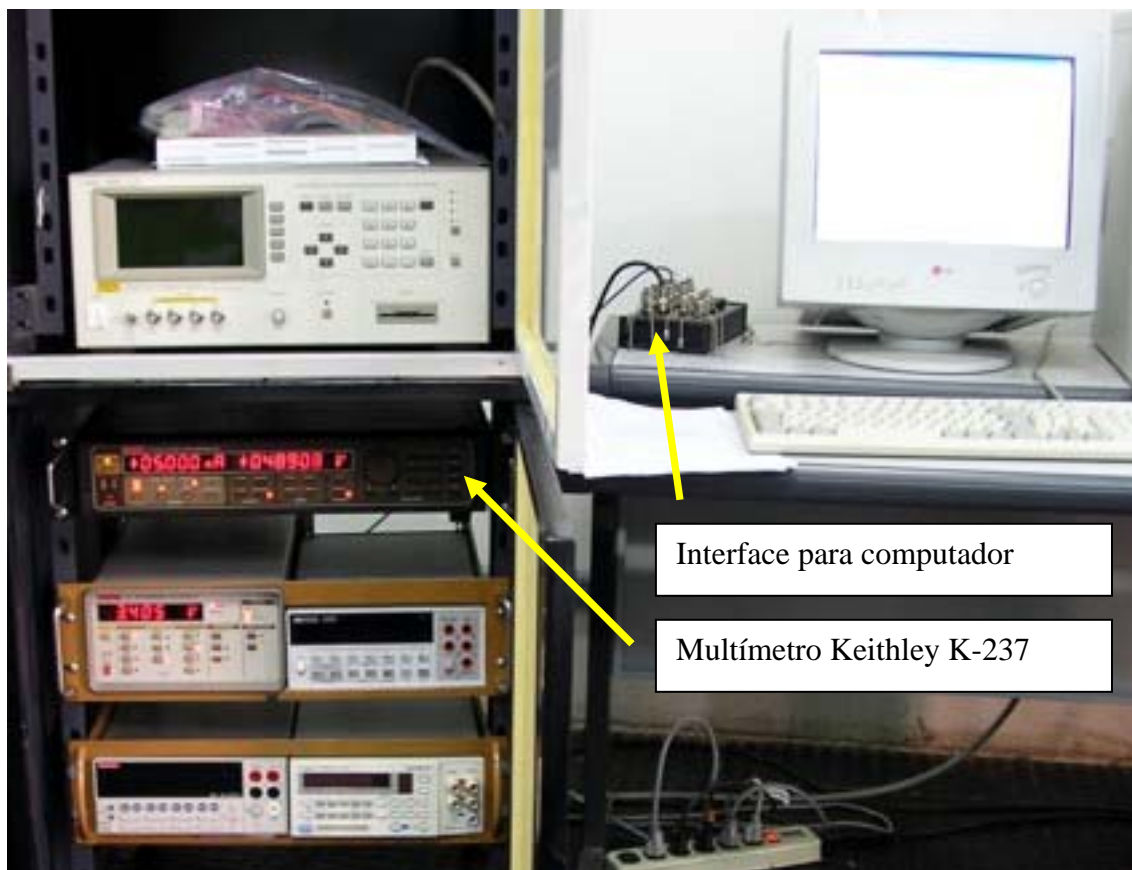


**Figura 9.6:** MEV utilizado neste trabalho (IPEN/CNEN-USP).

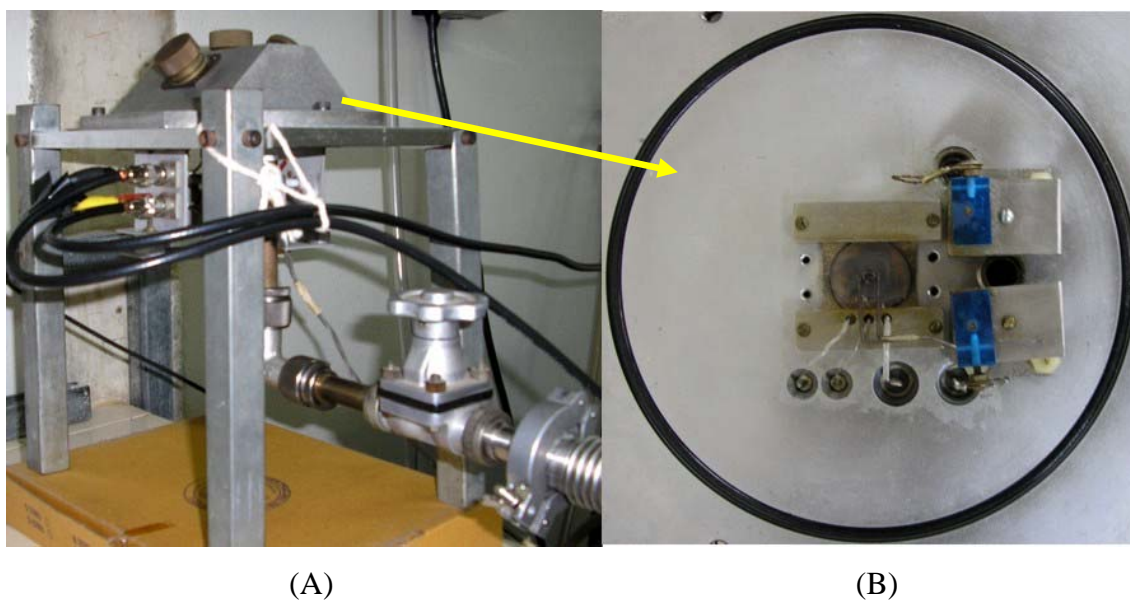
### 9.2.5 - Transporte eletrônico em filmes de PVA/Ftc

Foram estudadas as propriedades elétricas de filmes PVA, Ftc e filmes de PVA/Ftc com diferentes concentrações de Ftc. Filmes na forma de discos de PVA e PVA/Ftc foram preparados pela técnica de evaporação do solvente com diâmetro de 5,7 mm e espessura entre 0,22 mm e 0,28 mm. As amostras de Ftc foram sintetizadas através de prensagem uniaxial com pressão de 3 ton durante 15 minutos, produzindo amostras cilíndricas com 8 mm de diâmetro e espessura média de 1,4 mm. Para a realização do experimento, as amostras foram revestidas com cola prata em ambas as faces, para estabelecimento do contato elétrico na montagem experimental.

A caracterização elétrica das membranas de PVA/Ftc foi realizada em uma câmara escura com temperatura controlada e com vácuo, utilizando-se um multímetro Keithley modelo K-237, interfaceado por computador através de um programa construído no sistema LabView. O multímetro Keithley utilizado para realização das medidas é mostrado na Figura 9.7. A câmara com vácuo e temperatura controlada utilizada é apresentada na Figura 9.8, com um detalhe do compartimento da amostra.



**Figura 9.7:** Multímetro Keithley modelo K-237 utilizado para a caracterização elétrica dos filmes de PVA, Ftc e PVA/Ftc.



**Figura 9.8:** Câmara (A) e compartimento para amostras (B) utilizados na caracterização elétrica dos filmes de PVA, Ftc e PVA/Ftc.

A condutividade das amostras foram investigadas, em filmes contendo PVA no intervalo de temperaturas de 25 °C a 70 °C. As amostras de Ftc foram estudadas em temperaturas entre 25° C e 200 °C. As amostras foram submetidas a variações de tensão de 0 V a 5 V, lendo-se a corrente *DC* em função da tensão aplicada.

O mecanismo de transporte eletrônico em membranas de PVA/Ftc foi investigado através da Equação 7.4. Para cada um dos tipos de amostras foram construídos gráficos  $\ln(\sigma)$  versus  $1/T^\alpha$  assumindo valores de  $\alpha$  iguais a  $\alpha = 0,25$  e  $\alpha = 0,50$ . Após realizar o ajuste de uma reta à cada uma das curvas, através do método dos mínimos quadrados, o coeficiente de correlação foi comparado. Foi considerado como característico do mecanismo de condução, para cada tipo de amostra, o valor do coeficiente  $\alpha$  que permite a maior linearidade (maior coeficiente de correlação) da curva contida no gráfico ( $\sigma$ ) versus  $1/T^\alpha$ .

A energia de ativação associada ao processo de saltos nos modelos de Mott e Efros foi calculada através da Equação 7.3, em analogia ao modelo de Arrhenius.

### 9.3 – Referências bibliográficas

1. Hemedat, O. M.; Hemedat, D. M.; Said, M. Z. Some physical properties of pure and doped polyvinyl alcohol under applied stress. *Mechanics of Time-Dependence Material*. 7, 251-268, 2003.
2. Gan, L. H.; Deen, G. R.; Tam, K. C. Water sorption studies of new pH-responsive N-acryloyl-N'-methyl piperazine and methyl methacrylate hydrogels. *European Polymer Journal*. 37, 1473-1478, 2001.
3. Urushizaki, F.; Yamaguchi, H.; Nakamura, K.; Numajiri, S.; Sugibayashi, K.; Marimoto, Y. Swelling and mechanical properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels. *International Journal of Pharmaceutics*. 58, 135-142, 1990.
4. Anseth, K.S.; Bowman, C. N.; Peppas, L. B. Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials*. 17 (17), 1647-1657, 1996.
5. Flory, P. J.; Rehner, J. Statistical mechanics of cross-linked polymer networks II. Swelling. *The Journal of Chemical Physics*. 11 (11), 521-529, 1943.

6. Wang, J.; Wu, W. Swelling behaviors, tensile properties and thermodynamic studies of water sorption of 2-hydroxyethyl methacrylate/epoxy methacrylate copolymeric hydrogels. *European Polymer Journal*. 41, 1143-1151, 2005.
7. Ionashiro, M.; Giolito, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. *Cerâmica*. 26 (121), 17-24 1980
8. Ionashiro, M.; Giolito, I. A nomenclatura em análise térmica – Parte II. *Cerâmica*. 34 (225), 163-164, 1988.
9. Bernal, C.; Couto, A. B.; Breviglieri, S. T.; Cavalheiro, T. G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais – DSC. *Química Nova*. 25 (5), 849-855, 2002.
10. Collins, E. A.; Bares, J.; Billmeyer, F. W. *Experiments in Polymer Science*. New York: John Wiley & Sons, 1973
11. Rosen, S. L. *Fundamental Principles of Polymeric Materials*. New York: John Wiley & Sons. 2<sup>a</sup> ed, 1993.
12. Hassan, C. M.; Peppas, N. A. Structure and Applications of Poly(vinyl Alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking of by Freezing /Thawing Methods. *Advances in Polymer Science*. 153, 37-65, 2000.
13. Mallapragada, S. K.; Peppas, N. A. Dissolution Mechanism of Semicrystalline Poly(vinyl alcohol) in Water. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*. 34, 1339-1346, 1996.
14. Sunshine, Irving. *Handbook of Spectrophotometric Data of Drugs*. Flórida: CRC Press, 2000.
15. Alonso, M.; Finn, E. J. *Física*. Madri: Addison-Wesley, 1999.
16. Alcantara, P. *Espectrofotometria Molecular*. Disponível Em: <<http://www.ufpa.br/ccen/fisica/didatico/espectrofotometria.pdf>>. Acesso em: 12 junho 2006.
17. Disponível em: <[http://www.iqsc.usp.br/iqsc/ensino/graduacao/disc\\_online/bacharel/ana\\_inst\\_i/eamu.pdf](http://www.iqsc.usp.br/iqsc/ensino/graduacao/disc_online/bacharel/ana_inst_i/eamu.pdf)>. Acesso em: 12 junho 2006.
18. Coates, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Pratical Approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. R.A. Meyers. 10815-10837. Chichester: John Wiley & Sons, 2000.

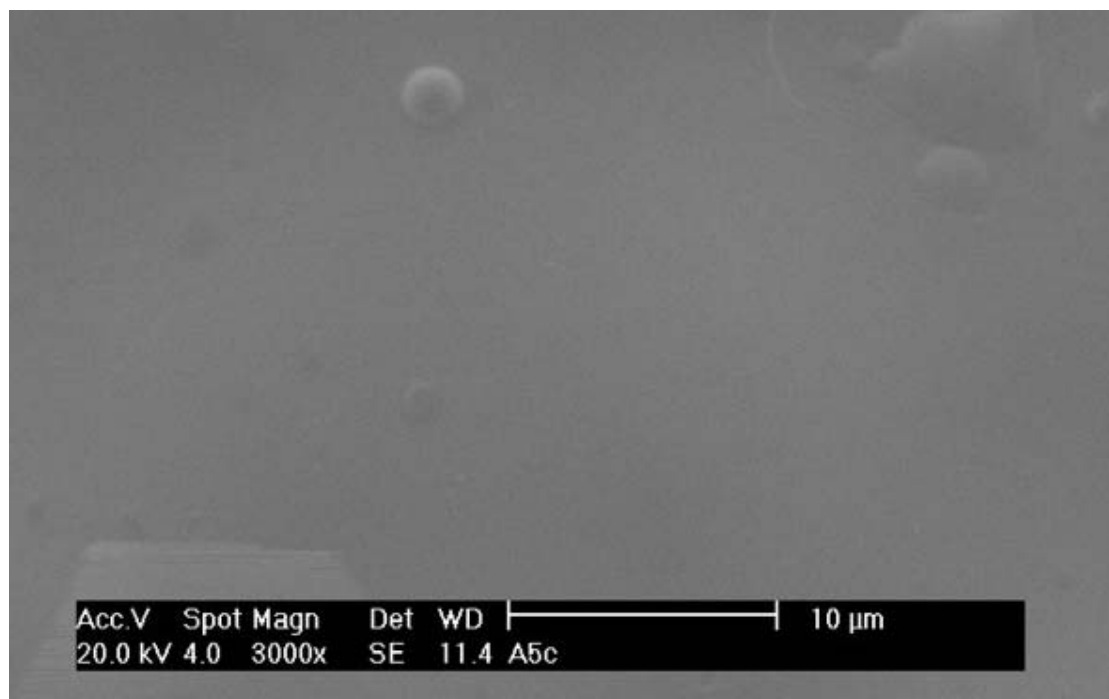
## 10.1 - Caracterização físico-química do biossensor

### 10.1.1 – Análise da microestrutura por MEV

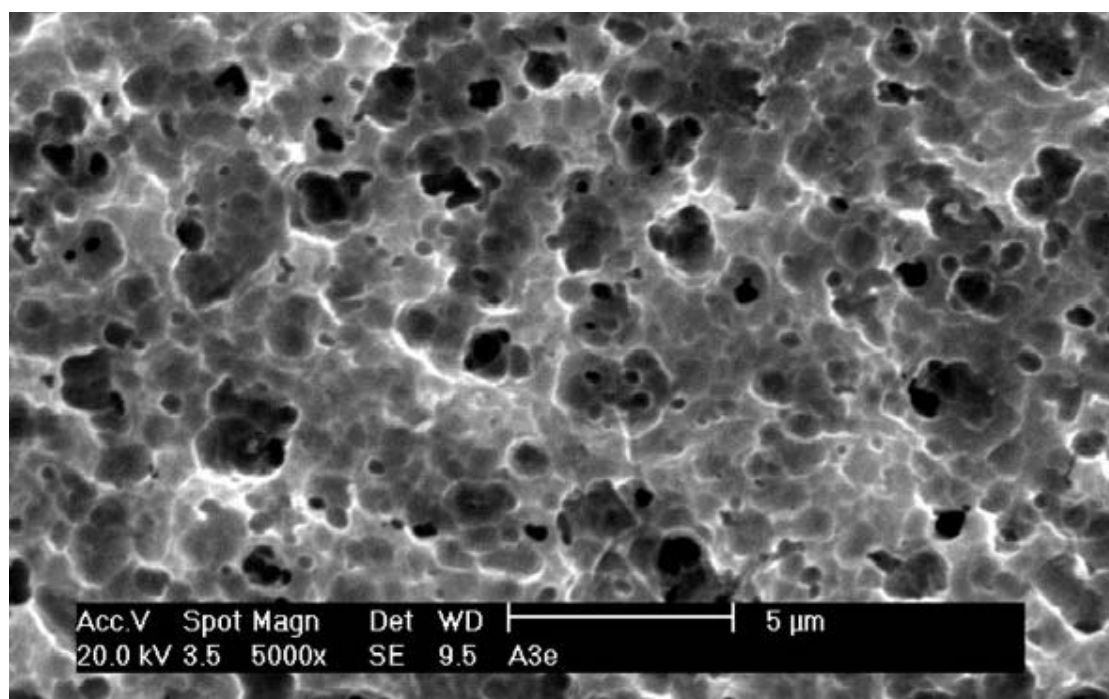
A morfologia da matriz polimérica utilizada para construção do biossensor pode influenciar a estabilidade da enzima ocluída. É desejável que a matriz polimérica apresente uma distribuição de porosidade que permita a difusão do analito e dos produtos da reação através da matriz polimérica.

As membranas de PVA, após o processo de reticulação (Figura 10.2), apresentaram uma grande distribuição de poros, ao contrario das membranas não reticuladas (Figura 10.1). A formação de poros nas membranas de PVA reticuladas pode ter ocorrido durante o processo de evaporação do solvente (água) contida no hidrogel. O processo de formação de poros durante a desidratação está relacionado a diversos fatores, principalmente à tensão superficial, estrutura, mecanismo de transporte e conteúdo de água.<sup>1,2</sup> O aumento da tensão superficial das membranas causada pelo processo de reticulação gera uma barreira para a evaporação de água das membranas. Os poros podem se formar devido à instabilidade superficial provocada pela grande pressão osmótica necessária para vencer essa barreira à evaporação da água.

O processo de formação de porosidade em hidrogéis devido a reticulação é um processo complexo cujo mecanismo ainda não foi devidamente esclarecido pela literatura.<sup>1</sup>



**Figura 10.1:** Micrografia MEV de uma membrana de PVA não reticulada. O filme foi seco à 25 °C sob vácuo.



**Figura 10.2:** Micrografia MEV de uma membrana de PVA reticulada com ácido bórico. A desidratação da membrana ocorreu a 25 °C sob vácuo.

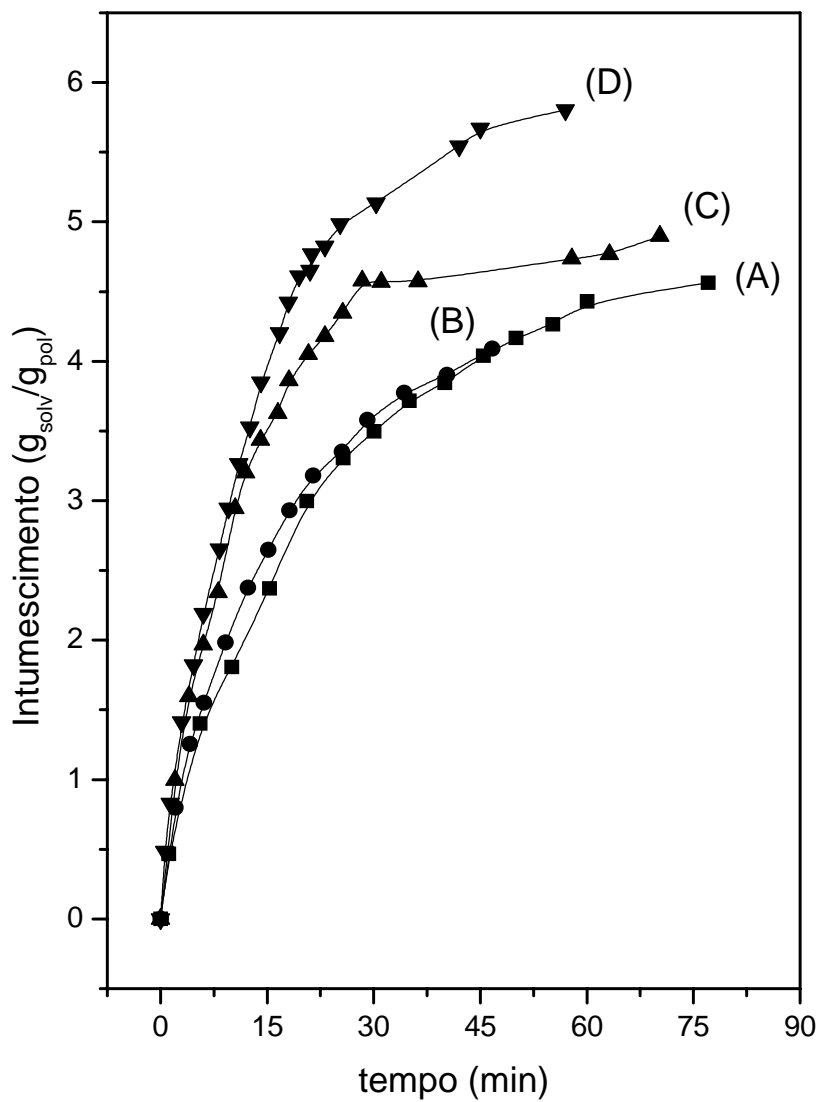
### 10.1.2 – Difusão de fluido fisiológico através da membrana

O meio ideal para que ocorra a reação catalisada pela colesterol oxidase é o meio aquoso. Desta forma, o transporte de água na matriz polimérica influencia a atividade enzimática e, conseqüentemente a performance do biossensor. O tempo de resposta do biossensor é dependente do tempo necessário para que ocorra a difusão do analito juntamente com a água para o interior da matriz polimérica.

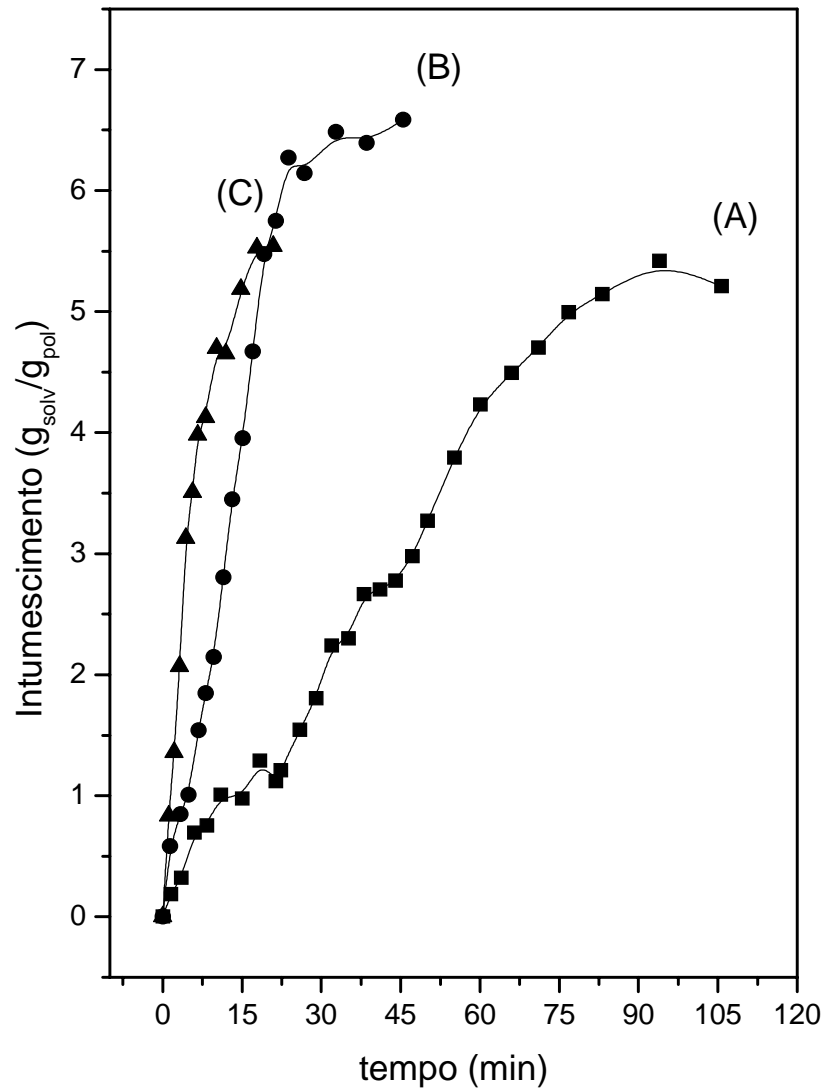
Os resultados obtidos com relação ao transporte de água em membranas de PVA reticulado (PVAR) e não reticulado (PVA) são apresentados nas Figuras 10.3 a 10.5. Estas figuras não apresentam curvas obtidas por ajuste, mas apenas curvas de tendência. A Figura 10.3 mostra a cinética de intumescimento de membranas não reticuladas de PVA a temperaturas entre 20° C e 50 °C. A Figura 10.4 apresenta a cinética de intumescimento de membranas de PVAR, reticuladas por 25 min, a temperaturas entre 20° C e 40 °C. Não foi possível realizar os ensaios a temperatura de 50°C, devido à fragilidade da amostra a esta temperatura. Conseqüentemente, não foi possível calcular o valor do coeficiente de difusão para esta temperatura (Figura 10.6). Tanto as membranas de PVA quanto as de PVAR apresentaram um aumento da capacidade de sorção de água com o aumento da temperatura.

A Figura 10.5 apresenta a cinética de intumescimento de membranas de PVA não reticulado e membranas com tempos de reticulação entre 10 min e 60 min. As membranas apresentaram um decréscimo na capacidade de sorção de água com o aumento do tempo de reticulação. Este comportamento pode ser atribuído à diminuição nos graus de liberdade das cadeias de PVA devido ao processo de reticulação. A diminuição dos graus de liberdade das cadeias poliméricas prejudica o processo de relaxação e tende a diminuir a capacidade de sorção de água da matriz polimérica.

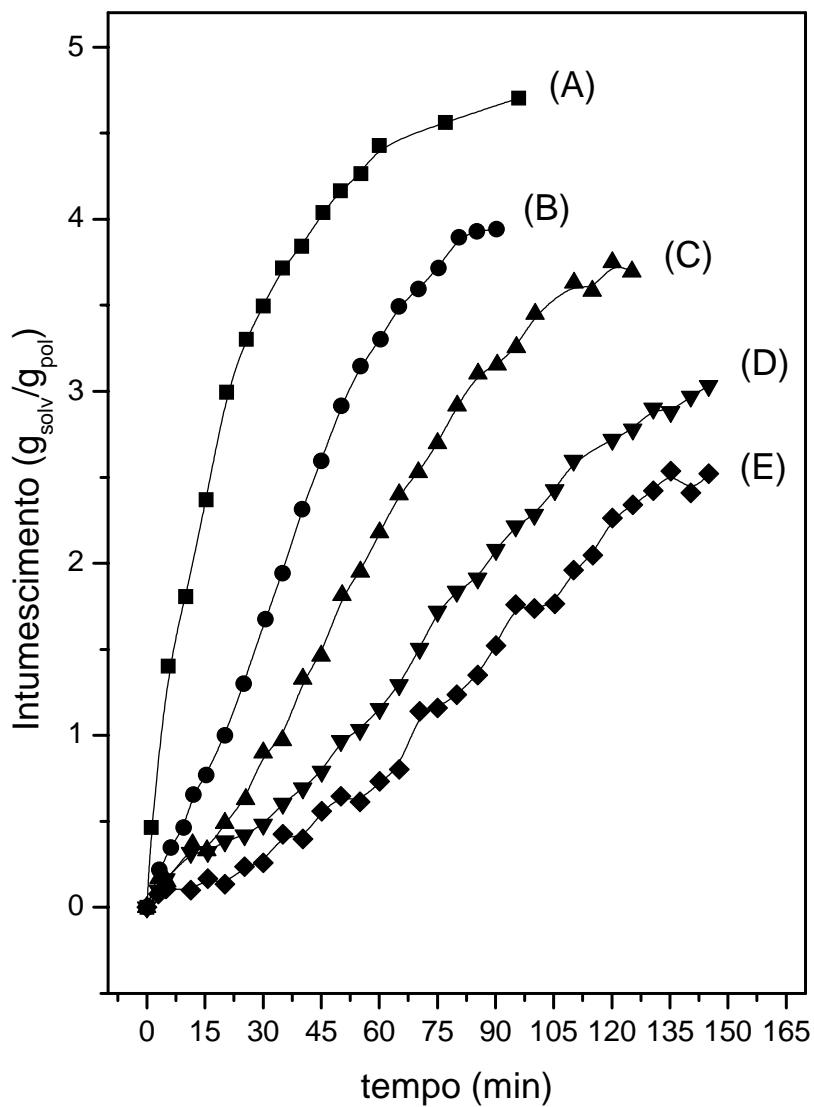




**Figura 10.3:** Cinética de intumescimento de membranas de PVA em solução fisiológica, pH 7,4, a diferentes temperaturas: 20° C (A), 30° C (B), 40° C (C) e 50° C (D). O desvio padrão médio é de 3%.



**Figura 10.4:** Cinética de intumescimento de membranas de PVAR em solução fisiológica, pH 7,4, reticuladas por 25 min, em diferentes temperaturas: 20° C (A), 30° C (B) e 40° C (C). O desvio padrão médio é de 3%.



**Figura 10.5:** Cinética de intumescimento, em solução fisiológica, pH 7,4, de membranas de PVA (A) e membranas de PVAR com diferentes tempos de reticulação: 10 min (B), 25 min (C), 40 min (D) e 60 min (E). O desvio padrão médio é de 3%.

A densidade de reticulação,  $\nu_e$ , das membranas de PVA foi calculada através da Equação 5.40. Para tempos de reticulação iguais a 10 min, 25 min, 40 min e 60 min, os valores de  $\nu_e$  foram respectivamente iguais a  $1,02 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$ ,  $1,09 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$ ,  $1,12 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$  e  $1,20 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$ .

A reticulação de membranas de PVA através de sua transição sol-gel em solução de ácido bórico se revelou uma técnica de alta eficiência, por produzir membranas com densidade de reticulação comparáveis a filmes de PVA reticulados com radiação gama de  $^{60}\text{Co}$ .<sup>3</sup> Os valores de  $\nu_e$ , citados na literatura, obtido através da técnica de reticulação por radiação gama são de  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$  a  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.cm}^{-3}$ .

O coeficiente de difusão,  $D$ , da água em membranas de PVA foi calculado através da solução da segunda lei de Fick para uma membrana (Equação 5.35). A Figura 10.6 mostra a curva de tendência do coeficiente de difusão de água, para membranas de PVA e PVAR ( $\nu_e = 1,09 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$ ), em função da temperatura. A saturação do coeficiente de difusão do PVAR a 30 °C está associado ao processo de reticulação. A diminuição no número de graus de liberdade das cadeias do polímero após o processo de reticulação com ácido bórico limita o intumescimento da amostra de PVA, como pode ser observado na Figura 10.5. O coeficiente de difusão para o PVA não reticulado apresentou um aumento exponencial com a temperatura, de acordo com a equação de Arrhenius (Equação 5.38).

A Figura 10.7 apresenta a curva de tendência do coeficiente de difusão de água em função da densidade de reticulações de membranas de PVA. Observa-se a diminuição de  $D$  como o aumento da densidade de reticulação do PVA. Este comportamento pode ser atribuído à diminuição no número de graus de liberdade das cadeias do polímero devido ao processo de reticulação.

A Tabela 10.1 apresenta os valores médios de  $n$  calculados para o PVA e PVAR com  $\nu_e$  entre  $1,02 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$  e  $1,20 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$ , e valores de entalpia,  $H_i$ , e energia de ativação,  $E_a$ , associada ao processo de difusão, para o PVA e PVAR com  $\nu_e = 1,02 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$ .

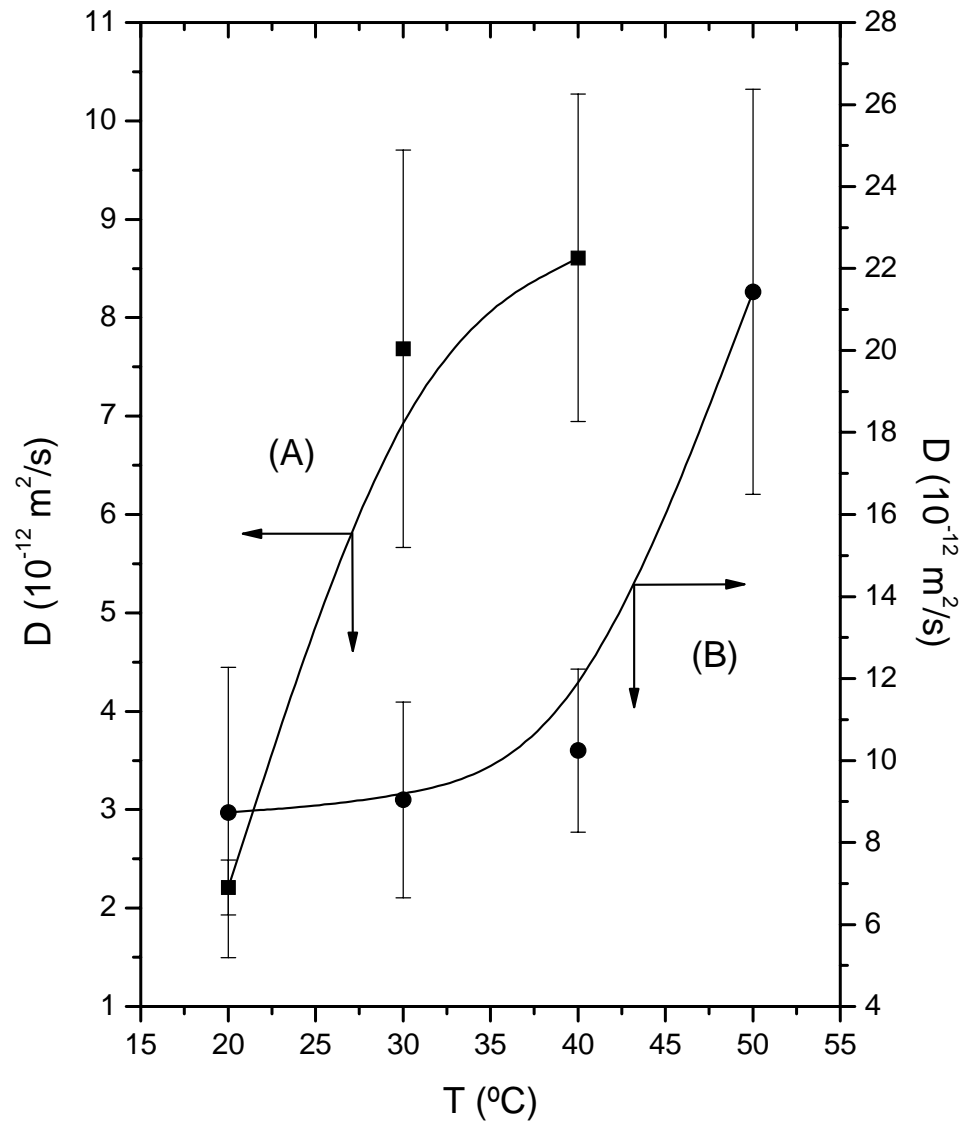
**Tabela 10.1** – Valores médios calculados de  $n$ , e valores de  $E_a$  e  $H_i$  para filme de PVA e PVA reticulado.

Amostra	$n$ / Desvio padrão <sup>a</sup>	$E_a$ (kJ/mol) <sup>b</sup>	$H_i$ (kJ/mol) <sup>b</sup>
Não reticuladas	0,61 / 0,04	0,65	1,24
Reticuladas	1,18 / 0,27	21,00	3,37

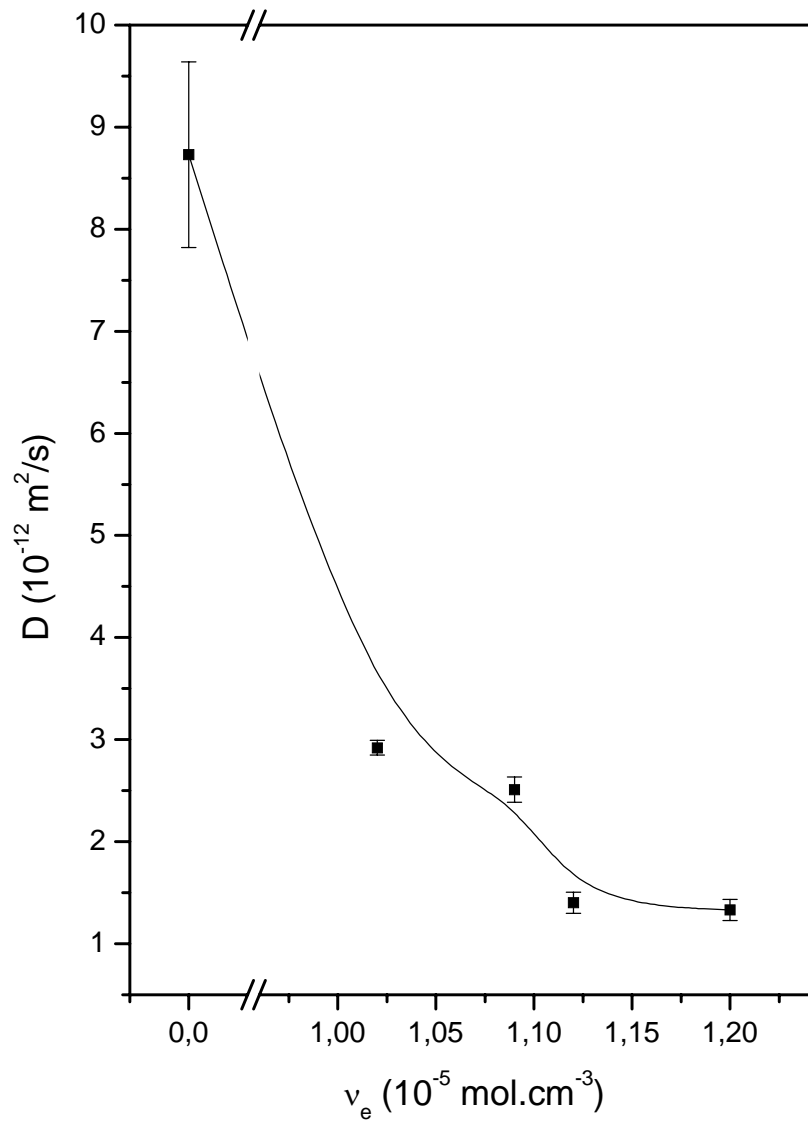
<sup>a</sup> valores médios para membranas com  $\nu_e=1,02 \times 10^{-5}$  mol.cm<sup>-3</sup> a  $\nu_e=1,20 \times 10^{-5}$  mol.cm<sup>-3</sup>;

<sup>b</sup> valores para amostras com  $\nu_e=1,02 \times 10^{-5}$  mol.cm<sup>-3</sup>.

Observou-se um mecanismo de difusão do tipo não “Fickiano” para o transporte de água nas membranas de PVAR (Tabela 10.1). Este tipo de transporte indica que o processo de sorção de água pelas membranas é fortemente dependente da cinética de intumescimento. A diminuição dos graus de liberdade das cadeias poliméricas provocada pelo processo de intumescimento compromete a relaxação das cadeias poliméricas, fazendo com que este processo seja mais lento que o processo de difusão de água nos filmes. Para as membranas de PVA, observou-se um pequeno desvio do mecanismo de difusão “Fickiano”. O filme de PVA apresentou os menores valores de  $E_a$  e  $H_i$ , indicando menor energia associada ao processo de sorção de água durante o processo de intumescimento relativamente ao filme de PVAR.



**Figura 10.6:** Dependência do coeficiente de difusão com a temperatura para membranas de PVAR (A) e PVA (B).



**Figura 10.7:** Dependência do coeficiente de difusão com a densidade de reticulações das membranas de PVA à temperatura de  $20^\circ\text{C}$ .

### 10.1.3 - Avaliação das propriedades mecânicas

As Figuras 10.8 a 10.11 apresentam as curvas TMA referente à profundidade de penetração devido a forças de 0,1, 0,2 e 0,5 N versus tempo de exposição para amostras com densidade de reticulação de  $\nu_e=1,02 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$  (Figura 10.8),  $\nu_e=1,09 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$  (Figura 10.9),  $\nu_e=1,12 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$  (Figura 10.10) e  $\nu_e=1,20 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$  (Figura 10.11). Para cada  $\nu_e$  foram analisadas oito amostras diferentes. O desvio padrão médio da profundidade de penetração para as forças de 0,1, 0,2 e 0,5 N foram iguais a 1,10, 7,46 e 11,57  $\mu\text{m}$  respectivamente. Observou-se que a profundidade de penetração da ponta de prova diminui com o aumento na densidade de reticulações das membranas de hidrogéis, sugerindo um aumento da resistência mecânica das membranas com o aumento de  $\nu_e$ .

O módulo de Young,  $\gamma$ , das membranas foi calculado através das curvas profundidade de penetração versus tempo, considerando por vez, a profundidade de penetração após 30 s devido a duas das forças aplicadas, segundo a relação:

$$\gamma = \left| \frac{\Delta P_{i,j}}{\Delta l_{i,j}} \right|, i=0,1, 0,2, 0,5; j=0,1, 0,2, 0,5, i \neq j \quad (10.1)$$

sendo  $\Delta P$  a diferença de pressão exercida pelas forças  $i$  e  $j$  e  $\Delta l$  a diferença da porcentagem de deformação provocadas pelas forças  $i$  e  $j$ . A porcentagem de deformação,  $l$ , sofrida pela amostra é dada pela relação:

$$l = \frac{p}{d} \quad (10.2)$$

sendo  $p$  a profundidade de penetração da ponta de prova e  $d$  a espessura do filme. O módulo de Young de cada membrana é determinado pela média dos valores de  $\gamma$  obtidos pela equação 10.1.

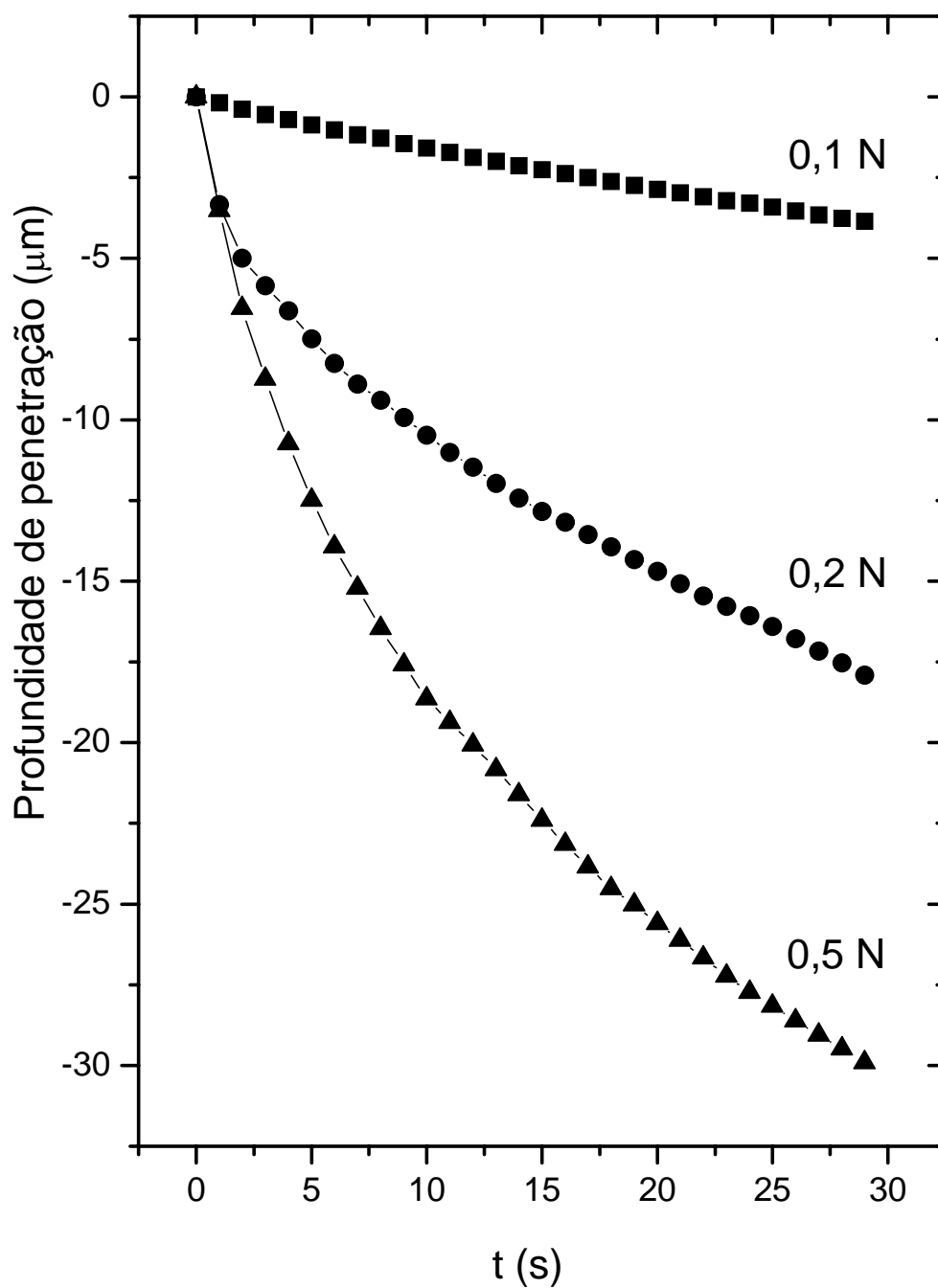
Comumente na literatura o valor de  $\gamma$  é obtido a partir de curvas tensão versus deformação. Porém, neste trabalho o valor de  $\gamma$  é obtido a partir de curvas pressão versus deformação. Para pequenas deformações, a deformação sofrida por uma amostra devido a uma força de pressão possui o mesmo valor que a deformação promovida por uma força de tração de mesmo módulo.<sup>4</sup> Este fato torna válida a metodologia de cálculo do módulo de Young realizado neste trabalho.

O valor de  $\gamma$  de membranas de PVA e PVAR ( $\nu_e=1,02 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$ ), não intumescidas, são respectivamente iguais a 401,87 MPa e 5699,59 MPa. O valor de

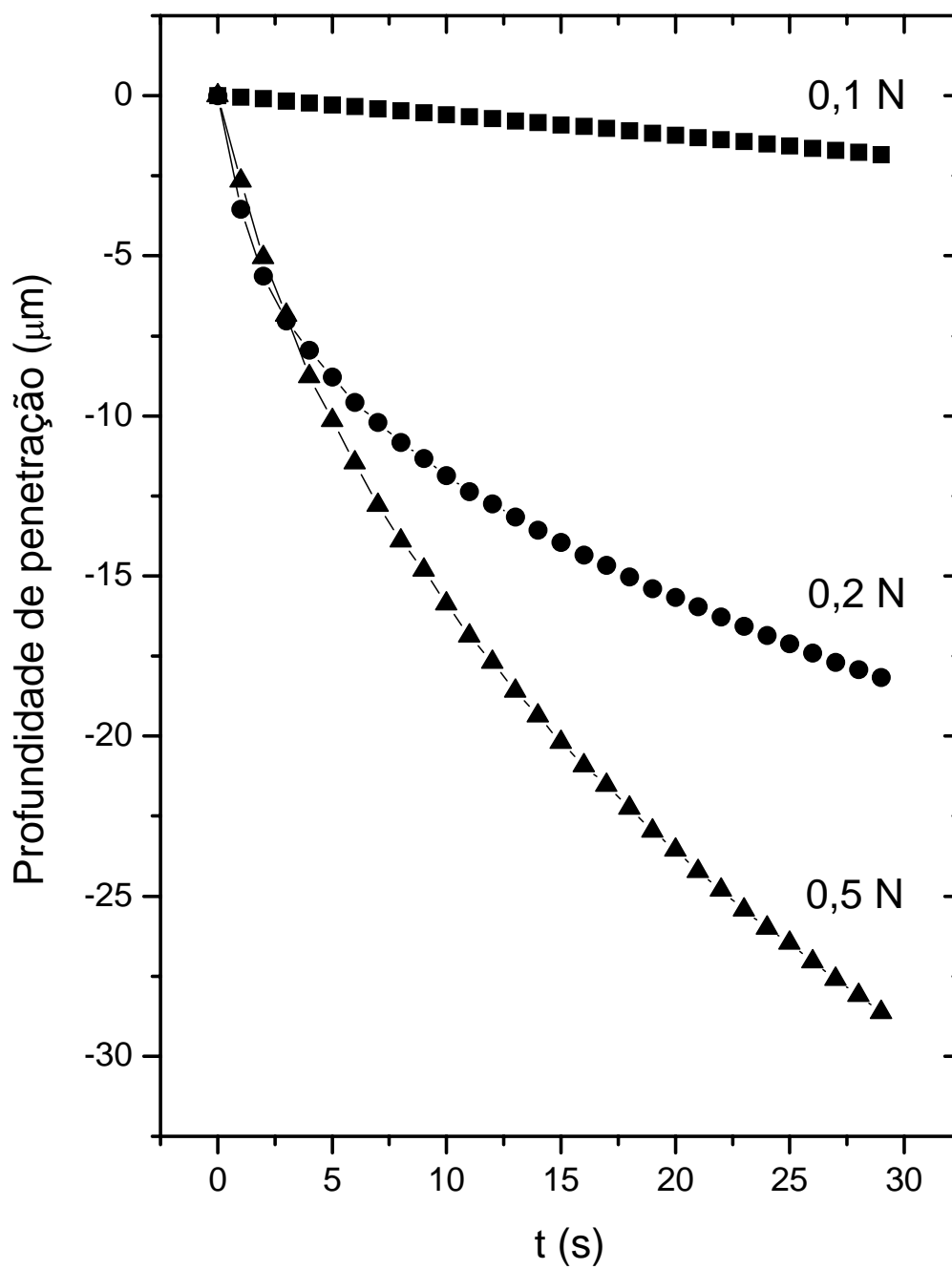


$\gamma$  obtido para membranas de PVA é comparável ao valor encontrado na literatura ( $\gamma = 120$  MPa).<sup>5</sup> Os valores do  $\gamma$  do PVAR e PVA, no seu máximo de intumescimento, em função da densidade de reticulações são apresentados pela Figura 10.12. O desvio padrão médio dos valores de  $\gamma$  é 18,35 MPa. Podemos observar que  $\gamma$  aumenta com o aumento de  $\nu_e$ . A clara relação linear ( $R^2=0,97$ ) entre essas duas variáveis pode ser atribuída ao processo de reticulação das membranas de PVA. Essa relação é prevista pela Equação 9.2, como também a diminuição de  $\gamma$  devido ao processo de intumescimento. O alto valor do desvio padrão referente aos valores de  $\gamma$  pode ser atribuído à cinética de difusão anômala (Capítulo 5.6) das membranas de PVA reticuladas. A cinética de difusão anômala provoca o intumescimento não homogêneo nas membranas, fazendo com estas apresentem diferenças de espessura e superfície não plana. Também a perda de água das membranas durante os ensaios é outro fator importante que influencia as propriedades mecânicas das membranas.

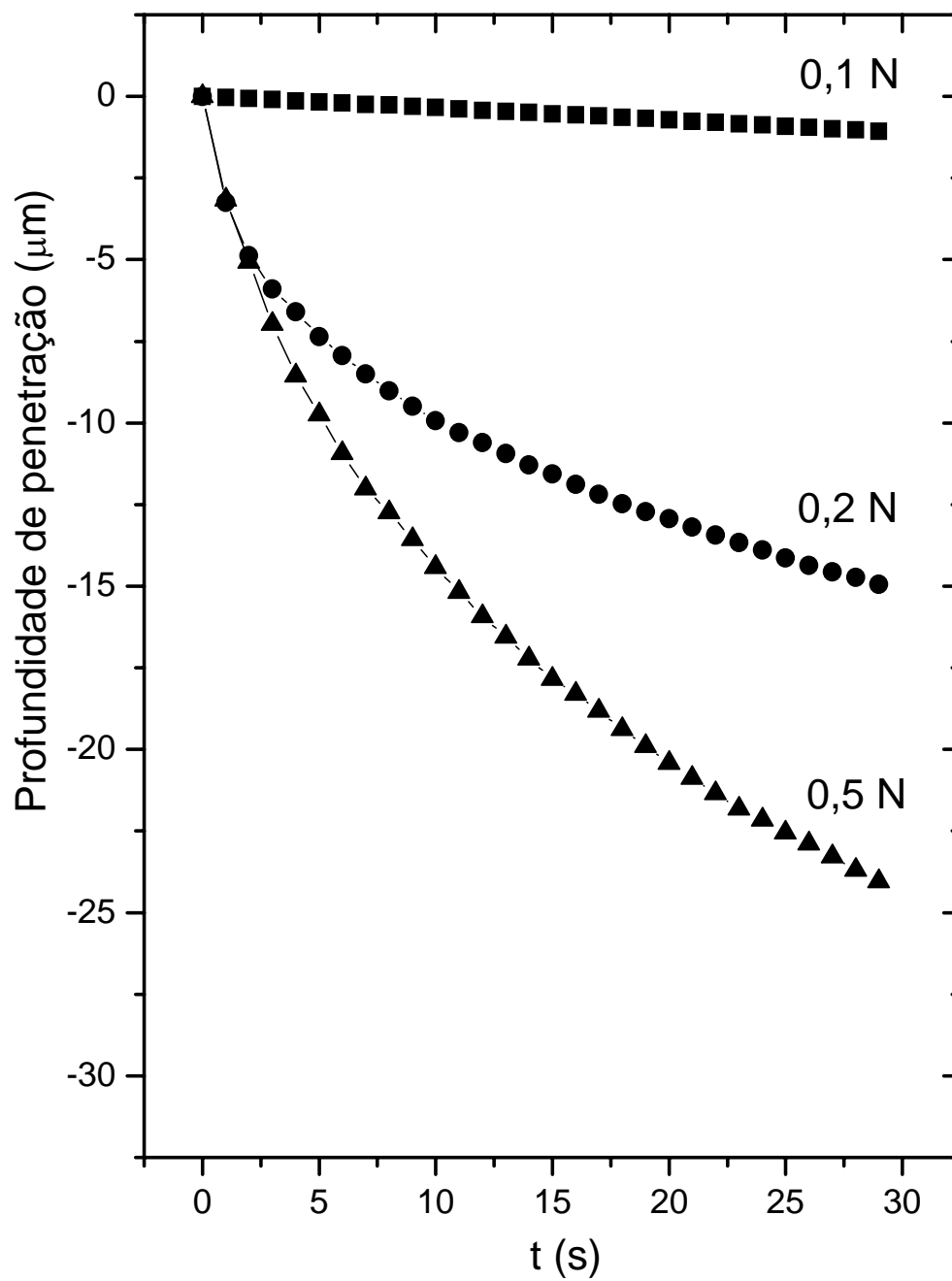
No projeto do biossensor, a matriz polimérica deve possuir um valor apreciável de  $\gamma$ , para garantir a estabilidade mecânica da matriz polimérica, o que facilitaria seu manuseio durante o processo de fabricação e utilização.



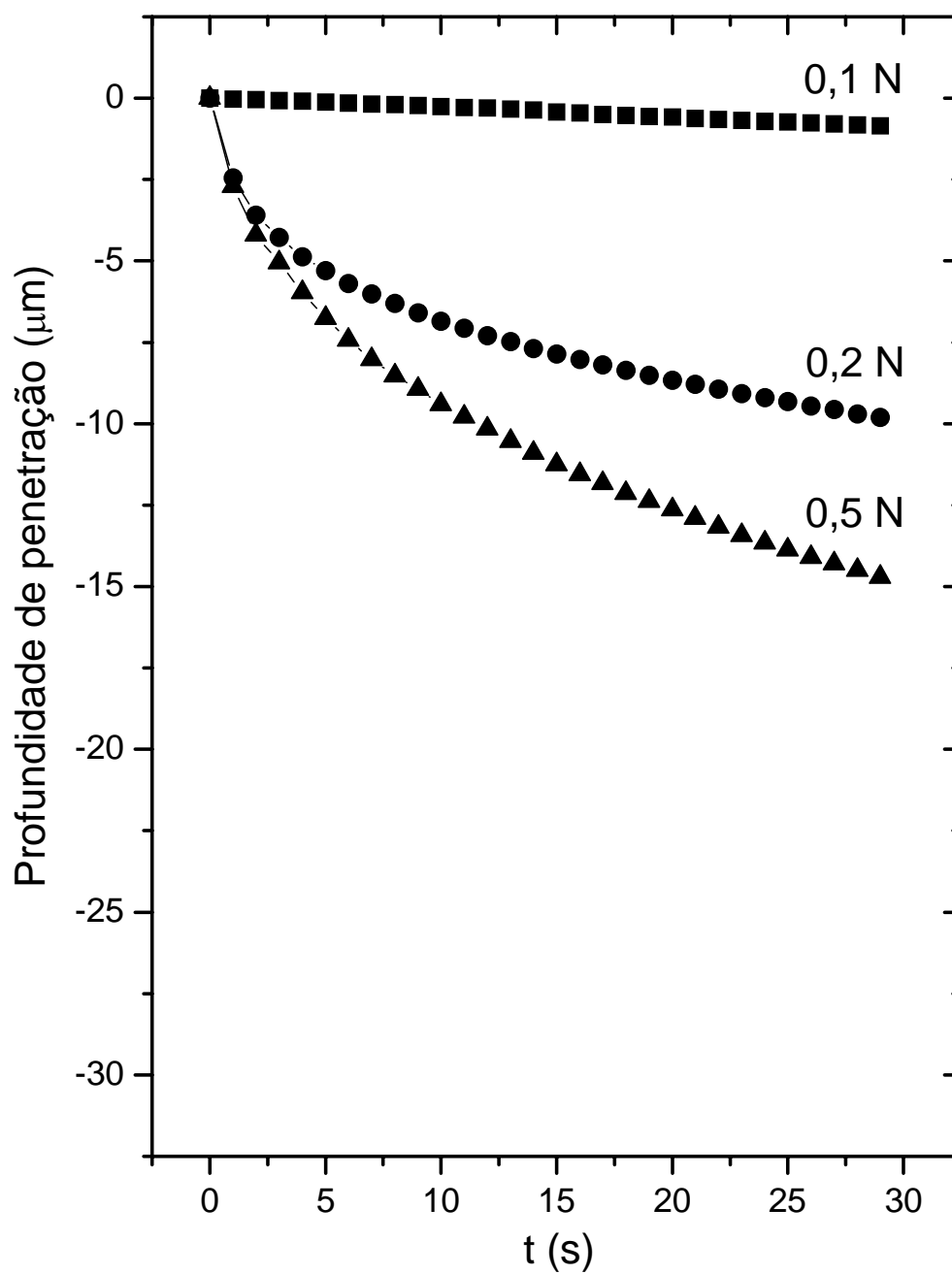
**Figura 10.8:** Profundidade de penetração versus tempo de exposição das membranas às forças de 0,1, 0,2 e 0,5 N para a amostra de PVAR ( $v_e=1,02 \times 10^{-5}$  mol.cm<sup>-3</sup>) intumescidas, à temperatura de 25°C.



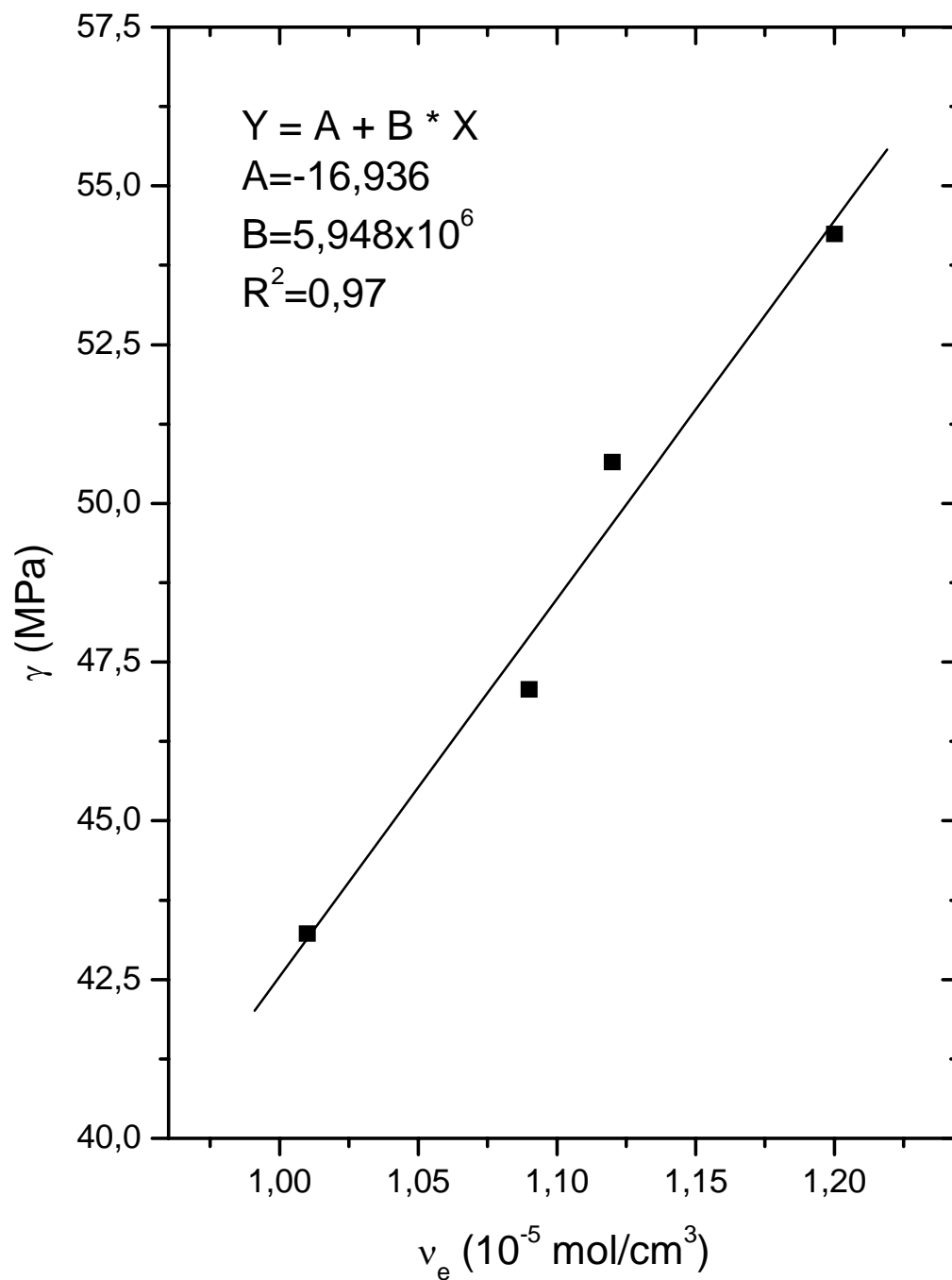
**Figura 10.9:** Profundidade de penetração versus tempo de exposição das membranas às forças de 0,1, 0,2 e 0,5 N para a amostra de PVAR ( $v_e = 1,09 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) intumescidas, à temperatura de 25°C.



**Figura 10.10:** Profundidade de penetração versus tempo de exposição das membranas às forças de 0,1, 0,2 e 0,5 N para a amostra de PVAR ( $\nu_e=1,12 \times 10^{-5}$  mol.cm<sup>-3</sup>) intumescidas, à temperatura de 25°C.



**Figura 10.11:** Profundidade de penetração versus tempo de exposição das membranas às forças de 0,1, 0,2 e 0,5 N para a amostra de PVAR ( $\nu_e=1,20 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$ ) intumescidas, à temperatura de 25°C.



**Figura 10.12:** Módulo de Young das membranas intumescidas de PVAR (20°C) em função da densidade de reticulações. O desvio padrão médio é de 18,35 MPa.  $\gamma(\text{PVA})=16,18$  MPa.

### 10.1.4 – Caracterização térmica das membranas

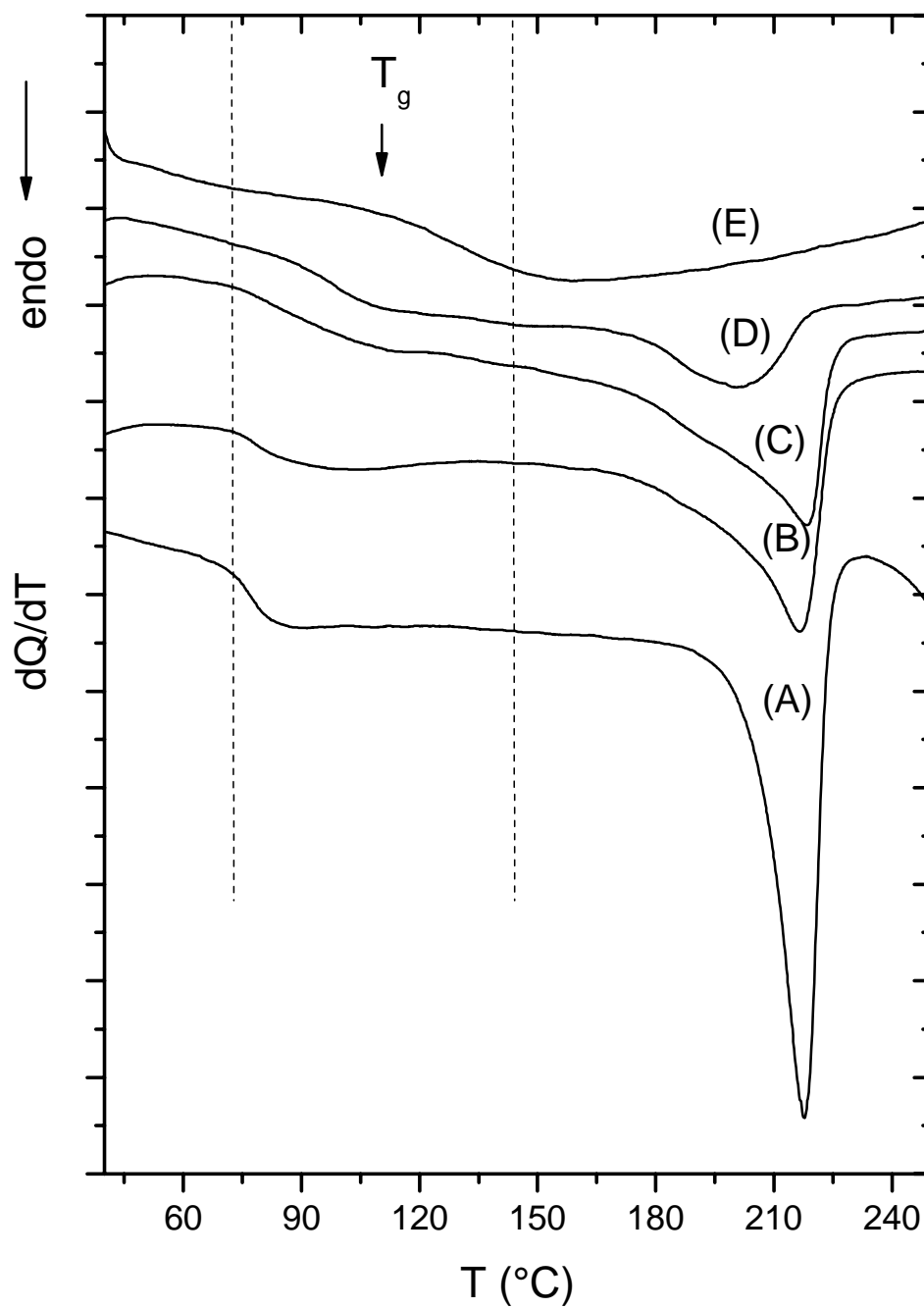
É fato bem conhecido da literatura que o processo de reticulação exerce influencia significativa nas propriedades térmicas de um polímero bem como na temperatura de transição vítrea,  $T_g$ , entalpia de fusão,  $\Delta H_m$ , temperatura de fusão,  $T_m$  e percentual de cristalinidade,  $\chi_c$ .

A Figura 10.13 apresenta o termograma DSC de filmes de PVA com diferentes densidades de reticulações. A partir deste termograma, foi obtido os valores de  $\Delta H_m$  e  $\chi_c$  e  $T_m$ .

A influencia da densidade de reticulações,  $\nu_e$ , nos valores da  $T_g$  e  $T_m$  dos filmes de PVA são apresentados na Figura 10.14. Esta figura não apresenta curvas obtidas por ajuste, mas apenas curvas de tendência. Verifica-se um aumento tanto da  $T_m$  e redução da  $T_g$  com o aumento de  $\nu_e$ , sugerindo a formação de reticulações. O aumento da  $T_m$  pode ser atribuído à diminuição dos graus de liberdade das cadeias devido ao aumento da densidade de reticulações. Em filmes com elevada densidade de reticulações, as cadeias poliméricas não possuem energia suficiente para que ocorra o movimento de translação de moléculas inteiras e os movimentos cooperativos de extensão e contração de segmentos da molécula necessários para que ocorra a  $T_g$ , provocando uma queda brusca no valor da  $T_g$ .

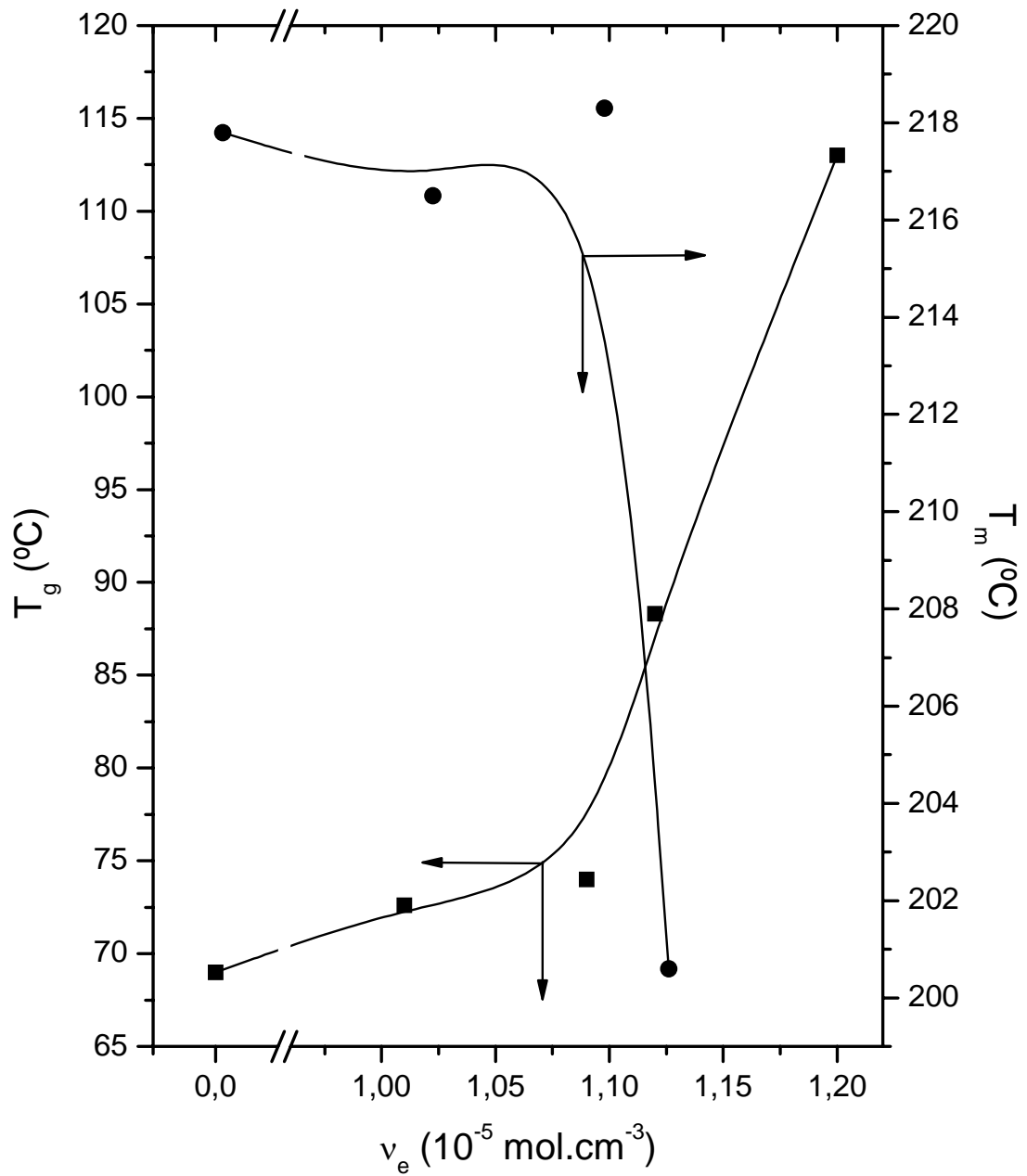
Os valores obtidos para a  $T_g$  e  $T_m$  dos filmes não reticulados de PVA são menores que os valores encontrados na literatura ( $T_g=85$  °C e  $T_m\approx 230$  °C). Isto pode ser atribuído à presença de água nas amostras analisadas, que pode reduzir significativamente o valor da  $T_g$  e  $T_m$ .<sup>6</sup>

A curva de tendência de  $\Delta H_m$  e  $\chi_c$  em função de  $\nu_e$  é apresentada na Figura 10.15. A presença de reticulações impede o alinhamento das cadeias poliméricas necessário à formação de cristalitos, provocando a diminuição da  $\chi_c$  com o aumento da  $\nu_e$ .

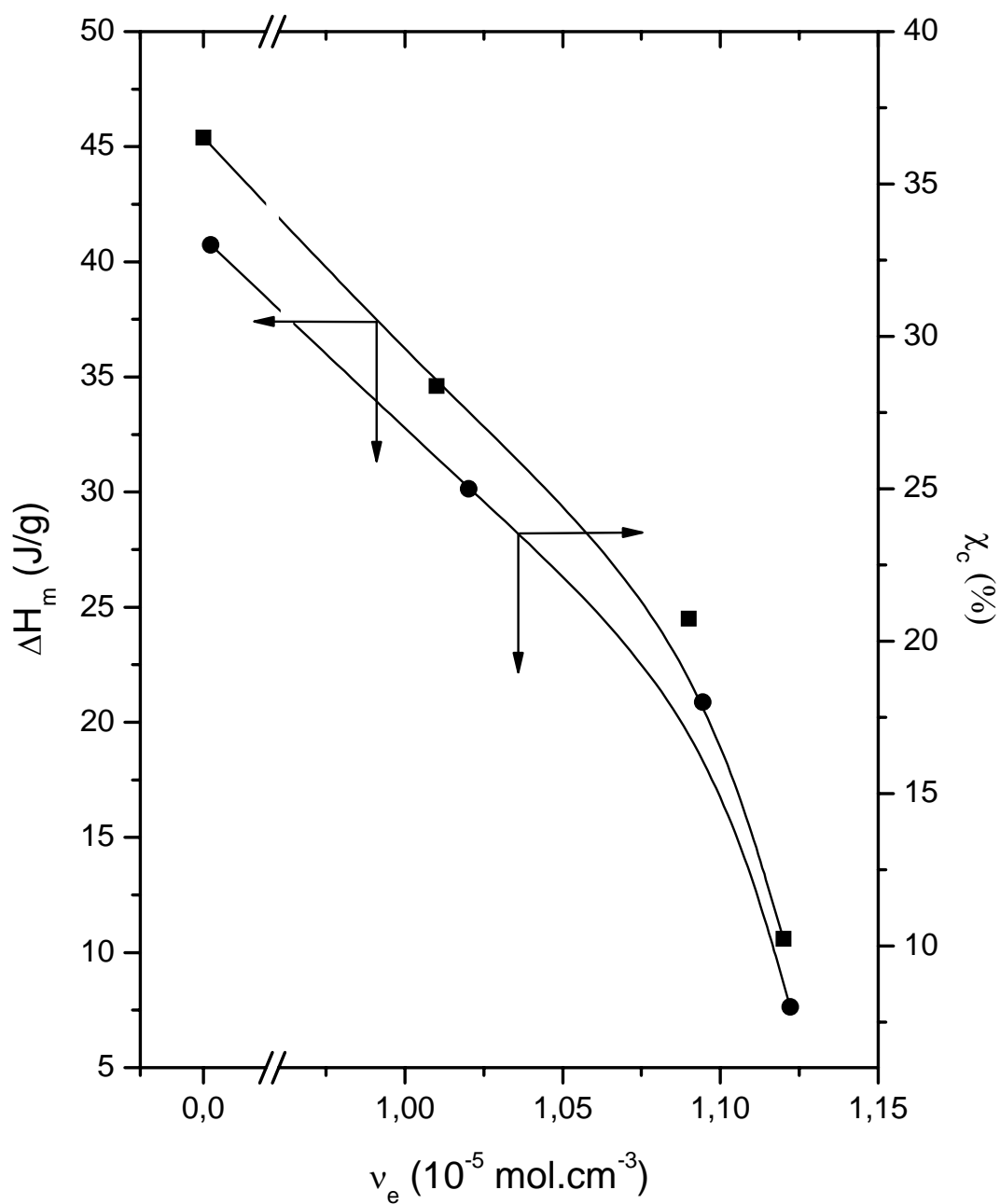


**Figura 10.13:** Termogramas DSC de filmes de PVA (A) e filmes reticulados de PVA:  $\nu_e=1,02 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$  (B),  $\nu_e=1,09 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$  (C),  $\nu_e=1,12 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$  (D),  $\nu_e=1,20 \times 10^{-5} \text{ mol.cm}^{-3}$  (E).





**Figura 10.14:** Dependência da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e da temperatura de fusão ( $T_m$ ) com a densidade de reticulações ( $\nu_e$ ) de membranas de PVA.



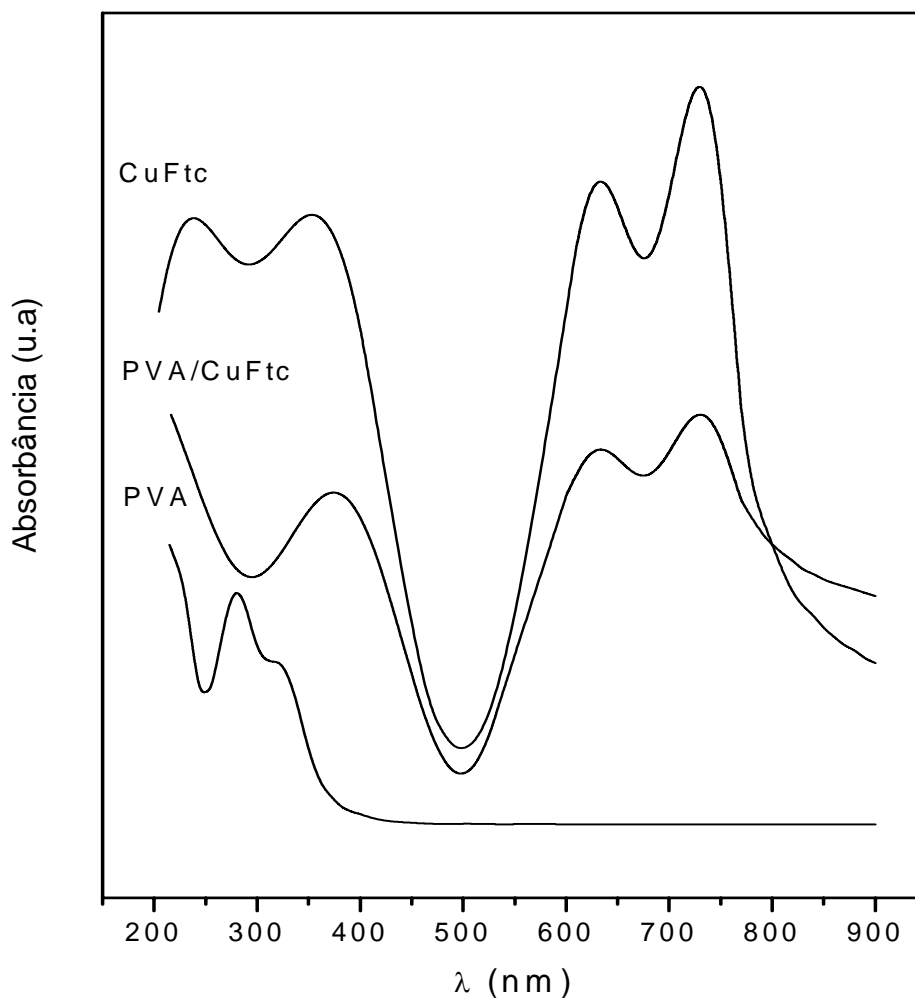
**Figura 10.15:** Dependência da entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ) e porcentual de cristalinidade ( $\chi_c$ ) da densidade de reticulações ( $\nu_e$ ) de membranas de PVA.

### 10.1.5 – Caracterização Espectroscópica (UV/Vis, FTIR)

Neste trabalho o PVA e a Ftc foram utilizados em conjunto como matriz para o biossensor e mediador de elétrons. É possível que ocorra uma interação entre essas duas moléculas, formando um complexo de transferência de carga (CTC) entre elas. A formação de CTC pode contribuir para as propriedades elétricas do material. Para verificar se ocorreu a formação de CTC entre PVA e Ftc, foram feitas a espectroscopia UV/Vis e FTIR de filmes de PVA/Ftc.

A Figura 10.16 apresenta os espectros eletrônicos obtidos de filmes de PVA, Ftc e PVA/Ftc. O espectro da Ftc se origina do sistema aromático de orbitais com elétrons  $18\pi$  e da superposição de órbitas no átomo central de cobre. O sistema  $\pi$  conjugado leva a uma intensa absorção na região do visível. Os picos podem ser atribuídos a transições diretas entre bandas do tipo  $\pi-\pi^*$ . O espectro do PVA apresenta duas bandas de absorção em 280 nm e 318 nm. A banda de absorção na região de 280 nm pode ser relacionada a transições do tipo  $\pi-\pi^*$  devido a ligações insaturadas, como grupos carbonila de alta absorção na região do UV nas extremidades da cadeia.<sup>5,7</sup> A banda de absorção em torno de 318 nm pode estar relacionada a transições do tipo  $\pi-\pi^*$  nos grupos OH das cadeias de PVA.

O espectro de absorção dos filmes de PVA/Ftc possui um máximo a 380 nm e esta banda pode ser associada à forma de coordenação das moléculas de Ftc na matriz de PVA. Este espectro sugere a formação de um complexo de transferência de cargas. Assumindo a formação deste complexo, os possíveis sítios de ligação são os grupos OH nas moléculas de PVA e os átomos de nitrogênio situados nos anéis aromáticos da Ftc. Esta interação deve ser qualitativamente similar à protonação, pois os grupos OH nas moléculas de PVA aparentam possuir um forte caráter aceitador de elétrons e neste caso é esperado um deslocamento no espectro UV/Vis do PVA, conduzindo a um aumento na ordem da ligação C-O nas cadeias de PVA.



**Figura 10.16:** Espectro UV/Vis de soluções aquosas de Ftc, PVA e PVA/Ftc a temperatura de 25 °C.

O espectro vibracional FTIR pode oferecer informações valiosas a respeito das interações entre o mediador (Ftc) e a matriz polimérica. Neste trabalho foram estudados o espectro infravermelho (FTIR) de filmes de PVA, Ftc e PVA/Ftc com concentrações de Ftc de 30, 17 e 5 m/m%. Os espectros FTIR foram obtidos a temperatura ambiente (25 °C).

Lembrando-se que o PVA é um copolímero composto de PVA e PVAc, a estrutura do PVA apresenta três diferentes tipos de ligações C-H: metil, metileno, e meteno. Cada um desses tipos possui bandas de absorção características. Uma análise do espectro FTIR do PVA (Figuras 10.17 e 10.18 - A) revela bandas de absorção típicas do estiramento da ligação C-H em agrupamento metileno na região próxima a 2924 e

2853  $\text{cm}^{-1}$ . Bandas típicas do estiramento da ligação C-H de agrupamentos metil são observadas na região de 2964, 1451 e 1372  $\text{cm}^{-1}$ . Bandas características da deformação angular da ligação C-H em agrupamentos metileno e meteno são observadas respectivamente na região de 1451 e 2900  $\text{cm}^{-1}$ . Na região de 1141 observam-se bandas características das ligações C-C do esqueleto central da cadeia de PVA. As bandas características das ligações O-H encontram-se na região de 720 a 590  $\text{cm}^{-1}$ . Na região de 870 a 1100  $\text{cm}^{-1}$  localizam-se as bandas de forte absorção, características do estiramento da ligação C-O associada a álcool secundário.<sup>8-11</sup>

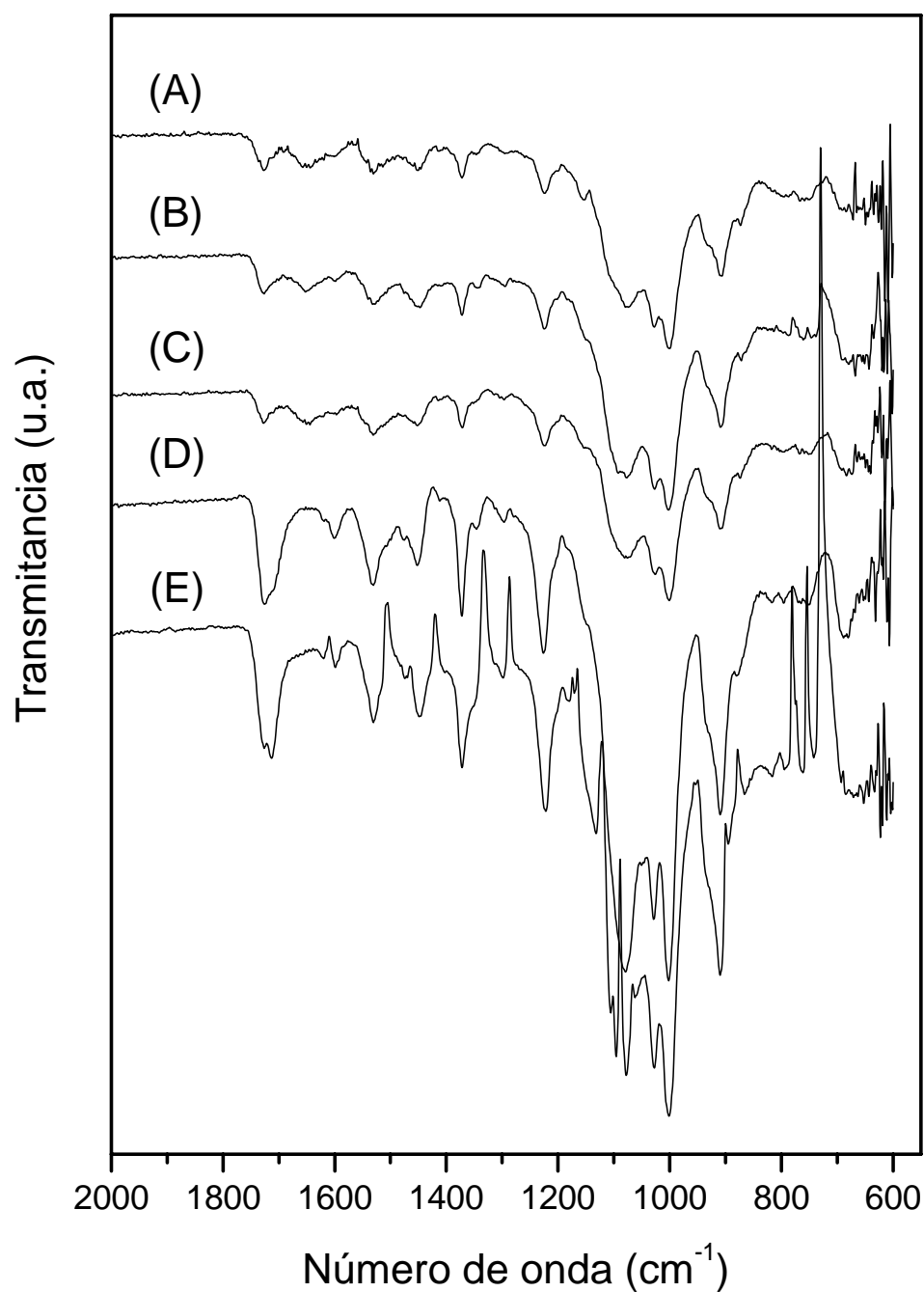
A análise do espectro FTIR da Ftc (Figuras 10.17 e 10.18 - E) revela bandas de absorção características das ligações C-C dos anéis aromáticos mais externos da molécula nas regiões de 1530, 1408, 1299, 1000, 793 e 643  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas relativas às ligações C-H situam-se nas regiões de 2870, 1190, 1152, 1105-1000 e 945  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas situadas nas regiões de 1472, 895 e 760  $\text{cm}^{-1}$  estão relacionadas às ligações C-N-C. Em 643  $\text{cm}^{-1}$  localiza-se a banda característica das ligações N-Cu-N.<sup>8,9,12</sup>

Observando-se o espectro FTIR dos filmes de PVA/Ftc, percebe-se o deslocamento de algumas bandas relacionadas às ligações C-H do PVA e da Ftc: a banda situada em 2925  $\text{cm}^{-1}$  sofreu um deslocamento para 2929  $\text{cm}^{-1}$  na amostra de Ftc 30 m/m%, e foi decomposto em dois picos a 2928 e 2921  $\text{cm}^{-1}$  na amostra 17 m/m%; os picos situados em 2870  $\text{cm}^{-1}$  no espectro da Ftc e 2853 na amostra de PVA sofreram deslocamento para 2868  $\text{cm}^{-1}$  na amostra 30 m/m%, 2858  $\text{cm}^{-1}$  na 17 m/m% e foi decomposto em três bandas situadas em 2857, 2869 e 2883  $\text{cm}^{-1}$  na amostra 5 m/m%. As bandas relacionadas à ligação C-H da Ftc situadas em 1105, 1095 e 1078  $\text{cm}^{-1}$  e a banda relacionada à ligação C-O do PVA situada em 1073  $\text{cm}^{-1}$  integradas em uma única banca localizada em 1078  $\text{cm}^{-1}$  na amostra 30 m/m%, 1076 nas amostra 17 e 5 m/m%. A banda característica da ligação C-N-C da Ftc, situada a 895 sofreu um deslocamento para 879, 875 e 872  $\text{cm}^{-1}$  nas amostras de 30, 17 e 5 m/m% respectivamente.

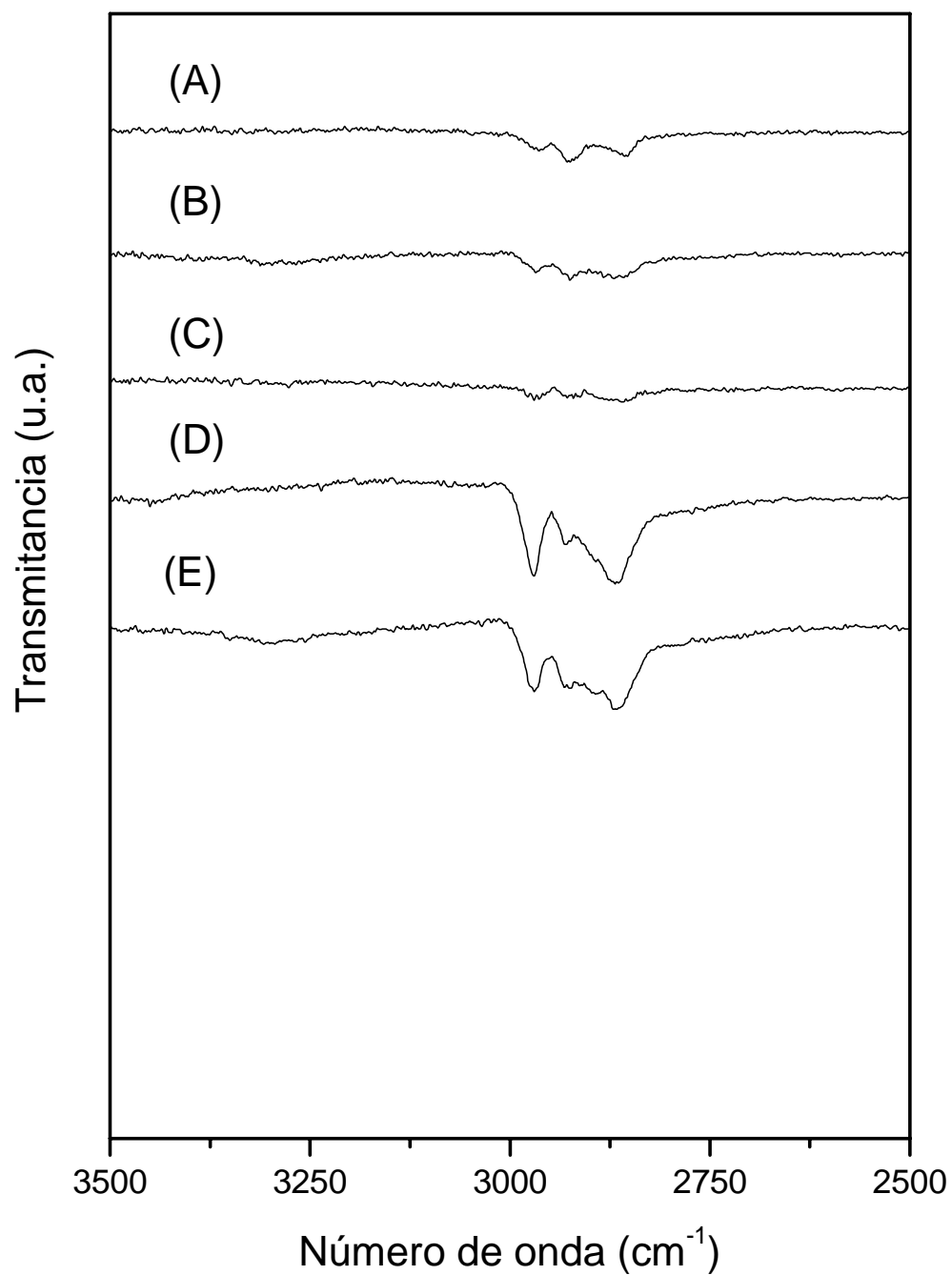
Os deslocamentos de bandas observadas nos espectros dos filmes de PVA/Ftc sugerem a ocorrência de uma interação entre as duas moléculas, formando um complexo de transferência de cargas. Considerando a formação desse complexo, os possíveis sítios de interação entre as duas moléculas são os átomos de H e N da Ftc com os agrupamentos hidroxilas do PVA.

A formação de CTC entre o mediador de elétrons Ftc e o PVA pode ser analisada utilizando a modelagem molecular. Esta análise é importante para a

compreensão do mecanismo de formação do complexo e como auxílio na interpretação dos resultados experimentais. A seguir, serão discutidos os principais resultados obtidos neste trabalho.



**Figura 10.17:** Espectro infravermelho na região de  $600 \text{ cm}^{-1}$  a  $2000 \text{ cm}^{-1}$  de filmes de PVA (A), PVA/Ftc 5 m/m% (B), PVA/Ftc 17 m/m% (C), PVA/Ftc 30 m/m% (D) e Ftc (E).



**Figura 10.18:** Espectro infravermelho na região de  $3500 \text{ cm}^{-1}$  a  $2500 \text{ cm}^{-1}$  de filmes de PVA (A), PVA/Ftc 5 m/m% (B), PVA/Ftc 17 m/m% (C), PVA/Ftc 30 m/m% (D) e Ftc (E).

## 10.2 - Modelagem molecular do sistema PVA/Ftc

Para melhorar a compreensão do mecanismo de condução nos filmes de PVA/Ftc e de seu espectro infravermelho, a interação entre as moléculas de PVA e Ftc foi investigada através de modelagem molecular. Os cálculos foram realizados de acordo com o método semi-empírico PM3-d, utilizando o software Spartan em um computador Pentium 4 de 2.2 GHz, 1 Gb de memória com o sistema operacional Linux.

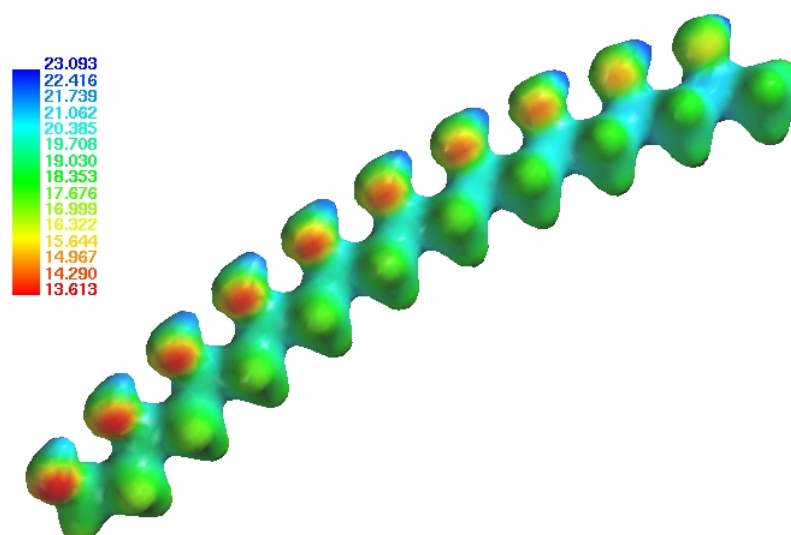
Foram obtidos parâmetros relacionados à estrutura eletrônica das referidas moléculas, como isosuperfícies de densidade eletrônica e potencial de ionização, potencial eletrostático e orbitais moleculares HOMO e LUMO

A superfície de isodensidade de elétrons reflete a forma e o tamanho de uma molécula através de sua nuvem eletrônica. Esta superfície nos revela se realmente existe uma ligação química entre todos os átomos de uma molécula. O potencial de ionização mostra a facilidade de remoção de um elétron de uma região da molécula.

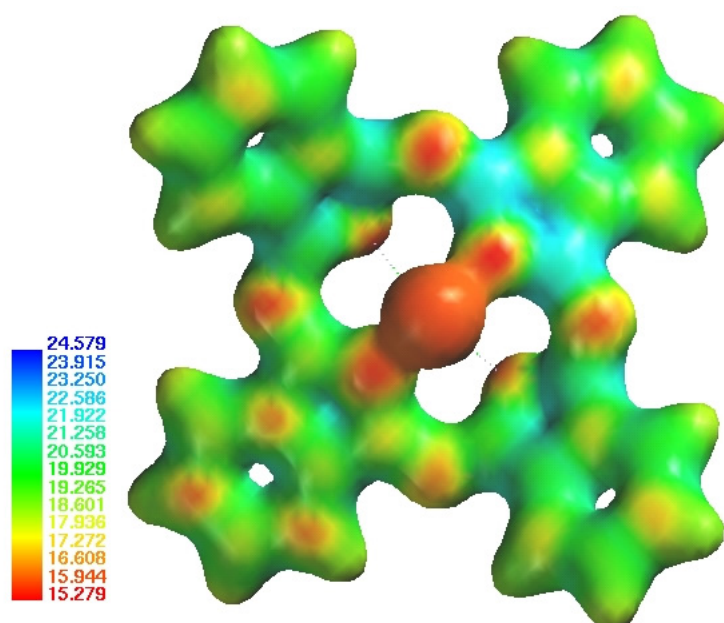
As Figuras 10.19 a 10.21 apresentam o potencial de ionização mapeado em uma superfície de isodensidade eletrônica para as moléculas de PVA, Ftc e para o complexo PVA/Ftc. Nessas figuras, as cores próximas ao azul mostram regiões de alto potencial de ionização enquanto as cores próximas ao vermelho mostram regiões de baixo potencial de ionização. O mapa de potencial de ionização para a molécula de PVA (Figura 10.19) mostra baixos valores de potencial de ionização na região dos agrupamentos OH e altos valores ao longo da base da cadeia. Para a molécula de Ftc (Figura 10.20), o mapa mostra baixos potenciais de ionização na região do átomo metálico central e dos átomos de nitrogênio da molécula.

A Figura 10.21 apresenta o mapa de potencial de ionização para o sistema PVA/Ftc. Para produzir este mapa, a posição escolhida para a molécula de Ftc foi a região central da cadeia de PVA. Observa-se altos valores de potencial de ionização na região das ligações N-C=N e das ligações C-H na periferia da molécula de Ftc, e na cadeia carbônica central da molécula de PVA. Este mapa revela uma interação entre os grupos OH do PVA (baixo potencial de ionização) com a e a região das ligações C-N-C e das ligações C-H da periferia da molécula de Ftc (alto potencial de ionização), sugerindo a formação de um complexo de transferência de carga através da sobreposição dos orbitais  $\pi$  das moléculas de PVA e CuPhc.

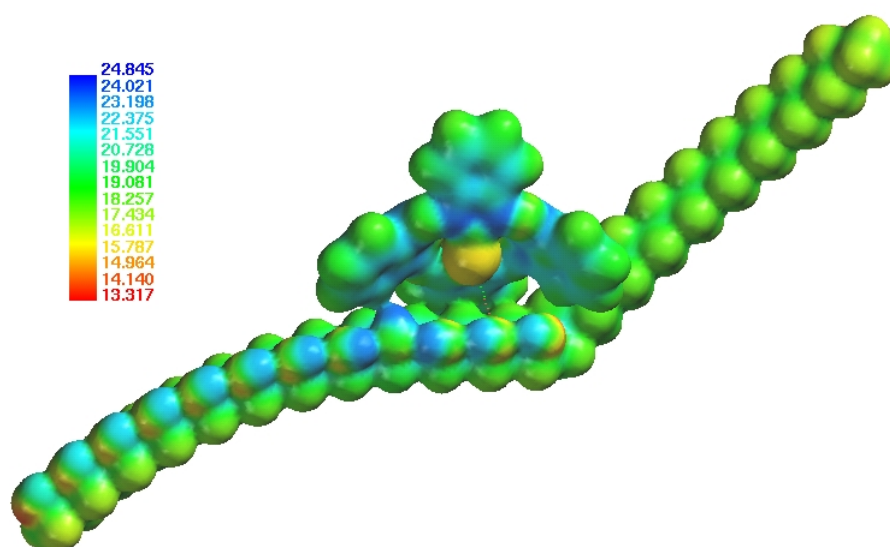




**Figura 10.19:** Potencial de ionização mapeado numa superfície de isodensidade eletrônica para o PVA.

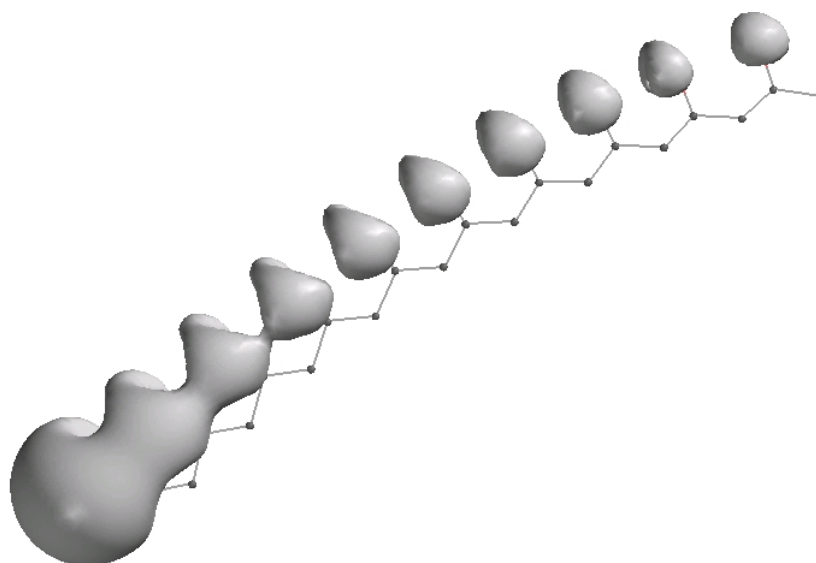


**Figura 10.20:** Potencial de ionização mapeado numa superfície de isodensidade eletrônica para a Ftc.

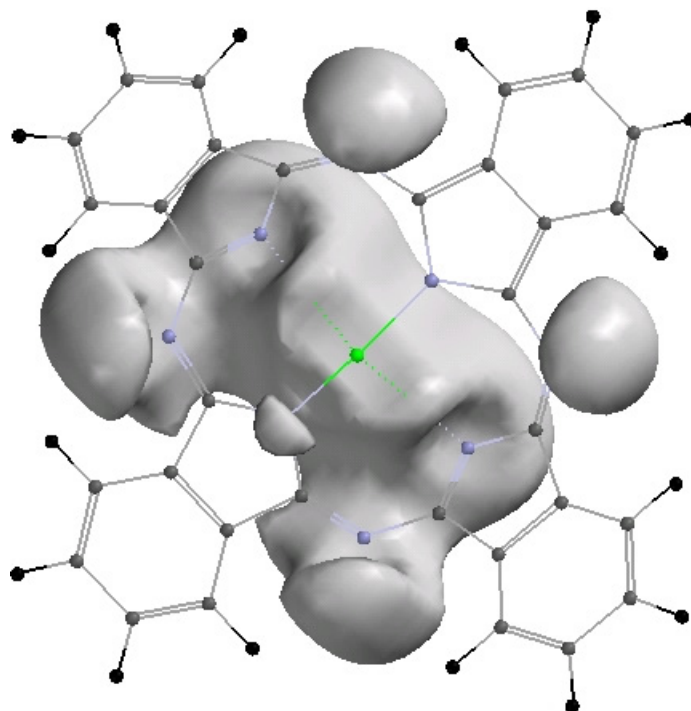


**Figura 10.21:** Potencial de ionização mapeado numa superfície de isodensidade eletrônica para o sistema PVA/Ftc.

O mapa de potencial eletrostático (MEP) reflete a localização dos elétrons  $\pi$  de uma molécula. As Figuras 10.22 e 10.23 mostram o MEP para as moléculas de PVA e de Ftc. O MEP para a molécula de PVA (Figura 10.22) revela uma grande concentração de carga em torno dos grupos OH. O mapa para a molécula de Ftc (Figura 10.23) mostra uma grande concentração de cargas em torno dos átomos de N e do átomo de Cu central.



**Figura 10.22:** Superfície de potencial eletrostático para o PVA.



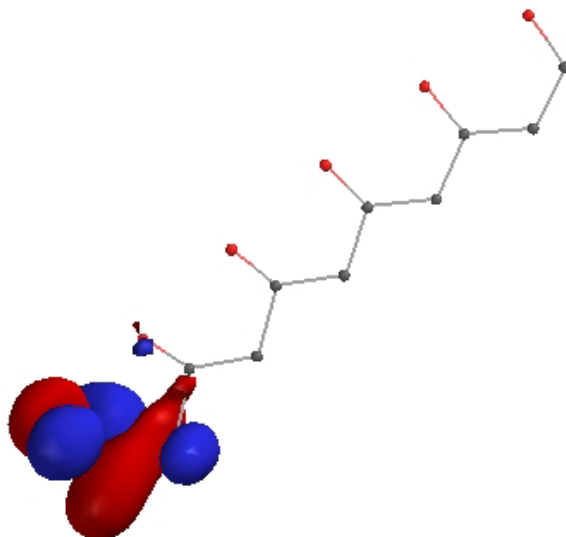
**Figura 10.23:** Superfície de potencial eletrostático para a Ftc.

Os orbitais moleculares HOMO e LUMO são de particular interesse, já que estão intimamente relacionados com a condutividade elétrica do material. Estes orbitais são também importantes por serem envolvidos em reações químicas, já que os elétrons que podem ser doados se localizam no orbital HOMO.

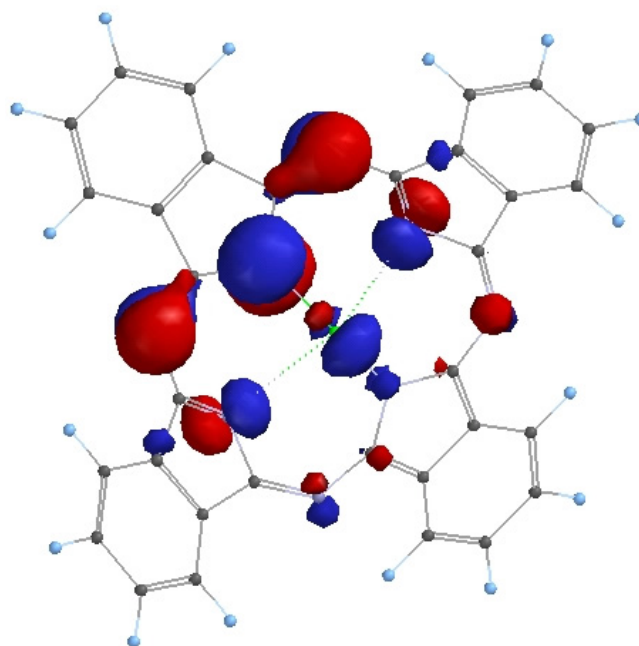
A superfície dos orbitais moleculares podem se estender sobre um ou mais átomos. Superfícies de orbitais moleculares restritas a apenas um átomo são chamadas de orbitais não ligante, enquanto superfícies que se estendem sobre a região de ligação de átomos vizinhos são chamadas orbitais ligante. A adição de elétrons em um orbital não ligante enfraquece a ligação, aumentando sua distância, enquanto a remoção de elétrons deste orbital provoca o efeito oposto. A adição de elétrons em um orbital ligante, a ligação entre os átomos irão se fortalecer, diminuindo a distância de ligação. A remoção de elétrons causa o efeito oposto.

As Figuras 10.24 a 10.26 apresentam o orbital HOMO para as moléculas de PVA e Ftc e para o sistema PVA/Ftc. A superfície de cor vermelha indica a parte negativa da função de onda e a de cor azul, a parte positiva. Na molécula de PVA, o orbital HOMO se concentra na região das ligações C=O e/ou C=C na extremidade da cadeia (Figura 10.24). Na molécula de Ftc, o orbital HOMO se localiza em torno dos

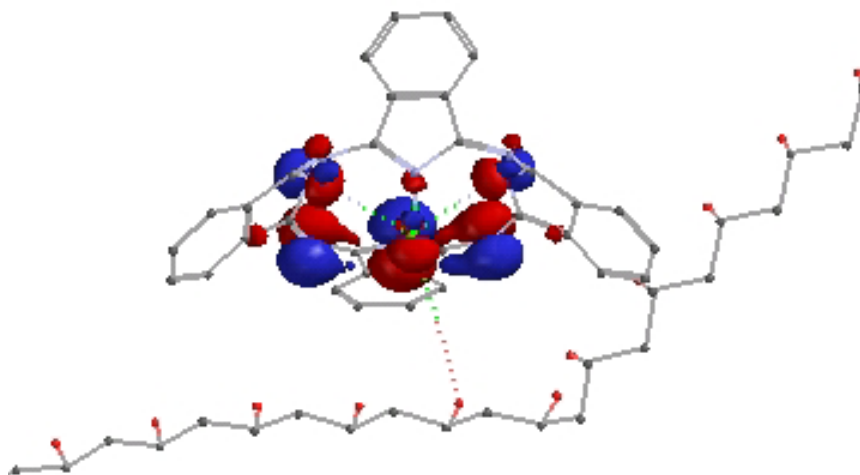
átomos de N e do átomo de Cu central. O tipo de orbital predominante é o não ligante, sendo que existem orbitais ligante apenas em torno de ligações C=N. No sistema PVA/Ftc, o orbital HOMO se localiza apenas sobre a molécula de Ftc, de forma similar a molécula de Ftc isolada.



**Figura 10.24:** Superfície do orbital HOMO para o PVA

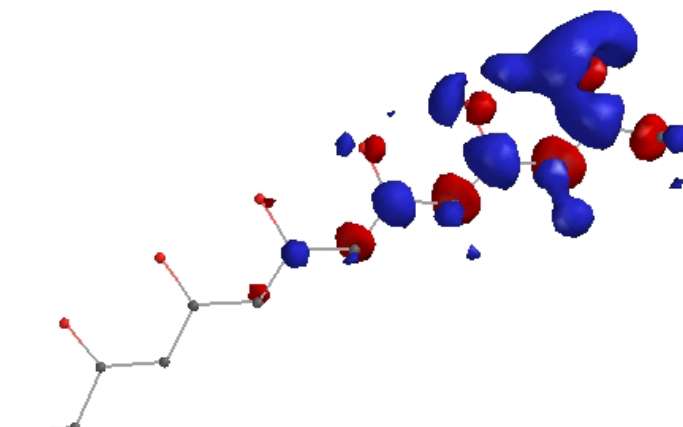


**Figura 10.25:** Superfície do orbital HOMO para a Ftc.

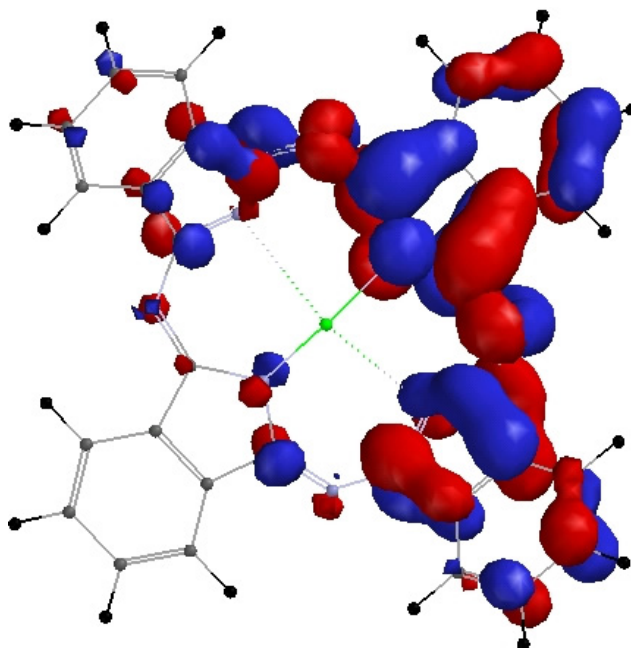


**Figura 10.26:** Superfície do orbital HOMO para o sistema PVA/Ftc.

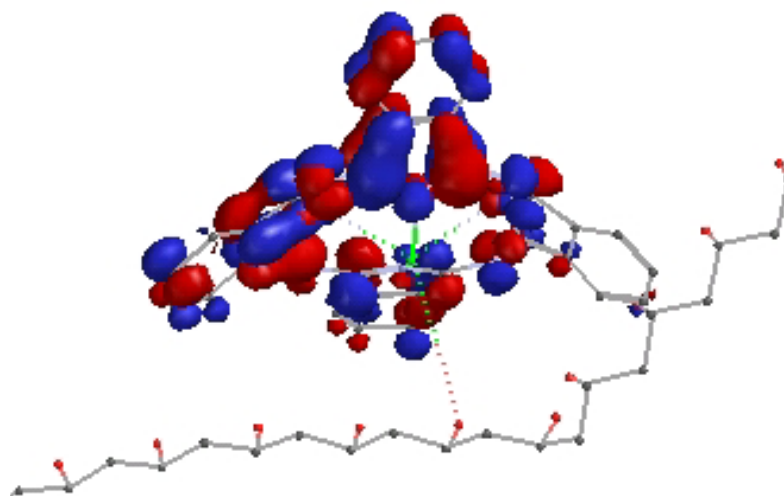
As Figuras 10.27 a 10.29 apresentam os orbitais LUMO para as moléculas de PVA, Ftc e para o sistema PVA/Ftc. A superfície de cor vermelha indica a parte negativa da função de onda e a de cor azul, a parte positiva. Para a molécula de PVA, o orbital LUMO se localiza na extremidade oposta ao orbital HOMO. Nesta molécula, o orbital LUMO se concentra em torno dos agrupamentos hidroxilas e dos átomos de carbono da cadeia central. Para a molécula de Ftc, o orbital LUMO se localiza em torno dos átomos de carbono. Os orbitais ligantes predominam em torno das ligações C=C. Para o sistema PVC/Ftc, os orbitais LUMO se localizam apenas sobre a molécula de Ftc, se distribuindo da mesma forma que a molécula de Ftc isolada.



**Figura 10.27:** Superfície do orbital LUMO para o PVA.



**Figura 10.28:** Superfície do orbital LUMO para a Ftc.



**Figura 10.29:** Superfície do orbital LUMO para o sistema PVA/Ftc.

A Tabela 10.2 mostra os valores do calor de formação  $\Delta H_f$ , orbitais HOMO, LUMO e largura da banda proibida,  $\Delta E$ , para as moléculas de PVA, Ftc e PVA/Ftc. As moléculas de PVA foram modeladas com grau de polimerização igual a 20. O calor de formação da molécula de Ftc é exotérmico e o do PVA e PVA/Ftc é

endotérmico. O sistema PVA/Ftc possui o menor calor de formação, indicando que este sistema é mais estável termodinamicamente que as outras moléculas. O valor calculado da energia da banda proibida do PVA é maior que a energia da banda proibida da Ftc, sugerindo que o PVA possui menor condutividade elétrica que a Ftc. O sistema PVA/Ftc possui menor valor de  $\Delta E$  que o PVA, mostrando que a molécula de Ftc pode promover o aumento da condutividade em filmes de PVA.

O aumento da condutividade da matriz causa um efeito positivo no biossensor, pois facilita o escoamento, para o eletrodo, dos elétrons gerados pela oxidação do peróxido de hidrogênio pelo mediador. Desta forma, espera-se um aumento na corrente gerada pelo dispositivo quando em funcionamento, o que pode aumentar a sensibilidade do biossensor.

**Tabela 10.2:** Energias do calor de formação  $\Delta H_f$ , orbitais HOMO e LUMO e largura da banda proibida,  $\Delta E$ , para as moléculas de PVA, Ftc e PVA/Ftc, calculados pelo método PM3-d.

Molécula	$\Delta H_f$ (Kcal/mol)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	$\Delta E$ (eV)
Ftc	297,753	-8,292	-1,347	6,945
PVA	-521,627	-10,211	-2,178	8,033
PVA/Ftc	-789,308	-8,650	-1,681	6,961

### 10.3 – Caracterização elétrica do biossensor

A caracterização espectroscópica e a modelagem molecular mostraram que ocorre a formação de um CTC entre a matriz de PVA e o mediador de elétrons Ftc. A formação desse complexo pode exercer grande influência nas propriedades elétricas dos filmes de PVA/Ftc. Por sua vez, as propriedades elétricas da matriz do biossensor influenciam em seu desempenho, determinando a ordem de grandeza do sinal obtido e influenciando na sensibilidade do biossensor.

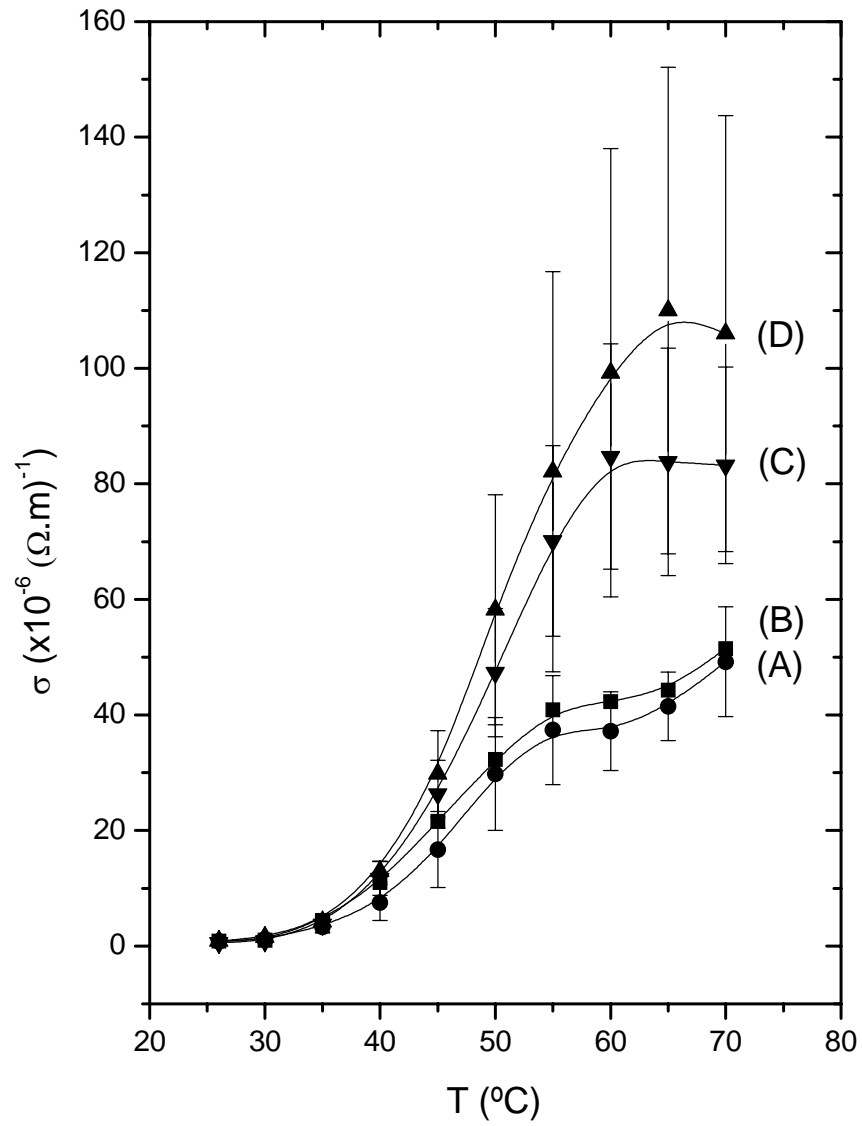
A Figura 10.30 apresenta a curva de tendência da condutividade elétrica de filmes de PVA/Ftc em função da temperatura. Observou-se um aumento exponencial

da condutividade com o aumento da temperatura. As amostras com maior concentração de Ftc apresentaram maior condutividade elétrica. A curva de tendência apresentada pela Figura 10.31 mostra a variação da condutividade em função da concentração de Ftc para membranas de PVA/Ftc a diferentes temperaturas. Foi observado um grande aumento da condutividade com o aumento da temperatura e da concentração de Ftc. Estes resultados indicam que a condutividade dos filmes de PVA/Ftc pode ser classificada como por saltos termicamente ativados de estados localizados para estados estendidos na banda de valência. Os buracos deixados podem contribuir para a condução através de saltos entre estados localizados. O mecanismo de condução nesse material pode então ser descrito pelo modelo de condução por saltos, onde  $\sigma \propto \exp(T_0/T)^\alpha$ . As membranas de PVA e PVA/Ftc com 5 m/m% de Ftc, apresentaram valores de  $\alpha = 0,25$ , indicando a predominância do mecanismo de saltos de alcance variado (mecanismo de Mott). As membranas de PVA/Ftc com 17 e 30 m/m% de Ftc apresentaram valores de  $\alpha = 0,50$ , indicando a predominância do mecanismo de saltos entre vizinhos mais próximos (mecanismo de Efros).

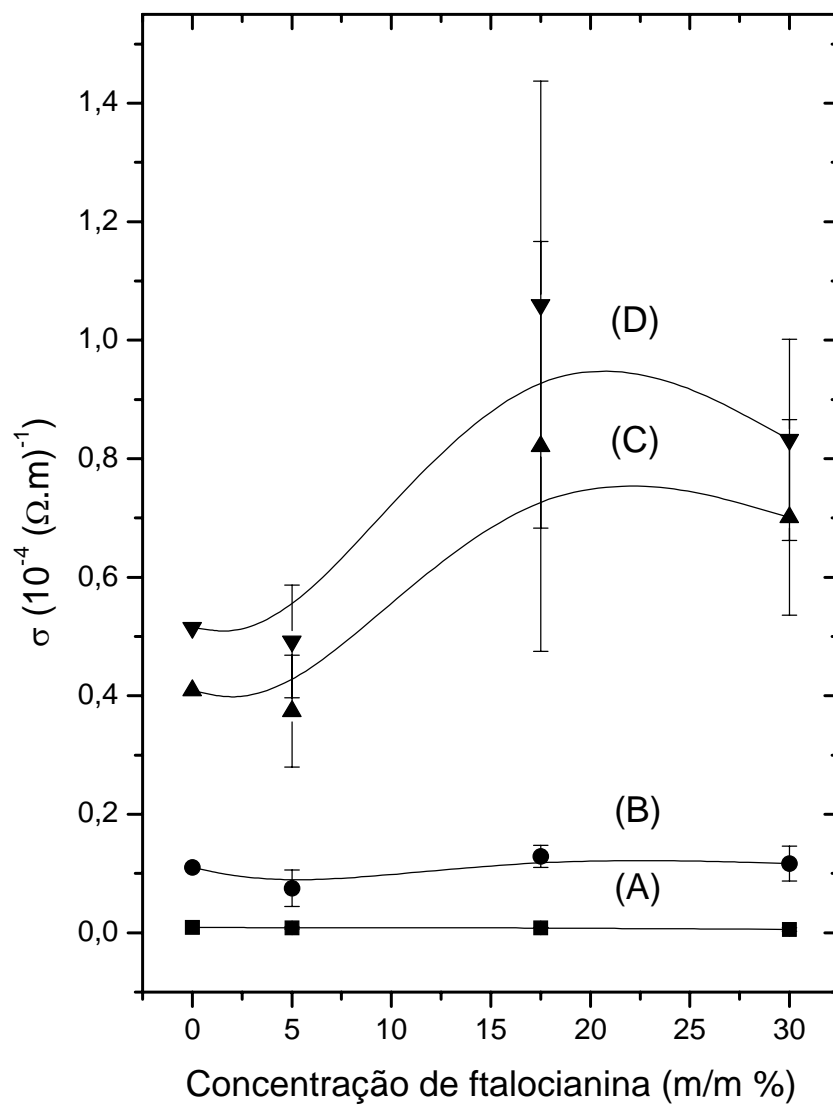
A Figura 10.32, mostra a dependência da energia de ativação com a concentração de Ftc dos filmes estudados. Houve um grande aumento de  $\Delta E$  com o aumento da concentração de ftalocianina.

Apesar do mecanismo de Mott exigir menor energia de ativação, a maior distância entre os saltos leva à menor probabilidade de tunelamento, ou seja, à menor probabilidade de ocorrência do salto (Equação 7.4). Em consequência, tipicamente, o mecanismo de Mott se manifesta em materiais com menor condutividade do que os materiais onde se manifestam tipicamente o mecanismo de Efros, como ocorreu nas membranas de PVA/Ftc.

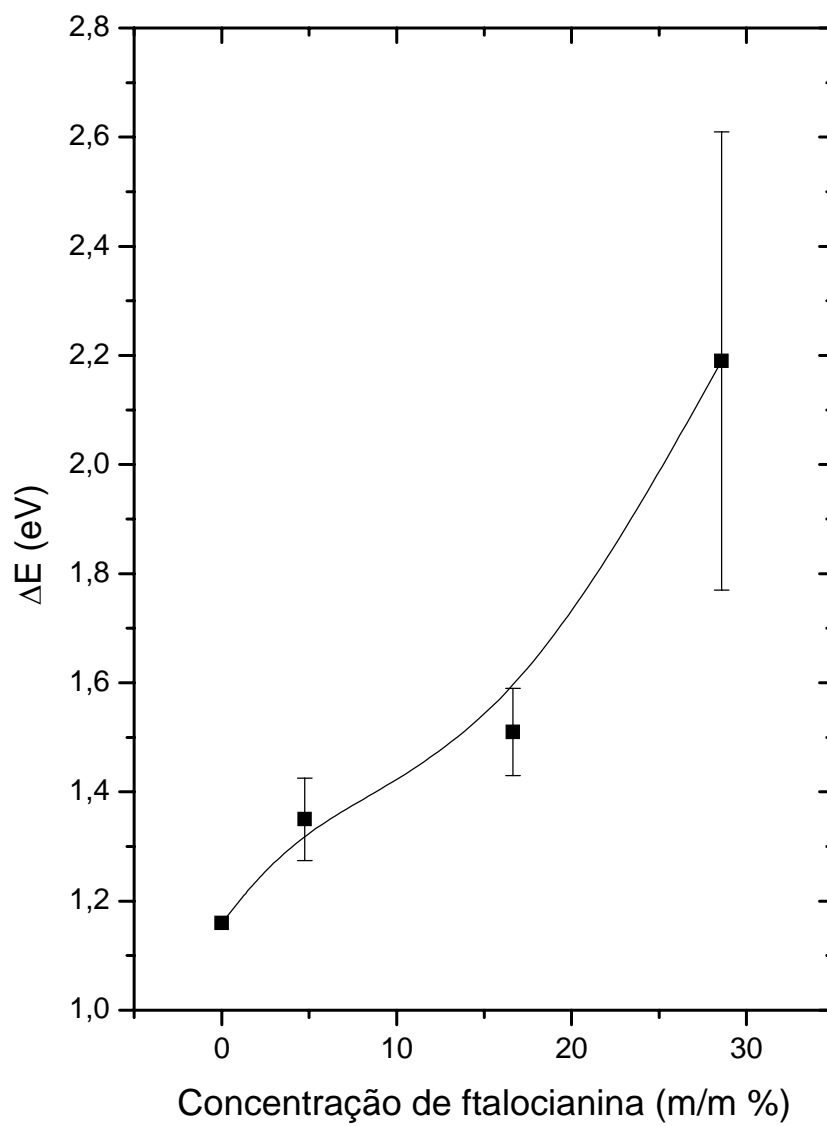




**Figura 10.30:** Dependência de  $\sigma$  com a temperatura, de filmes de PVA/Ftc com diferentes concentrações: 5 m/m % (A), 0 m/m % (B), 40 m/m % (C), 20 m/m % (D).



**Figura 10.31:** Dependência de  $\sigma$  com a concentração de FtC, de filmes de PVA/FtC a diferentes temperaturas: 26°C (A), 40°C (B), 55°C (C), 70°C (D).



**Figura 10.32:** Dependência de  $\Delta E$  com a concentração de ftalocianina de filmes de PVA/Ftc.

## 10.4 – Conclusões parciais

Os principais resultados obtidos com relação a caracterização da matriz polimérica do biossensor são: i) A reticulação das membranas de PVA levou à formação de poros, o que pode melhorar a estabilidade da enzima ocluída e facilitar a difusão do analito no biossensor; ii) A capacidade de sorção de água das membranas de PVA aumenta com o aumento da temperatura e diminui com o aumento da densidade de reticulações. iii) O módulo de Young das membranas cresceu linearmente com a densidade de reticulações; iv) O grau de cristalinidade diminuiu e a temperatura de transição vítrea aumentou com o aumento da densidade de reticulações; v) A caracterização espectroscópica do sistema PVA/Ftc mostrou que ocorre a formação de um CTC entre as moléculas de PVA e Ftc. Este resultado foi confirmado através da modelagem molecular deste sistema; vi) A Ftc aumentou a condutividade elétrica da matriz (PVA) do biossensor. Este resultado pode ser atribuído à formação do CTC. O mecanismo de condução do sistema PVA/Ftc pode ser classificado com o mecanismo de saltos termicamente ativado, predominando o mecanismo de Mott para baixas concentrações de Ftc e o mecanismo de Efros para concentrações maiores de Ftc.

Estes resultados mostram que membranas de PVA/Ftc reticuladas com  $H_3BO_3$  possuem características físico-químicas que garantem boa funcionalidade e estabilidade quanto à sua utilização no projeto de biossensores clínicos.

## 10.4 – Referências bibliográficas

1. Hussain, M. A.; Rahman, M. S.; Ng, C. W. Prediction of pores formation (porosity) in foods during drying: generic models by the use of hybrid neural network. *Journal of Food Engineering*. 51, 239-248, 2002.
2. Neogi, P. Mechanism of pore formation in reverse osmosis membranes during the casting process. *AIChE Journal*. 29 (3), 402-410, 2004.
3. Hatakeyema, T.; Yamauchi, A. Studies on bound water in poly(vinyl alcohol). Hydrogel by DSC and FT-NMR. *European Polymer Journal*. 20 (1), 61-64, 1984.
4. Martínez, P.; Azuaya, M. *Medición del módulo de elasticidad de Young*. Disponível em: <[http://www.fisicarecreativa.com/informes/infor\\_mecanica/young97.pdf](http://www.fisicarecreativa.com/informes/infor_mecanica/young97.pdf)>. Acesso em 14 junho 2006.

5. El-Kader, K. A. M.A.; Hamied, S. F. A.; Monsour, A. B. El-Lawindy, A. M. Y. Effect of the molecular weights on the optical and mechanical properties of poly(vinyl alcohol) films. *Polymer Testing*. 21, 847-850, 2002.
6. Hassan, C. M.; Peppas, N. A. Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods. *Advances in Polymer Science*. 153, 37-65, 2000.
7. Mallapragada, S. K.; Peppas, N. A. Dissolution Mechanism of Semicrystalline Poly(vinyl alcohol) in Water. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*. 34, 1339-1346, 1996.
8. Coates, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. R.A. Meyers. 10815-10837. Chichester: John Wiley & Sons, 2000.
9. Lopes, W. A.; Fascio, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. *Química Nova*. 27 (4), 670-673, 2004.
10. Jayasekara, R.; Harding, I.; Bowater, I.; Christie, G. B. Y.; Lonergan, G. T. Preparation, surface modification and characterization of solution cast starch PVA blend films. *Polymer Testing*. 23, 17-27, 2004.
11. Sudhamani, S. R.; Prasad, M. S.; Sankar, K. U. DSC and FTIR studies on gellan and polyvinyl alcohol (PVA) blend films. *Food Hydrocolloids*. 17, 245-250, 2003.
12. Li, D.; Peng, Z.; Deng, L.; Shen, Y.; Zhou, Y. Theoretical studies on molecular structure and vibrational spectra of copper phthalocyanine. *Vibrational Spectroscopy*. 39, 191-199, 2005.

## CAPÍTULO 11 – ANÁLISE DA PERFORMANCE DO BIOSENSOR

---

### 11.1 – Análise da performance

O biossensor para colesterol foi analisado através de ensaios *in vitro* com soluções de colesterol de concentrações entre 0 mM e 5,17 mM. A medida da resposta do biossensor foi feita em um multímetro Keithley modelo K-237, lendo-se a corrente gerada pelo dispositivo em função do tempo.

A Figura 11.1 mostra o sinal obtido pelo sensor para uma concentração de colesterol de 1,3 mM. O biossensor apresentou um sinal na ordem de nA, com vários picos de corrente ao longo do tempo. O sensor, para as demais concentrações, apresentou um sinal de forma equivalente. A ordem de grandeza do sinal apresentado é a mesma dos biossensores comerciais já existentes no mercado.

Para a construção da curva de calibração do biossensor, foi utilizada a média dos três picos de corrente mais elevados no intervalo de 0 s a 12 s, produzidos a partir da reação bioquímica. A Figura 11.2 mostra a curva de calibração do sensor, onde cada ponto representa a média do resultado obtido de quatro diferentes sensores. Observou-se uma boa linearidade ( $R^2=0,96$ ) para concentrações de colesterol entre 0 e 5,17 mM. Neste caso, a concentração de colesterol pode ser determinada através da seguinte relação:

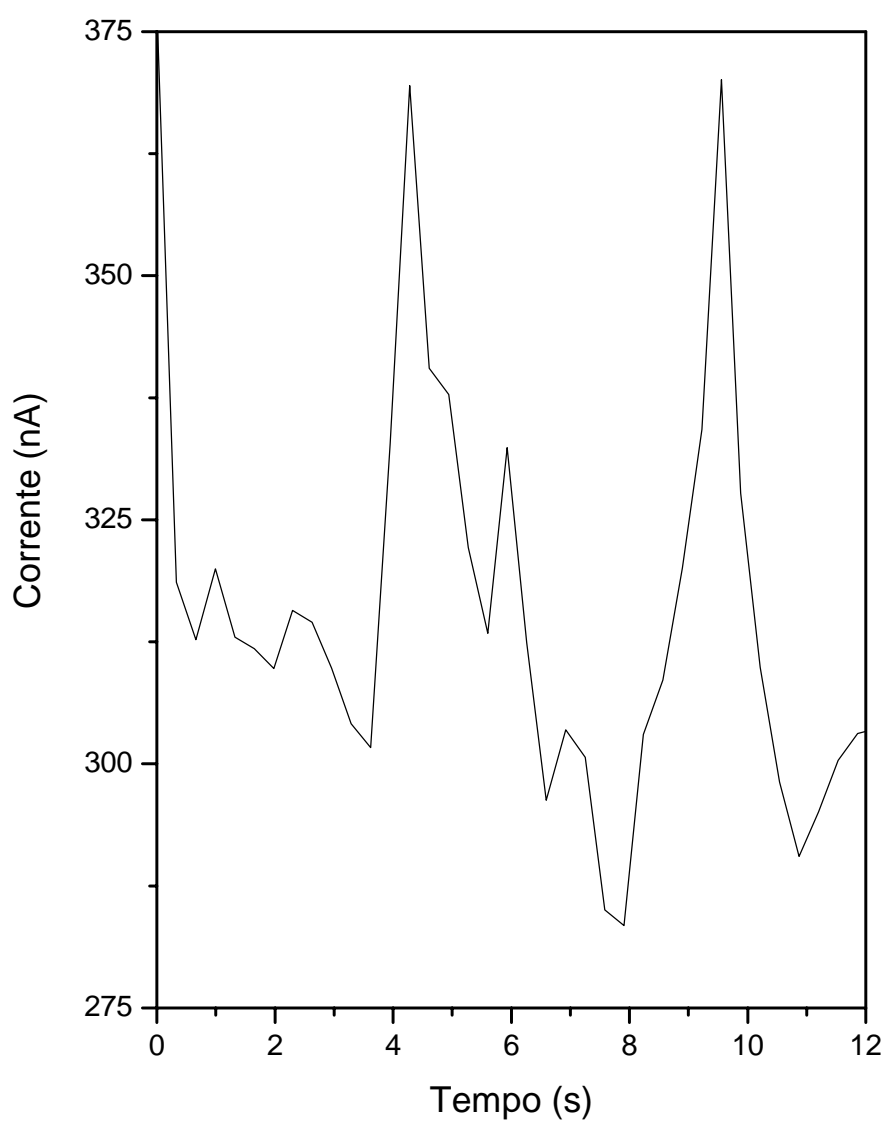
$$i = -3,70 \times 10^{-8} + 1,41 \times 10^{-7} c \quad (R^2=0,96)$$

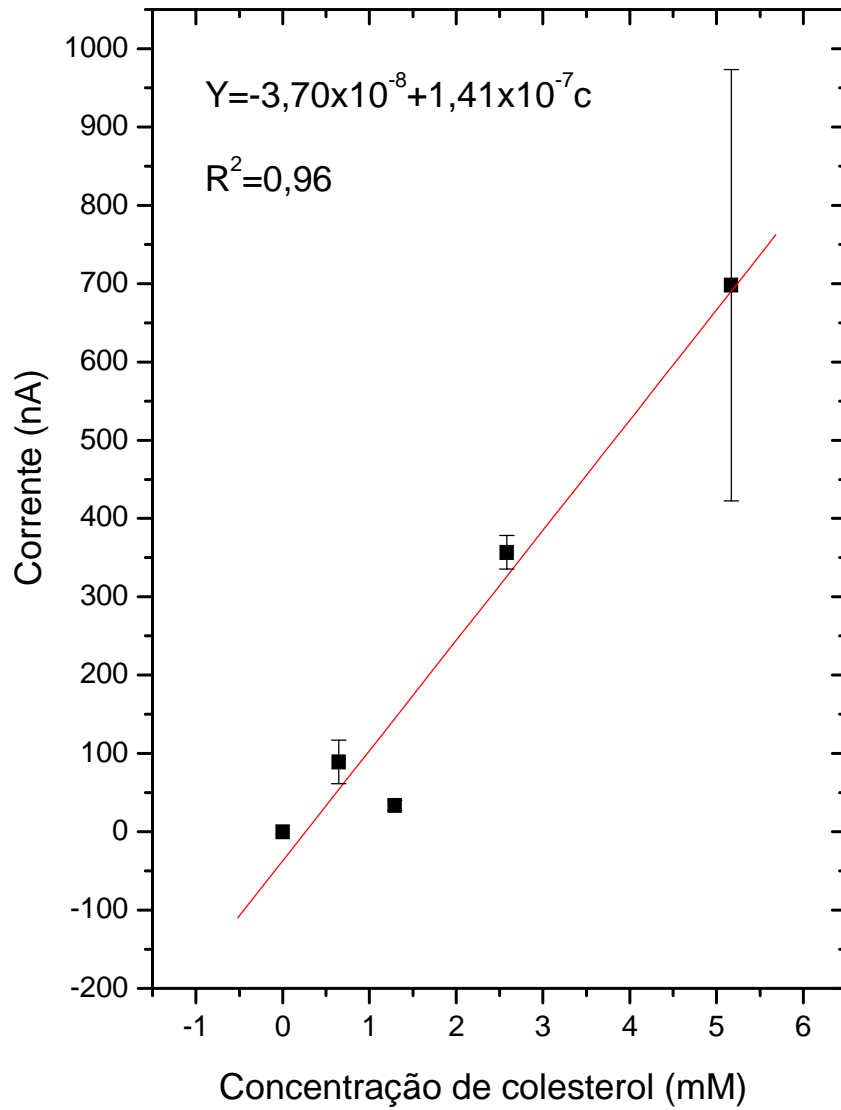
sendo  $c$  a concentração de colesterol.

Para concentrações elevadas de colesterol observou-se um aumento no desvio padrão do sinal do biossensor. Esta observação pode ser devido à grande diferença entre o parâmetro de solubilidade,  $\delta$ , do PVA e do colesterol (Tabela 11.1), que pode influenciar na difusão das moléculas de colesterol na matriz polimérica do biossensor. Como já visto anteriormente,  $\delta$ , determina se uma molécula tem ou não a capacidade de se difundir no polímero. A proximidade dos valores de  $\delta$  entre o PVA e a água indica que existe uma grande força de interação entre essas duas moléculas, o que permite a difusão da água no polímero. Como o valor de  $\delta$  para a molécula de colesterol é distante do valor de  $\delta$  da água, então a força de interação entre o colesterol e o PVA é fraca, prejudicando a difusão do colesterol na matriz do biossensor.

**Tabela 11.1:** Parâmetro de solubilidade para o PVA<sup>1</sup>, água<sup>2</sup> e para o colesterol.<sup>3</sup>

Substância	$\delta$ (cal <sup>1/2</sup> /cm <sup>3/2</sup> )
PVA	19,10
Água	23,40
Colesterol	9,40

**Figura 11.1:** Sinal obtido pelo biossensor para uma solução de colesterol com concentração de 2,58 mM, a temperatura de 37 °C.



**Figura 11.2:** Curva de calibração do sensor para colesterol. Cada ponto representa a média da resposta produzida por quatro diferentes sensores.



## 11.2 – Conclusões parciais

Os níveis de colesterol no organismo humano, em um indivíduo com dislipidemia, pode chegar a níveis de 6,20 mM.<sup>4</sup> Desta forma, o sensor de colesterol obtido possui sensibilidade adequada para a determinação de colesterol no plasma sanguíneo. O biossensor apresentou uma boa linearidade ( $R^2=0,96$ ) e intensidade de sinal na ordem de nA. A intensidade de sinal do biossensor obtido é comparável à da literatura<sup>5,6</sup>, como também à do biossensor comercial para glicose da marca Roche, linha Accu-Chek, testado em nosso laboratório.

## 11.3 – Referências bibliográficas

1. Pandey, L. K.; Saxena, C.; Dubey, V. Modification of poly(vinyl alcohol) membranes for pervaporative separation of benzene/cyclohexane mixtures. *Journal of Membrane Science*. 227, 173–182, 2003.
2. *HandBook of Physics and Chemistry*. 63° Edition. 1982-1983.
3. King, J. W.; Friedrich, J. P. Quantitative correlations between solute molecular structure and solubility in supercritical fluids. *Journal of Chromatography*. 517, 349-458, 1990.
4. Motta, V. T. *Bioquímica clínica para o laboratório*. 4° edição. Editora médica Missau. 2003.
5. Ram, M. K.; Bertoncello, P.; Ding, H.; Paddeu, S.; Nicolini, C. Cholesterol biosensors prepared by layer-by-layer technique. *Biosensors & Bioelectronics*, 16, 849–856, 2001.
6. Besombes, J. L.; Cosnier, S.; Labbé, P., Reverdy, G. Improvement of the analytical characteristics of an enzyme electrode for free and total cholesterol via laponite clay additives. *Analytica Chimica Acta*. 317, 275-280, 1995.

## CAPÍTULO 12 - PERSPECTIVAS FUTURAS

---

Como foi exposto anteriormente, o número de pessoas com dislipidemias é grande no Brasil e no mundo. Os altos níveis de colesterol no sangue é o principal fator de risco para o desenvolvimento de doença arterial coronariana. Sistemas inteligentes para o monitoramento colesterol representam um elevado potencial de crescimento mercadológico. Os biossensores já têm sido utilizados para tal finalidade, contudo, ainda é grande o número de pessoas que ainda não têm acesso ao monitoramento de seus níveis de colesterol, devido ao alto custo dos dispositivos atuais. Neste sentido, espera-se que o presente trabalho possa ter despertado a necessidade do desenvolvimento de biossensores em nosso país. Porém, é reconhecido que o caminho a ser percorrido ainda é longo.

Algumas etapas necessitam ser estudadas e analisadas cuidadosamente quanto ao projeto de um biossensor de colesterol genuinamente nacional. Tais etapas, que não foram executadas em nosso trabalho devido ao binômio tempo x instrumentação, serão objetos de trabalhos futuros. Assim, pode-se dizer que as perspectivas futuras desse trabalho são:

- 1- Calcular os parâmetros cinéticos das enzimas imobilizadas e verificar a influência do processo de imobilização na atividade enzimática;
- 2- Estudar a estabilidade e tempo de vida do biossensor;
- 3- Considerando-se que um biossensor envolve, além de um eletrodo enzimático, um sistema de aquisição de sinais em tempo real, é proposto a otimização e miniaturização do circuito usado, bem como a elaboração de um software para digitalização de sinais;
- 4- Testar o sensor incorporando a enzima glicose oxidase na matriz, criando um sistema multienzimático para a análise de glicose simultaneamente ao colesterol;
- 5- Aplicar os princípios de inteligência artificial na aquisição e interpretação dos sinais oriundos de um biossensor multienzimático;
- 6- Avaliar as propriedades hemocompatíveis do biossensor desenvolvido com vistas à obtenção de biossensores implantáveis.