



Ana Patrícia Mouta Crespo

Licenciada em Bioquímica

Desenvolvimento de eléctrodos baseados em nanopartículas de WO_3 para aplicação como biossensor

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientador: Elvira Maria Correia Fortunato, Prof. Doutora, FCT – UNL
Coorientador: Maria Gabriela Machado de Almeida, Prof. Doutora, FCT – UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor António Jorge Dias Parola
Arguente: Prof. Doutora Ana Pimenta da Gama da Silveira Viana Semedo
Vogais: Prof. Doutora Maria Gabriela Machado de Almeida
Prof. Doutora Elvira Maria Correia Fortunato

Ana Patrícia Mouta Crespo

Licenciada em Bioquímica

**Desenvolvimento de eléctrodos baseados em nanopartículas de
WO₃ para aplicação como biossensor**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientador: Elvira Maria Correia Fortunato, Prof. Doutora, FCT – UNL
Coorientador: Maria Gabriela Machado de Almeida, Prof. Doutora, FCT – UNL

Outubro de 2016

Desenvolvimento de eléctrodos baseados em nanopartículas de WO₃ para aplicação como biossensor

© Ana Patrícia Mouta Crespo
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Chego ao fim de mais esta etapa da minha vida académica, na qual contei com ajuda de várias pessoas às quais deixo o meu sincero agradecimento.

À minha orientadora, Professora Elvira Fortunato pela oportunidade que me deu em ser integrada num centro de investigação de excelência e pela orientação.

À minha coorientadora, Professora Maria Gabriela Almeida pela orientação e conhecimentos transmitidos.

À Lúcia Santos, por toda a paciência, conhecimentos transmitidos e apoio, tendo sido fundamental durante todo este trabalho.

À Célia Silveira e ao Tiago Monteiro pela disponibilidade e apoio que me prestaram.

À Alexandra Gonçalves pela paciência em satisfazer os meus pedidos laboratoriais e pela ajuda prestada. À Sónia Pereira pelo apoio laboratorial e pelo cuidado com as minhas amostras para análise. À Joana Pinto e Ana Pimentel pela disponibilidade e cuidado com as minhas amostras para análise. À Daniela Gomes pela paciência e disponibilidade na visualização das amostras na Microscopia electrónica de varrimento, mas também por todo o apoio que me prestou. À Diana Gaspar e Carolina Marques pela disponibilidade e cuidado na preparação das amostras.

Aos restantes colegas do CENIMAT, que apesar não serem mencionados, possibilitaram um bom ambiente, partilha de conhecimentos e companheirismo.

À minha família que me forneceu todas as ferramentas necessárias para seguir em frente no meu percurso académico.

Resumo

A transferência electrónica directa em proteínas redox é favorecida por eléctrodos modificados com nanopartículas. Neste trabalho, duas estruturas cristalográficas e morfológicas diferentes de nanopartículas de óxido de tungsténio (WO_3) são sintetizadas por um método hidrotermal assistido por micro-ondas, a modificação dos parâmetros de síntese permitiu a optimização do rendimento do processo em 30% face á síntese inicial. As nanopartículas de WO_3 são depositadas, por *drop casting*, sobre o vidro com ITO (do inglês indium tin oxide) e avaliadas as suas propriedades electroquímicas. O desempenho analítico do sensor modificado com proteína na determinação do H_2O_2 é apresentado como prova de conceito. A transferência de electrões heterogénea é melhorada nos eléctrodos que foram modificados com nanopartículas de WO_3 . A detecção do H_2O_2 pelos sensores revelou não ser específica do citocromo *c*, apesar de a proteína ter mantido a sua função biológica. Dos dois sensores construídos só um se comportou de acordo com a equação de *Michaelis-Menten*, para esse sensor a constante de *Michaelis-Menten* é $6,25 \times 10^5 \pm 6,0 \times 10^5 \mu\text{M}$. Os parâmetros de sensibilidade ($0,08 \pm 0,01 \text{ mAM}^{-1}\text{cm}^{-2}$) e o limite de detecção ($200 \mu\text{M}$) pioraram face a eléctrodos de carbono vítreo. No entanto o valor de E^0 (65 mV) é próximo dos valores reportados para esses eléctrodos de carbono vítreo. Os sensores construídos demonstraram ter uma baixa sensibilidade e especificidade na detecção do H_2O_2 , apesar disso as nanopartículas de WO_3 revelaram ser uma boa alternativa para aplicações electroquímicas.

Palavras-chave: síntese hidrotermal, nanopartículas de óxido de tungsténio, electroquímica, transferência de electrões heterogénea, sensor modificado.

Abstract

Direct electron transfer in redox proteins is favored by the use of nanoparticle electrodes. In this essay two crystallographic and morphologically different structures of tungsten oxide (WO_3) nanoparticles were synthesized by a microwave assisted hydrothermal method. The different parameters for the synthesis resulted in a 30% yield improvement. WO_3 nanoparticles were deposited, by drop casting, on glass with ITO (indium tin oxide) and its electrochemical properties were evaluated. The analytical data obtained from the modified sensor with cytochrome c in the determination of H_2O_2 was used as proof of concept.

Heterogenic electron transfer was improved by modification of the electrodes. H_2O_2 detection revealed to be unspecific in cytochrome c, although the protein maintained its biological function. Only one of the two new electrodes performed according to Michaelis-Menten equation, whose constant was $6,25 \times 10^5 \pm 6,02 \times 10^5 \mu\text{M}$. Both sensibility parameters ($0,08 \pm 0,01 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) and the detection limit ($200 \mu\text{M}$) worsened when compared to vitrified carbon. On the other hand the E° value (65mV) comes close to the reported value for the carbon electrode. Although the new sensors showed low sensitivity and specificity for the detection of H_2O_2 , the WO_3 nanoparticles still have different and efficient electrochemical applications.

Keywords: hydrothermal synthesis, tungsten trioxide nanoparticles, electrochemistry, heterogenic electron transfer, modified sensor.

Lista de acrónimos

ADE – Agente Direccional de Estrutura

nP's – Nanopartículas

***o*-WO₃** – WO₃ ortorrômbico

***h*-WO₃** – WO₃ hexagonal

Redox – Oxidação-Redução

CENIMAT – Centro de Investigação em Materiais

XRD – Difraccção de raios-X (do inglês *X-rays Diffraction*)

SEM – Microscopia Electrónica de Varrimento (do inglês, *Scanning Electron Microscopy*)

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês, *Fourier Transform Infrared*)

DSC – Varrimento Diferencial de Calorimetria (do inglês, *Diferencial Scanning Calorimetry*)

DLS – Difusão Dinâmica da Luz (do inglês, *Dynamic Light Scattering*)

NADH – Dinucleótido de nicotinamida e adenina (do inglês, *Nicotinamide adenine dinucleotide*)

ITO – do inglês *indium tin oxide*

IZO – do inglês *indium zinc oxide*

FTO - do inglês *fluorine tin oxide*

VC- Voltametria cíclica

PVP- Polivinil pirolidona

PEDOT/PSS- Poli(3,4-etilendioxitiofeno)-poli(estireno sulfonato)

PMS- do inglês *phenazine methasulfate*

AFC- Àcido ferroceno carboxílico

Lista de símbolos

°C – Graus celsius

cm – Centímetro

mm – Milímetro

µm – Micrómetro

nm – Nanómetro

L – Litro

mL - Mililitro

µL – Microlitro

M – Molar

mM – Milimolar

µM – Micromolar

A – Amperes

µA – Microamperes

V – Voltes

kV - Kilovolt

eV – Electrão volte

e⁻ - Electrão

kΩ- Kilohm

Hz - *Hertz*

E^{o3}- Potencial Formal

E - Potencial

Índice de matérias

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
Lista de acrónimos.....	vii
Lista de símbolos.....	ix
Índice de matérias.....	xi
Índice de figuras.....	xv
Índice de tabelas.....	xix
Enquadramento e Objectivos.....	1
2. Introdução Teórica.....	3
2.1. Nanopartículas de trióxido de tungsténio.....	3
2.1.1 Síntese das nanopartículas de WO ₃	5
2.1.2. Estado de arte das aplicações do WO ₃	6
2.2. Biossensor.....	7
2.2.1. Citocromo <i>c</i>	9
2.2.2. Peróxido de hidrogénio.....	10
2.3. Revisão dos conceitos electroquímicos.....	12
2.3.1. Voltametria cíclica.....	12
2.3.2. Cronoamperometria.....	15
2.3.3. Espectroscopia de impedância.....	16
3. Parte Experimental.....	19
3.1. Reagentes, equipamento e material.....	19
3.2. Síntese das nanopartículas (nP's) de óxido de tungsténio (WO ₃).....	19
3.3. Construção do sensor modificado.....	21
3.3.1. Construção do eléctrodo.....	21
3.3.2. Adsorção da proteína citocromo <i>c</i>	22
3.4. Caracterização electroquímica.....	22
3.4.1. Caracterização do eléctrodo/sensor modificado.....	23
3.4.2. Teste da actividade catalítica do peróxido de hidrogénio.....	23
3.4.2.1. Interferentes.....	24
3.4.2.2. Amostras reais.....	24
4. Técnicas de Caracterização.....	25
4.1. Difracção de Raios-X (XRD, do inglês <i>X-rays diffraction</i>).....	25
4.2. Espectroscopia de Infravermelho (IV).....	26
4.3. Espectroscopia de Visível - Ultravioleta (Vis-UV).....	27
4.4. Espectroscopia de <i>Raman</i>	29
4.5. Microscopia electrónica de varrimento com feixe de iões focalizado (SEM – FIB).....	29
4.6. Dispersão dinâmica da luz (DLS, do inglês <i>dynamic Light Scattering</i>).....	31

4.7. Análise por BET (<i>Brunauer-Emmett-Teller</i>).....	31
4.8. Análise térmica.....	32
4.8.1. Termogravimetria.....	32
4.8.2. Calorimetria diferencial de varrimento (DSC do inglês <i>Differential Scanning Colorimetry</i>).....	32
4.9. Perfilometria de contacto.....	33
5. Apresentação e Discussão dos Resultados.....	35
5.1. Caracterização das nanopartículas de WO ₃	35
5.1.1. Microscopia electrónica de varrimento.....	36
5.1.2. Difração de raios-X	37
5.1.3. Dispersão dinâmica da luz.....	39
5.1.4. Cálculo do rendimento da reacção.....	40
5.1.5. Análise térmica.....	40
5.1.6. Análise da área superficial pelo modelo <i>Brunauer-Emmett-Teller</i>	41
5.1.7. Espectroscopia de Infravermelho (IV).....	42
5.1.8. Espectroscopia de Raman.....	43
5.2. Caracterização electroquímica dos eléctrodos.....	44
5.2.1. Testes preliminares.....	44
5.2.2. Teste dos eléctrodos com ferricianeto de potássio.....	47
5.2.3. Teste dos eléctrodos com metilsulfato-5-fenazina.....	55
5.2.4. Teste dos eléctrodos com ácido ferroceno carboxílico.....	57
5.2.5. Teste dos eléctrodos com NADH.....	60
5.2.6. Teste dos eléctrodos com hemoglobina.....	61
5.2.7. Teste dos eléctrodos com citocromo c.....	62
5.3. Prova de conceito: sensor amperimétrico de peróxido de hidrogénio.....	65
5.3.1. Teste do sensor amperimétrico.....	65
5.4. Caracterização morfológica dos eléctrodos de WO ₃	68
5.4.1. Microscopia electrónica de varrimento.....	68
5.4.2. Reflectância.....	70
5.4.3. Perfilometria de contacto.....	71
6. Conclusões e Perspetivas Futuras	73
7. Referências Bibliográficas	75
Anexos.....	79
A – Difractograma padrão do WO ₃ com a estrutura cristalina monoclinica.....	79
B- Espectros de Raman das nP's nP-Na ₂ SO ₄ -P75_t120.....	80
C- Modelo de um circuito electrónico equivalente usado no cálculo da resistência do OIE e dos eléctrodos.....	80
D- Parâmetros calculados para os eléctrodos com o polímero PEDOT/PSS.....	81
E- Monitorização dos compostos por espectrofotometria de UV-Vis.....	82
E.1. Monitorização da estabilidade do NADH.....	82

E.2. Monitorização da estabilidade da hemoglobina.....	82
E.3. Monitorização da estabilidade do citocromo c.....	83
F- Voltametria cíclica nos substratos flexíveis.....	83
F.1. Voltamogramas cíclicos da hemoglobina nos substratos flexíveis.....	83
F.2. Voltamogramas cíclicos do citocromo <i>c</i> nos substratos flexíveis.....	84

Índice de figuras

Figura 2.1. A) Representação da estrutura do h-WO ₃ no plano [001], B) Representação da estrutura do h-WO ₃ no plano [100].....	4
Figura 2.2. Representação da estrutura cristalina ortorrômbica (WO ₃ ·0.33H ₂ O).....	4
Figura 2.3. Imagem esquemática do funcionamento de um biossensor	7
Figura 2.4. Imagem esquemática da 1 ^a , 2 ^a e 3 ^a geração de Biossensores.....	8
Figura 2.5. A) Estrutura do citocromo c de coração de cavalo oxidado (estrutura retirada de “Protein Data Bank”). B) Estrutura do grupo protético (hemo c) do citocromo c.....	10
Figura 2.6. Estrutura do H ₂ O ₂	11
Figura 2.7. Voltamograma cíclico típico de um processo redox reversível.....	13
Figura 2.8. A) Voltamograma cíclico de um sistema irreversível. B) Voltamograma cíclico de um sistema quase reversível.....	15
Figura 2.9. A) Modelo do circuito electrónico equivalente. B) Espectro de impedância faradaica presente na forma de curvas “Nyquist”.....	17
Figura 3.1. Micro-ondas usado na síntese das nP's de WO ₃ (marca: Discover Synthesis Platform® da CEM Corporation). B) Recipiente apropriado para o micro-ondas.....	20
Figura 3.2. Aparelho de aplicação de filmes (marca: BYK).....	21
Figura 3.3. Imagem esquemática do sensor modificado.....	22
Figura 3.4. Imagem esquemática e real da montagem electroquímica na conformação dos 3 eléctrodos com o fluxo de azoto.....	24
Figura 4.1. Interferência dos raios X com o material cristalino.....	26
Figura 4.2. Imagem esquemática dos passos para obter um espectro de IV.....	27
Figura 4.3. Imagem esquemática dos passos para obter um espectro de refletância.....	27
Figura 4.4. Imagem esquemática dos passos para obter um espectro de absorção.....	28
Figura 4.5. Diferentes possibilidades de dispersão de luz na espectroscopia de Raman, ΔE (diferença de energia), h(contante de Plank) e ν (frequência).....	29
Figura 4.6. Imagem esquemática de um equipamento de SEM.....	30
Figura 4.7. Imagem esquemática da dispersão da luz após incidir na amostra.....	31
Figura 4.8. Imagem esquemática de um aparelho de DSC.....	33
Figura 4.9. Imagem esquemática do funcionamento de um perfilómetro.....	33
Figura 5.1. Imagens de SEM das amostras de nP's de WO ₃ sintetizadas. Os contornos das imagens estão relacionados com o agente director de estrutura usado: vermelho – ADE é o NaCl e a preto o ADE é o Na ₂ SO ₄	36
Figura 5.2. Difractogramas das nP's de WO ₃ sintetizadas, obtidos á temperatura ambiente. A) nP's de WO ₃ sintetizadas com o NaCl como agente director de estrutura. B) nP's de WO ₃ sintetizadas com o Na ₂ SO ₄ como agente director de estrutura.....	37

Figura 5.3. Difractogramas de Monotorização do incremento da temperatura às nP's de WO ₃ . A) nP-NaCl-P75_t120. B) nP-Na ₂ SO ₄ -P75_t120.....	38
Figura 5.4. Análise térmica das nP's de WO ₃ nP-NaCl-P75_t120 (linha a vermelho) e nP-Na ₂ SO ₄ -P75_t120 (linha a preto) com as respectivas curvas TG (linha a tracejado) e DSC (linha contínua).....	41
Figura 5.5. Isotérmicas de adsorção-dessorção de N ₂ das nP's nP-NaCl-P75_t120 (vermelho) e nP-Na ₂ SO ₄ -P75_t120 (preto).....	42
Figura 5.6. Espectros de IV das nP's nP-NaCl-P75_t120 e nP-Na ₂ SO ₄ -P75_t120.....	43
Figura 5.7. Curvas de <i>nyquist</i> do ITO, dos eléctrodos de ITO/WO ₃ e dos eléctrodos de ITO/WO ₃ /PVP obtidas com uma voltagem alternada de 10 mV e uma gama de frequências de 1 – 10 ⁶ Hz.....	45
Figura 5.8. Voltamogramas cíclicos dos eléctrodos de ITO/WO ₃ e dos eléctrodos ITO/WO ₃ /PVP em tampão 0,05 M tris-HCl a pH 7,6, 0,1M KCL. Velocidade de varrimento 50 mV/s.	47
Figura 5.9. Voltamogramas cíclicos de 1 mM Fe(CN) ₆ ⁴⁻ , 0,1 M KCl. A uma velocidade de varrimento de 50 mV/s. A) Comparação dos substratos onde se vão depositar as nP's de WO ₃ . B) Comparação das técnicas de deposição das nP's de WO ₃	48
Figura 5.10. Voltamogramas cíclicos de 1 mM Fe(CN) ₆ ⁴⁻ , 0,1 M KCl. A uma velocidade de varrimento de 50 mV/s. A) Comparação de eléctrodo EOr1 (1 camada) e EOr3 (3 camadas). B) Comparação de eléctrodo EHex1 (1 camada) e EHex3 (3 camadas).....	49
Figura 5.11. Voltamogramas cíclicos de 1 mM Fe(CN) ₆ ⁴⁻ ; 0,1 M KCl, nos eléctrodos de WO ₃ estudados com diferentes velocidades de varrimento desde 10-250 mV/s A) Vidro com ITO. B) Eléctrodo EOr3. C) Eléctrodo EHex3.....	50
Figura 5.12. Voltamogramas cíclicos de 1 mM Fe(CN) ₆ ⁴⁻ , 0,1 M KCl, no eléctrodo EHexP1 a diferentes velocidades de varrimento desde 10-250 mV/s	53
Figura 5.13. Voltamogramas cíclicos de 1 mM Fe(CN) ₆ ⁴⁻ , 0,1 M KCl, no eléctrodo sintetizado in situ no microondas, a diferentes velocidades de varrimento desde 10-250 mV/s.....	54
Figura 5.14. Voltamogramas cíclicos de 1 mM Fe(CN) ₆ ⁴⁻ , 0,1 M KCl no eléctrodo EOr3 em três dias consecutivos a uma velocidade de varrimento de 50 mV/s.....	55
Figura 5.15. Voltamogramas cíclicos de 2mM PMS, 0,1M de KCl, nos eléctrodos de WO ₃ estudados a diferentes velocidades de varrimento desde 10-250 mV/s. A) Eléctrodo Vidro/ITO. B) Eléctrodo EOr3. C) Eléctrodo EHex3. D) Eléctrodo EHexP1.	56
Figura 5.16. Voltamogramas cíclicos de 2mM de AFC, 0,2M de Na ₂ HPO ₄ , dos eléctrodos de WO ₃ estudados a diferentes velocidades de varrimento desde 10-250 mV/s, em. A) Eléctrodo Vidro/ITO. B) Eléctrodo EOr3. C) Eléctrodo EHex3.....	58
Figura 5.17. Voltamogramas cíclicos de 2mM de AFC em tampão 0,1 M citrato, pH 7, nos eléctrodos de controlo e EOr3 estudados a diferentes velocidades de varrimento desde 10-250 mV/s, os testes foram realizados em duplicado. A) Eléctrodo Vidro/ITO. B) Eléctrodo EOr3.....	59
Figura 5.18. Voltamogramas cíclicos de 5mM de NADH dissolvido em tampão 0,05 M tris-HCl a pH 8,5, nos eléctrodos de WO ₃ estudados a diferentes velocidades de varrimento desde 2-150 mV/s. A) Eléctrodo EHex3. B) Eléctrodo EHexP1.....	60
Figura 5.19. Voltamogramas cíclicos de 4.0 mg/ml de hemoglobina em tampão 0,1 M fosfato, pH 6,1, numa gama de velocidades de varrimento de 10-200 mV/s. A) Vidro/ITO B) Eléctrodo EHexP1 C) Eléctrodo EHexP1 com 5	

µl de solução de hemoglobina adsorvida, as medidas são realizadas em tampão fosfato a pH 6,1.....	61
Figura 5.20. Os voltamogramas cíclicos A,B e C de 0,2 mM de citocromo c em tampão 0,05 M tris-HCl, pH 7,6 e os voltamogramas cíclicos D e E são obtidos em tampão 0,05 M tris-HCl a pH 7,6. Numa gama de velocidades de de varrimento de 10-750 mV/s. As medidas foram realizadas em duplicado A) Vidro com ITO, B) Eléctrodo EHex3. C) Eléctrodo EHexP1. D) Eléctrodo EHexP1a. E) Eléctrodo EHexP1b.	63
Figura 5.21. Resposta electroquímica á variação da concentração de H ₂ O ₂ em tampão 0.05 M tris-HCl, pH 7,6, com 0,1M KCl nos electrodos de controlo e modificados com cit. c. As medidas foram realizadas em duplicado. A) Voltamogramas cíclicos no eléctrodo de controlo (EHexP1). B) Voltamogramas cíclicos no eléctrodo EHexP1a. C) Resposta amperimétrica com o gráfico da corrente catalítica em função da [H ₂ O ₂] no eléctrodo EHexP1a e a respectiva curva de aproximação á equação de Michaelis-Menten. D) Voltamogramas cíclicos no eléctrodo de controlo EHexP1b. E) Resposta amperimétrica com o gráfico da corrente catalítica em função da [H ₂ O ₂] no eléctrodo EHexP1b e a respectiva curva de aproximação á equação de Michaelis-Menten.....	66
Figura 5.22. Mecanismo da reacção de redução electrocatalítica do H ₂ O ₂	67
Figura 5.23. Resposta amperimétricas em tampão 0.05 M tris-HCl, pH 7,6, com 0,1 M de KCl no eléctrodo EHexP1a a um potencial de -300 mV. A) Resposta a uma amostra real (detergente tira-nodoas). B) Estudo da interferência de NO ₂ ⁻	68
Figura 5.24. Imagens de SEM dos eléctrodos EOr3 e EHex3. A cor do contorno da imagem está relacionada com a estrutura cristalina das nP's usadas: vermelho – estrutura ortorrômbica hidratada e a preto – estrutura hexagonal.....	69
Figura 5.25. Imagens de SEM dos eléctrodos EOr3 e EHex3 depois dos testes electroquímicos. A cor do contorno da imagem está relacionada com a estrutura cristalina das nP's usadas: vermelho – estrutura ortorrômbica hidratada e a preto – estrutura hexagonal.....	69
Figura 5.26. Imagens de SEM dos eléctrodos EOr3 e EHex3 obtidas pela técnica de <i>cross section</i> . A cor do contorno da imagem está relacionada com a estrutura cristalina das nP's usadas: vermelho – estrutura ortorrômbica hidratada e a preto – estrutura hexagonal.....	70
Figura 5.27. Espectros de reflectância que permitem a monitorização da aderência das nP's aos eléctrodos antes e depois de testes electroquímicos (TEQ). A) EOr3, B) EHex3 e C) EHexP1.....	71
Figura 0.1. Difractograma padrão do WO ₃ com a estrutura cristalina monoclinica.....	79
Figura 0.2. Espectros de Raman das nP's nP-Na ₂ SO ₄ -P75_t120 com diferentes poderes de laser: a roxo 15 mW, a vermelho 5 mW, a verde 0,5 mW e a azul 50µW.....	80
Figura 0.3. Modelo do circuito electrónico equivalente constituído por uma resistência ohmica da solução do electrólito R _u , a resistência á transferência de electrões R _p , dois elementos constantes de fase (Y0 e Yo7) e a impedância de Warburg Wd.....	80
Figura 0.4. Monitorização da estabilidade do NADH ao longo das medidas de voltametria cíclica e no dia seguinte.....	82
Figura 0.5. Monitorização da estabilidade da hemoglobina através de espectrofotometria de UV-Vis antes e depois de medidas de voltametria cíclica.....	82

Figura 0.6. Monitorização da integridade da solução de citocromo c depois das medidas de voltametria cíclica.....	83
Figura 0.7. Voltamogramas cíclicos numa solução de hemoglobina a 4.0 mg/ml em tampão 0,1 M fosfato, pH 6,1, nos eléctrodos construídos com substratos flexíveis a uma velocidade de varrimento igual a 20 mV/s. A) Comparação do papel de carbono sem nP's (preto) e com nP's de WO ₃ (vermelho). B) Comparação do Kapton com grafeno sem nP's de WO ₃ (preto) e com nP's de WO ₃ (vermelho).....	83
Figura 0.8. Voltamogramas cíclicos de 0,2 mM de citocromo c em tampão 0,05 M tris-HCl, pH 7,6, nos eléctrodos construídos com substratos flexíveis. Numa gama de velocidades de varrimento de 10-750 mV/s. A) Papel de screen printing com IZO. B) Papel de screen printing com ouro.....	84

Índice de tabelas

Tabela 2.1. Estado de arte das aplicações de WO ₃	6
Tabela 3.1. Reagentes e respectivas quantidades usadas para a síntese das nP's de WO ₃	20
Tabela 3.2. Condições testadas no micro-ondas. A condição escolhida encontra-se a negrito.....	20
Tabela 5.1. Nomenclatura das nP's WO ₃ sintetizadas.....	35
Tabela 5.2. Tamanho das nP's de WO ₃ sintetizadas antes e depois de sonicar. Os valores apresentados foram obtidos através da média de três resultados consecutivos para a mesma dispersão de nP's de WO ₃	39
Tabela 5.3. Rendimentos das reacções de síntese das nP's de WO ₃	40
Tabela 5.4. Nomenclatura dos eléctrodos estudados.....	44
Tabela 5.5. Resistências do ITO, dos eléctrodos de ITO/WO ₃ e de ITO/WO ₃ /PVP, cada valor de resistência apresentado são obtidos através da média das resistências calculadas para cinco ITO/eléctrodos diferentes.....	46
Tabela 5.6. Parâmetros calculados para os eléctrodos vidro/ITO e os eléctrodos EOr3 e EHex3; os valores foram obtidos através da média de cinco eléctrodos diferentes.....	51
Tabela 5.7. Parâmetros calculados para os eléctrodos com o polímero PVP, os parâmetros a azul-escuro são correspondentes ao eléctrodo EHexP1 e a azul claro ao eléctrodo EHexP3.....	52
Tabela 5.8. Parâmetros calculados para o Vidro/FTO e o eléctrodo sintetizado in situ no microondas (ENCM). 54	
Tabela 5.9. Parâmetros electroquímicos de 2mM PMS, 0,1M KCl, no vidro/ITO e nos eléctrodos EOr3, EHex3 e EHexP1. Os parâmetros calculado para o eléctrodos de controlo, EOr3 e EHex3 são o resultado da média dos valores de cinco eléctrodos diferentes, enquanto no caso do eléctrodo EHexP1 são o resultado apenas de um eléctrodo.....	56
Tabela 5.10. Parâmetros electroquímicos calculados para 2mM AFC, 0,2M de Na ₂ HPO ₄ , no vidro/ITO e nos eléctrodos EOr3, EHex3. Os valores aprentados são o resultado da média de cinco electrodos diferentes.....	58
Tabela 5.11. Parâmetros electroquímicos calculados para 2mM de AFC em tampão 0,1 M citrato, pH 7, no vidro/ITO e nos eléctrodos EOr3. Os testes foram realizados em duplicado.....	59
Tabela 5.12. Parâmetros calculados a partir dos voltamogramas cíclicos de 0,2 mM de citocromo c em tampão 0,05 M tris-HCl, pH 7,6.	64
Tabela 5.13. Parâmetros cinéticos e analíticos dos bioeléctrodos EHexP1a e EHexP1b	67
Tabela 5.14. Espessuras dos vários eléctrodos estudados. Os valores apresentados são a média de três medidas efectuadas em cada electrodo em zonas distintas.....	72
Tabela 0.1. Parâmetros calculados para os eléctrodos com o polímero Pedot/PSS.....	81

1. Enquadramento e Objectivos

Nos últimos anos a nanotecnologia têm sido uma área em plena expansão, nomeadamente no caso das nanopartículas. Estas devido ao seu tamanho reduzido exibem muitas características específicas, que dependem não só da composição mas também do seu tamanho e forma.

Mais especificamente no caso dos óxidos metálicos nanoestruturados, a elevada densidade atómica e energia superficial, associados ao seu poder de adsorção, permite que estes materiais tenham diversas aplicações na área da engenharia, dos materiais e da química analítica, nomeadamente em sensores com diversas aplicações. Em particular, a construção de novos eléctrodos com nanopartículas de óxidos metálicos poderá beneficiar o desenvolvimento de biossensores electroquímicos com um desempenho melhorado.

O desenvolvimento de biossensores é uma área de investigação multidisciplinar em contínua expansão devido, não só, à crescente procura de novos métodos analíticos, mas também aos desenvolvimentos nas áreas da engenharia e dos materiais.

O principal objectivo deste trabalho era a optimização de preparação das nanopartículas de WO_3 no desenvolvimento de eléctrodos e posterior estudo da resposta destes a espécies electroactiva de interesse por exemplo, proteínas.

As principais etapas deste trabalho englobaram:

1. **A optimização da síntese das nanopartículas de WO_3** , através da variação do tempo e do programa de síntese usado no micro-ondas.
2. **Estudo da deposição das nanopartículas de WO_3 e optimização das tintas**, utilizando as técnicas de “*drop casting*” e “*doctor blade*”, e conjugando o uso de diferentes polímeros nas dispersões de nanopartículas.
3. **Caracterização electroquímica dos eléctrodos produzidos**, na presença de compostos electroactivos, tais como mediadores redox e proteínas hémicas (citocromo c).
4. **Construção do sensor de peróxido de hidrogénio, utilizando a proteína adsorvida no eléctrodo e caracterização electroquímica do sensor.**

O peróxido de hidrogénio é um interveniente em muitos processos biológicos e ambientais, sendo necessário a sua constante quantificação. O sensor desenvolvido neste trabalho vai de encontro a esta necessidade de quantificação do H_2O_2 .

2. Introdução Teórica

Materiais nanoestruturados (nanomateriais) apresentam propriedades especiais em virtude da sua dimensão á nanoescala, isto é, pelo menos uma dimensão abaixo dos 100 nm. Os nanomateriais incluem grupos atómicos, filmes em camadas, estruturas filamentosas e materiais nanoestruturados em massa. O comportamento destes nanomateriais é altamente influenciado pela sua superfície e interface. Os materiais com pequenas dimensões vão conter muitos átomos á sua superfície, o que confere a estes nanomateriais várias das propriedades de superfície, tais como níveis de energia, estrutura electrónica, e reactividade diferentes de materiais maiores dimensões. Dentro dos nanomateriais incluem – se os óxidos metálicos, os quais desempenham um papel muito importante em muitas áreas, tais como, na química, física e ciências dos materiais. Os elementos metálicos podem formar uma grande diversidade de compostos de óxidos. Estes elementos podem adoptar estruturas geométricas diferentes, mas também estruturas electrónicas com caracter de semiconductor ou de isolante metálico. Os nanomateriais de óxidos metálicos são utilizados em aplicações tecnológicas para o fabrico de circuitos microelectrónicos, sensores, dispositivos piezoeléctricos, células de combustível e como catalisadores [1] [2].

2.1. Nanopartículas de trióxido de tungsténio

Actualmente o trióxido de tungsténio WO_3 é um dos semicondutores mais estudados na área dos electrocrómicos. Este material tem imensas vantagens, onde se destacam o baixo custo, a disponibilidade, a elevada estabilidade e sensibilidade, a mudança reversível de condutividade e das propriedades ópticas, a selectividade e a biocompatibilidade [3].

O WO_3 tem uma configuração electrónica d^0 . O hiato das bandas do WO_3 corresponde á diferença de energia entre os níveis de valência da banda da orbital 2p do oxigénio e a banda da orbital 5d vazia do W varia entre 2,6 – 3,25 eV. A banda proibida por norma aumenta com a redução do tamanho das partículas de WO_3 , este efeito é denominado confinamento quântico. O óxido de tungsténio também é conhecido pelas suas propriedades não estequiométricas ou sub -estequiométricas, já que se pode intercalar mais ou menos átomos de oxigénio, respectivamente [4].

Os cristais de WO_3 são formados por blocos de WO_6 octaédricos dispostos de várias formas, o que proporciona uma grande variedade de estruturas cristalinas, nomeadamente a fase monoclínica, triclínica, tetragonal, cúbica, ortorrômbica e hexagonal. Estas fases poderão ser parcialmente reversíveis. À temperatura ambiente as fases mais estáveis são a monoclínica e triclínica [2],[3]. No entanto o WO_3 hexagonal também foi reportado como sendo muito estável. Esta estrutura é obtida por blocos de WO_6 octaédrico dispostos na forma de três ou seis anéis, no plano ab. As quais dão uma aparência de cavidades trigonais e janelas hexagonais (**figura 2.1 A**), respectivamente. No eixo do z um bloco octaédrico compartilha o oxigénio, coordenando-o com outros quatro blocos formando uma janela quadrada (**figura 2.1 B**) [6].

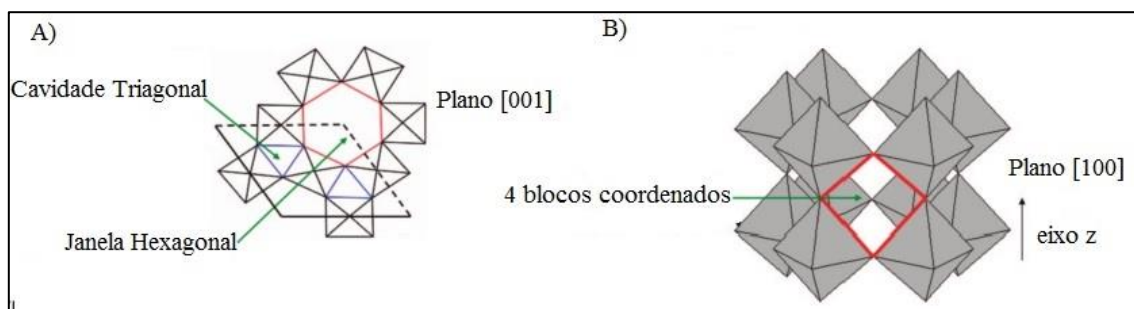


Figura 2.1. A) Representação da estrutura do h-WO₃ no plano [001], B) Representação da estrutura do h-WO₃ no plano [100] [6].

Os WO₃ hidratados (WO₃·nH₂O) ou ácidos túngsticos são uma categoria importante dos cristais de WO₃. As quatro estruturas mais estudadas são o WO₃·2H₂O (dihidratado), WO₃·H₂O (monohidratado), WO₃·0.5H₂O (hemihidratado) e WO₃·0.33H₂O (**Figura 2.2**). Estes tipos de estruturas são altamente dependentes do seu conteúdo em água. A estrutura ortorrômbica hidratada (WO₃·0.33H₂O) contém dois tipos de blocos de WO₆ octaédricos. O primeiro tipo é construído por um átomo central de tungstênio rodeado por seis átomos de oxigênio, enquanto que no segundo tipo, dois átomos de O são substituídos por uma ligação curta W=O e uma ligação longa W-(OH)₂. Com este último tipo de blocos temos, por um lado, um menor sobreposição das camadas no eixo dos z e, por outro lado, uma estrutura menos compacta[4][7].

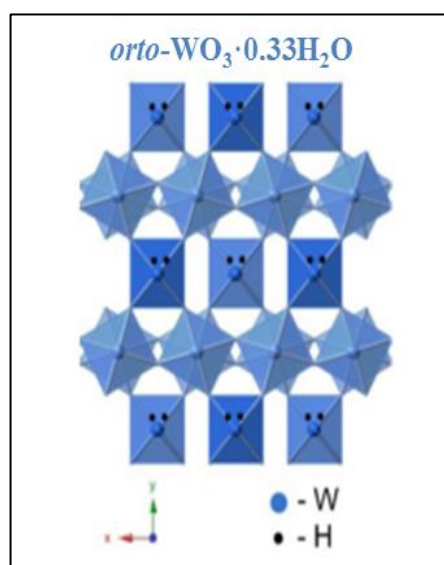


Figura 2.2. Representação da estrutura cristalina ortorrômbica (WO₃·0.33H₂O) [15].

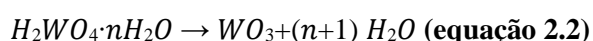
2.1.1. Síntese das nanopartículas de WO₃

As nanopartículas podem ser produzidas através de vários processos, tais como: os mecânicos, como por exemplo, a moagem mecânica [1]; os físicos [8] onde temos, como exemplos, a pulverização catódica, a evaporação, a litografia, ablação por laser e sistemas de injeção e, por fim, os processos químicos, onde se incluem as técnicas de sol – gel, a electrodeposição e métodos solvotermiais [4]. Este último foi o escolhido neste trabalho para a síntese das nP's de WO₃, porque é uma técnica simples com um baixo custo de produção. O solvente usado foi a água e por isso é denominado método hidrotermal.

Método de síntese hidrotermal

A síntese hidrotermal é uma técnica muito estudada nos últimos anos, que se processa na fase líquida. Permitindo produzir nanopartículas de WO₃ com diferentes morfologias. Nesta técnica os solutos dissolvidos em água ultrapura são submetidos a elevadas pressões, o que permite aumentar a solubilidade do sólido e a velocidade da reacção. Além dos aspectos que já foram referidos, a síntese hidrotermal têm várias vantagens que são: controlo total sobre a forma e o tamanho, temperatura de processamento baixa, elevada homogeneidade, boa relação custo/desempenho e método de síntese simplificado [9].

Inicialmente, as soluções eram colocadas dentro de uma autoclave para posteriormente serem levadas ao forno, onde as amostras eram submetidas a uma temperatura entre os 160 e 200°C, de modo atingir pressões elevadas. No entanto apesar de este método ser simples e eficiente apresenta cinéticas lentas devido à baixa temperatura utilizada. Devido a este facto, com o avançar da tecnologia, têm-se tentado combinar o método de síntese hidrotermal com a radiação por micro-ondas, com o objectivo de acelerar a reacção. Ao contrário do método baseado no forno, onde o aquecimento da solução é feito de fora para dentro da autoclave, de uma forma indirecta, neste método usa-se a radiação de micro-ondas, sendo um aquecimento dieléctrico, ou seja, utiliza as propriedades inerentes dos líquidos, sólidos e de misturas para converter a energia das micro-ondas *in situ* em aquecimento directo, promovendo assim a reacção. Na prática este tipo de aquecimento permite aquecer a água até 100 a 150°C em apenas 1 a 3 minutos contra os 60 a 100 minutos que demoraria no forno, permitindo assim a poupança de energia[4][10]. A formação das nanopartículas de WO₃ dá-se em três passos: o primeiro corresponde á formação do ácido túngstico (H₂WO₄·nH₂O), o qual se forma pela acidificação da solução precursora, tal como descrito na **equação 2.1**; o segundo passo diz respeito á formação dos agregados de WO₃ pela decomposição do H₂WO₄ descrito pela **equação 2.2** e, por fim, temos o crescimento dos núcleos cristalinos de WO₃ [4].



Para controlar a estrutura das nP's de WO₃, pode-se adicionar alguns compostos. Estes compostos dão-se pelo nome de agentes directores de estrutura, como é o caso do LiSO₄, o Na₂SO₄ e o NaCl [11], [12].

2.1.2. Estado de arte das aplicações do WO₃

As nanopartículas de WO₃ são um material muito versátil, com várias aplicações tais como em materiais cromogénicos e sensores. Na tabela 2.1 faz-se um englobamento de vários trabalhos onde se utilizou o WO₃.

Tabela 2.1. Estado de arte das aplicações do WO₃

Aplicações	Referência bibliográfica	Estrutura Cristalográfica das nP's de WO ₃
Fotocatálise	[13]	Amorfo
Sensor Colorimétrico	[14]	Triangular/Hexagonal
Janelas electrocrómicas	[6]	Hexagonal
Sensor de pH	[15]	Ortorrômico
Sensor de gás	[16]	Triclínico
Biossensor de nitrito	[17]	Monoclínico/Ortorrômico hidratado
Biossensor de H ₂ O ₂	[18]	Informação não está disponível

Em quase todos os trabalhos apresentados na tabela 2.1 o WO₃ é sintetizado pelo método hidrotermal á excepção do trabalho de Yuan *et all* [14] onde a síntese ocorre pelo método de sol-gel. No trabalho realizado por Vernadou *et all* [13] foi realizado o crescimento in situ do WO₃ sobre um vidro de microscópio e estudada a sua actividade fotocatalítica. Em Yuan *et all* [14] as propriedades electrocrómicas do WO₃ são usadas na detecção de uma bactéria electroquímica. Também em Balaji *et all* [6] são aproveitadas as propriedades electrocrómicas do WO₃, mas para a aplicação em janelas inteligentes. Em Santos *et all* [15] o sensor para a detecção do pH é construído através da deposição do WO₃ sobre o Kapton. No trabalho de Han *et all* o WO₃ ajuda na detecção do gás. Em Santos *et all* [17] o WO₃ é depositado pela técnica de *casting* sobre o vidro com ITO, este eléctrodo é modificado pela proteína redutase do nitrito do citocromo c. Por fim Deng *et all* [18] o WO₃ é depositado sobre o vidro com ITO por *spin-coating* e recozido a 500 °C, o eléctrodo é modificado com citocromo c.

Neste trabalho experimental procurou-se aperfeiçoar o método de aplicação das nP's em relação ao método usado por Santos *et all* [17] (trabalho também realizado dentro do grupo) bem como testar outras proteínas. Enquanto o trabalho realizado por Deng *et all* [18] têm em comum, com este trabalho, a proteína usada no biossensor bem como o composto detectado, mas difere no método de aplicação das nP's e nas temperaturas de recozimento, em conclusão o método de fabrico do filme de WO₃ usado neste trabalho é mais rápido e têm um custo menor.

2.2. Biossensor

A ciência dos biossensores é uma área interdisciplinar, que liga a química, a física, a biologia, a electrónica e a engenharia, proporcionando a construção de dispositivos que efectuem uma análise rápida e simples das amostras. Os biossensores são dispositivos analíticos que convertem um sinal biológico num sinal eléctrico, com o objectivo de determinar ou quantificar determinado analito. A grande maioria dos biossensores recorre á especificidade dos processos biológicos, nomeadamente o reconhecimento das enzimas pelos substratos ou outros ligandos, dos anticorpos pelos antigénios, das lectinas pelos carboidratos e ácidos nucleicos. A principal vantagem do uso de moléculas biológicas é a sua elevada selectividade relativamente a uma dada substância, devido a estas características, os dispositivos, geralmente, são capazes de detectar espécies moleculares específicas numa mistura de outros compostos com uma estrutura molecular semelhante [19], [20].

Os biossensores demonstram várias vantagens em relação a outras técnicas de análise, por exemplo os ensaios colorimétricos. As vantagens são a rápida resposta, a menor necessidade do pré-tratamento da amostra, em alguns casos podem ser reutilizados, são fáceis de transportar e de utilizar e, por fim, uma das principais vantagens é o seu baixo custo de produção [20].

O funcionamento dos biossensores baseia-se no reconhecimento do analíto por parte de um elemento biológico, se ocorrer o reconhecimento, ou seja, se a combinação pré-estabelecida for concluída obtém-se um sinal, que pode ser eléctrico no caso dos biossensores electroquímicos. Este sinal é posteriormente processado, podendo ser filtrado e/ou amplificado. Na figura 2.3 apresenta-se uma imagem esquemática do funcionamento de um biossensor [21].

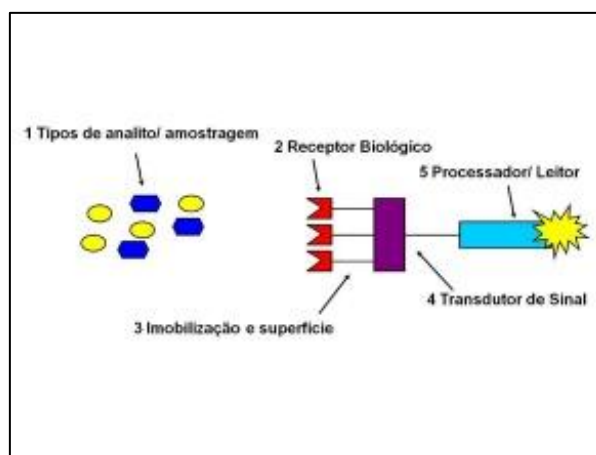


Figura 2.3. Imagem esquemática do funcionamento de um biossensor [22].

Para a construção do biossensor é necessário imobilizar o elemento biológico sobre o transdutor. Existem quatro técnicas de imobilização de elementos biológicos sobre o transdutor: aprisionamento da membrana, encapsulamento da matriz, ligações covalentes e adsorção física. A adsorção física depende

da combinação das forças de *Van der Waals*, forças hidrofóbicas, pontes de hidrogénio e forças iónicas para estabelecer uma ligação entre o biomaterial e a superfície do sensor [20].

Os biossensores são classificados segundo o seu mecanismo de transdução do sinal. Segundo esta premissa: ópticos, piezoelétricos, térmicos e electroquímicos. Os biossensores electroquímicos dividem-se em os que são sensíveis á corrente eléctrica, ao potencial eléctrico e á mudanças de condutividade:

- 1) **Biossensores amperimétricos**, os quais determinam a corrente eléctrica associada aos electrões envolvidos em processos redox;
- 2) **Biossensores potenciométricos**, estes utilizam eléctrodos selectivos a iões para determinar a alteração da concentração do ião seleccionado;
- 3) **Biossensores condutimétricos**, estes permitem determinar mudanças de condutância associadas ao ambiente iónico.

Durante este trabalho experimental teve-se como objectivo o desenvolvimento de um biossensor amperimétrico [20]. Estes últimos constituem uma das maiores classes destes dispositivos, os quais nas últimas décadas tem sofrido um avanço significativo, ao longo de três gerações de dispositivos (**figura 2.4**) [23].

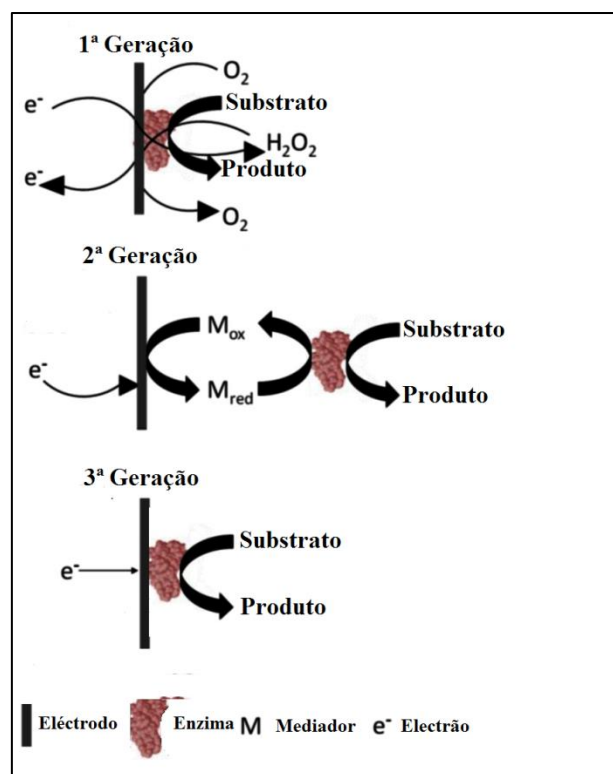


Figura 2.4 Imagem esquemática da 1ª, 2ª e 3ª geração de Biossensores [24].

Os biossensores de 1ª geração eram baseados na electroactividade do substrato ou do produto de reacções enzimáticas, mas revelavam ter alguns inconvenientes, entre os quais ter se de aplicar um elevado potencial, o qual é prejudicial devido ao aparecimento de sinais de interferência de compostos facilmente oxidáveis. Este facto levou ao uso dos mediadores redox nos chamados biossensores de 2ª geração. Os mediadores electroquímicos são pequenas moléculas redox activas, que podem difundir e reagir com o sítio activo da enzima, difundindo-se posteriormente para fora da enzima e reagindo com a superfície do eléctrodo, transportando assim os electrões entre a enzima e o eléctrodo. No entanto, os mediadores usados em conjunto com as enzimas redox, facilitam não só a transferência de electrões entre a enzima e o eléctrodo, mas também facilitam as reacções com potenciais interferentes [23],[25].

Os biossensores de 3ª geração são baseados na transferência directa de electrões, ou seja o electrão é transferido directamente do eléctrodo para o sítio activo da proteína e vice-versa. Neste tipo de sistema, o processo global é acoplado á transformação redox do substrato, considerando-se que o processo no eléctrodo é catalisado pela proteína, não podendo assim a transformação enzimática e a reacção no eléctrodo serem consideradas reacções separadas [23],[25]. A principal vantagem dos biossensores de 3ª geração é a ausência de mediadores, proporcionando assim uma selectividade elevada, já que os eléctrodos funcionam a um potencial perto do potencial redox da própria enzima e por conseguinte, menos propenso às reacções dos interferentes.[25]

Neste trabalho pretendeu-se desenvolver um biossensor de 3ª geração, em que a proteína escolhida foi o citocromo *c*, a qual é descrita na próxima secção.

2.2.1. Citocromo *c*

O citocromo *c* (Cit *c*) está presente em todos os organismos que têm cadeias respiratórias mitocondriais: vegetais, animais e microrganismos eucarióticos [26], [27].

O Cit *c* é uma proteína solúvel em água com um grupo prostético (o hemo *c*) porfirínico com ferro. Sendo um dos principais membros da cadeia respiratória biológica, onde actua como transportador de electrões das proteínas, da membrana interna da mitocôndria, recebendo electrões do Cit *c* redutase e transferindo os para o Cit *c* oxidase [28], [29].

Esta proteína, tem mais que uma função nos organismos vivos. Neste caso além da função relatada no parágrafo anterior, funciona como iniciador da cascata bioquímica que provoca a apoptose mitocondrial e participa na eliminação do peróxido de hidrogénio (H₂O₂). Em laboratório o Cit *c* tem sido usado como modelo para estudos de desnaturação de proteínas, mas também foi a primeira proteína redox a ser estudada através de técnicas electroquímicos, sendo ainda hoje uma das proteínas mais populares neste tipo de testes e aplicações [30], [27],[29].

Na **figura 2.5.A** visualiza-se a estrutura secundária e terciária do citocromo *c* de coração de cavalo. O citocromo *c* é uma proteína globular constituída por cerca de 40% de hélices α , sendo as duas principais,

a hélice N- e o C-terminal, existindo entre estas duas interações não covalentes que são fundamentais para a estabilização do estado nativo da proteína [23],[29].

O hemo (**figura 2.5B**) pode apresentar diferente número de estados de redução. Na vizinhança do hemo existem grupos de lisina carregados positivamente que criam interações electrostáticas com grupos funcionais negativos. Por si só, o hemo apresenta várias características catalíticas, as quais mudam drasticamente quando incorporados em ambientes proteicos, o que cria excelentes oportunidades para as proteínas hémicas e as enzimas hémicas nas aplicações bioelectroquímicas, nomeadamente nos biossensores de 3ª geração [23].

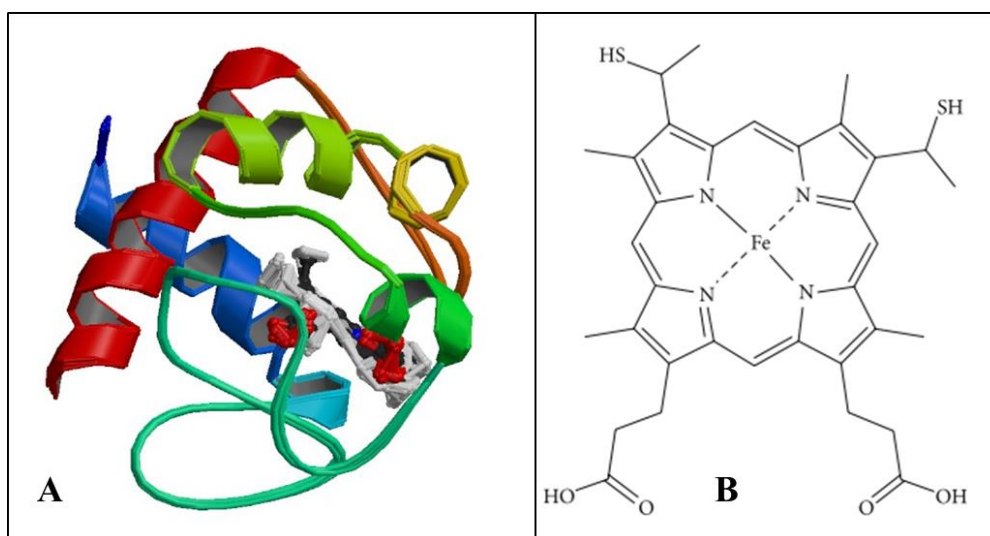


Figura 2.5. A) Estrutura do citocromo c de coração de cavalo oxidado (estrutura retirada de “*Protein Data Bank*”) [31]. B) Estrutura do grupo protético (hemo c) do citocromo c [29].

O cit *c* tem túneis de transporte de electrões entre o sítio activo da proteína e a sua superfície, facilitando assim a troca electrónica e tornando esta proteína um bom candidato para ser usado em biossensores de 3ª geração [32].

Estudos electroquímicos desta proteína redox revelaram que a orientação da proteína, mais especificamente do hemo, na superfície do eléctrodo é de extrema importância, de modo a que os processos de transferência electrónica sejam electroquimicamente reversíveis (conceito abordado á frente) e o sinal seja suficientemente intenso de modo a ser visualizado na janela de potencial usado. Na presença de um composto carregado negativamente sobre a superfície do eléctrodo, ocorre fortes interações electrostáticas entre o citocromo c e a superfície do eléctrodo, o que resulta em distâncias mais curtas, para a transferência electrónica [33].

2.2.2. Peróxido de Hidrogénio

O peróxido de hidrogénio (H_2O_2) na **figura 2.6**, em solução aquosa é conhecido comercialmente como água oxigenada. O H_2O_2 é empregue em processos de branqueamento nas indústrias têxtil, do

papel e da celulose [34]. Na medicina é extremamente importante a monitorização do H_2O_2 , já que na presença deste composto as células sofrem histerese, adicionalmente considera-se que esta substância funciona como mediador bioquímico em patologias celulares como o envelhecimento e em doenças neurodegenerativas progressivas, mais especificamente a doença de *Parkinson* [35],[18]. Para além de todos os processos que se falaram até aqui onde o H_2O_2 participa, ainda está envolvido nas cascatas de sinalização das plantas, incluindo a resposta agentes patogénicos, mas também na área alimentar e na indústria farmacêutica [36],[37], [38],[39].

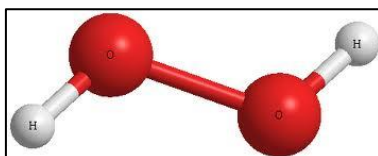
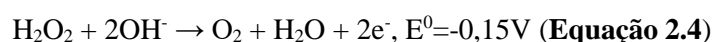
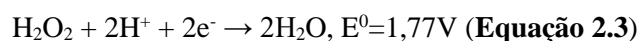


Figura 2.6. Estrutura do H_2O_2 [40].

O H_2O_2 é um dos oxidantes mais versáteis que existe, com um poder oxidante superior ao cloro, dióxido de carbono e permanganato de potássio. Além de ser agente oxidante o H_2O_2 (equação 2.3) pode também ser utilizado como agente redutor (equação 2.4) [41].



Apesar do H_2O_2 ser bastante reactivo, é um metabolito natural em muitos organismos, o qual quando decomposto resulta em oxigénio molecular e água [42], [43].

O H_2O_2 é reconhecido como o oxidante mais eficiente na conversão do dióxido de enxofre (SO_2) no ião sulfato (SO_4^{2-}), sendo este último composto um dos maiores responsáveis pela acidez da água da chuva. Outro aspecto que alguns estudos têm demonstrado é o facto da formação do peróxido de hidrogénio na chuva poder estar relacionada com a presença de certas espécies químicas tais como, o ião sulfato (SO_4^{2-}), o ião nitrato (NO_3^-) e o ião hidrogénio (H^+), mas também com o nível de precipitação das chuvas, a temperatura, a direcção do vento, a intensidade da radiação solar, etc [44], [45].

A desprotonação de um anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) também pode resultar na formação do peróxido de hidrogénio. O $\text{O}_2^{\bullet-}$ forma-se através da redução do oxigénio em água naturais, onde as substâncias absorvem luz e geram electrões livres através da fotoionização ou da redução de oxigénio, por transferência de energia do estado excitado [46]. Na área ambiental, nomeadamente, no tratamento de efluentes pode-se usar uma técnica que se baseia na geração do radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), este tem um alto poder oxidante e pode promover a degradação de vários compostos poluentes, em pouco tempo. Os radicais hidroxilo podem ser sintetizados, através da catálise, do peróxido de hidrogénio [46].

O H_2O_2 pode ser determinado através de várias técnicas: titulação, espectrofotometria, fluorimetria, quimiluminescência, fibra óptica, cromatografia e métodos electroquímicos. Com excepção dos métodos electroquímicos, todos os outros aqui citados são vulneráveis a interferentes, têm um tempo de resposta elevado e geralmente requerem o uso de reagentes com um elevado custo.[47],[48].

Nesta secção ficou patente que o peróxido de hidrogénio participa em inúmeros processos, os quais carecem de uma monitorização (em meio líquido) rápida, problema que se tenta resolver com este trabalho.

2.3. Revisão dos conceitos electroquímicos

Nesta secção faz-se uma revisão dos conceitos em que se baseiam as técnicas electroquímicas, aplicadas neste trabalho.

2.3.1. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é a técnica mais utilizada para a aquisição de informações qualitativas sobre as reacções electroquímicas. O poder da voltametria cíclica reside na sua capacidade de fornecer, rapidamente, informações importantes sobre a termodinâmica dos processos redox, a cinética das reacções de transferência electrónica heterogénea e sobre as reacções de acoplamento ou processos de adsorção. A voltametria cíclica, num primeiro estudo electroanalítico, proporciona a determinação dos potenciais formais de redução (E^0) das espécies electroactivas e avaliação dos mecanismos reaccionais dos processos redox [49].

Esta técnica consiste em fazer variar linearmente o potencial de um eléctrodo de trabalho, segundo uma onda em formato triangular. Dependendo da informação que se pretende, pode-se aplicar um único ciclo ou múltiplos ciclos. Durante o varrimento do potencial, o potencióstato mede a corrente resultante do potencial aplicado. O resultado é uma curva da corrente em função do potencial, que é denominada voltamograma cíclico. Este gráfico é uma função complexa dependente do tempo e de um grande número de parâmetros físicos e químicos [49].

A **figura 2.7** ilustra a resposta que se espera de um par redox reversível durante um único ciclo (inicialmente assume-se que a única espécie presente é a oxidada O). Assim, um potencial positivo é escolhido para a primeira metade do ciclo, a partir de um valor em que não ocorra a redução. À medida que o potencial é aplicado e se aproxima de E^0 característico para o processo redox, a corrente catódica começa a diminuir, até se formar um pico. Depois de atravessar a região de potencial onde processo de redução ocorre (pelo menos $90/n$ (numero de electrões) mV para além do pico), a direcção de varrimento do potencial é invertida. Durante o varrimento inverso, as moléculas reduzidas (R), geradas a meio do ciclo e acumuladas perto da superfície, são oxidadas de volta a O, resultando num pico anódico [50].

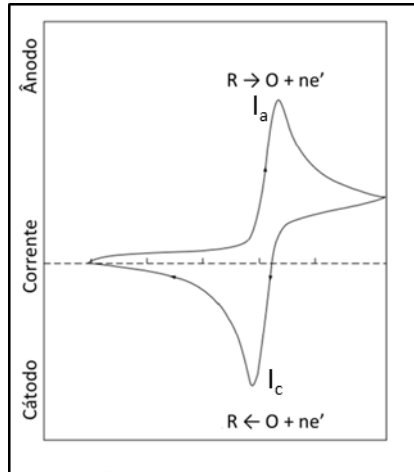


Figura 2.7. Voltamograma cíclico típico de um processo redox reversível [51].

Os picos característicos no voltamograma cíclico são provocados pela formação de uma camada de difusão na superfície do eléctrodo. A difusão depende de perfis distância-concentração durante o varrimento do potencial. Mais especificamente, quando existe uma mudança contínua da concentração na superfície do eléctrodo, ocorre uma expansão da espessura da camada de difusão. Os picos de corrente vão reflectir a mudança do gradiente da concentração com o tempo. Assim, o aumento da corrente no pico corresponde ao controlo da difusão, enquanto a queda da corrente (além do pico) exhibe um perfil dependente de $t^{-1/2}$ (independentemente do potencial aplicado) [52].

As reacções electroquímicas seguidas pela técnica de voltametria cíclica podem ser classificadas reversível, irreversível e quase-reversível, conforme abaixo descrito [52].

Sistema reversível

Neste tipo de sistema a corrente do pico de um par redox reversível (a 25°C) é dada pela equação de *Randles-Sevcik* (**equação 2.5**):

$$I_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \text{ (Equação 2.5)}$$

Onde n é o número de electrões, A a área do eléctrodo (em cm^2), C é a concentração (em mol/cm^3), D é o coeficiente de difusão (cm^2/s) e v é a velocidade de varrimento (V/s). Por conseguinte a corrente é directamente proporcional á concentração e aumenta com a raiz quadrada da velocidade de varrimento, tal dependência da velocidade de varrimento indica que a reacção no eléctrodo é controlada pelo transporte de massa (difusão linear semi infinita). A razão da corrente do pico ânodo ($I_{p,a}$) com a corrente do pico do cátodo ($I_{p,c}$) deve ser unitária, para um par redox reversível. Os picos de corrente são normalmente subtraídos da corrente da linha de base [53].

A posição dos picos no eixo do potencial (E_p) está relacionada com os potenciais formais do processo redox. O potencial formal para um par redox reversível está centrado entre o $E_{p,c}$ e o $E_{p,a}$ (**Equação 2.6**):

$$E^0 = \frac{E_{p,c} + E_{p,a}}{2} \quad (\text{Equação 2.6})$$

A separação dos potenciais dos picos (para um par redox reversível) é dado por (**Equação 2.7**):

$$\Delta E_p = E_{p,c} - E_{p,a} = \frac{0,059}{n} \text{ V} \quad (\text{Equação 2.7})$$

Assim, a separação dos picos pode ser usada para determinar o número de electrões transferidos e sendo ainda um critério para avaliar o comportamento *Nernstiano*. Este comportamento é descrito pela equação de *Nernst*, que relaciona o potencial (E em V) com a concentração das espécies electroactiva (C_O e C_R em M) na superfície do eléctrodo (**Equação 2.8**), á temperatura ambiente (25 °C):

$$E = E^0 + \frac{0,059}{n} \log \frac{C_O}{C_R} \quad (\text{Equação 2.8})$$

Onde n o número de electrões. Por conseguinte, um processo onde ocorre a troca rápida de um electrão tem um ΔE_p igual a 59 mV. Tanto o potencial do pico do cátodo como do pico do ânodo são independentes da velocidade de varrimento [51].

No caso da transferência electrónica em vários passos (reversíveis), o voltamograma cíclico consiste em vários picos distintos, se os valores de E^0 para os passos individuais forem sucessivamente mais elevados e bem separados [54].

A situação é muito diferente quando reacção redox é lenta ou acoplada com uma reacção química. Com efeito, são esses processos “não ideais” que geralmente são de maior interesse químico e para o qual o diagnostico por voltametria cíclica é mais útil. Tal informação é normalmente obtida por comparação dos voltamogramas experimentais com os teóricos (simulados) [53].

Sistema irreversível ou quase reversível

Nos processos irreversíveis (onde a troca de electrões é lenta) os picos são reduzidos no tamanho e amplamente separados (**Figura 2.8.A**). Estes sistemas totalmente irreversíveis são caracterizados por uma mudança de potencial do pico com a velocidade de varrimento, descrito pela **Equação 2.9**:

$$E_p = E^0 - \frac{RT}{\alpha n_a F} \left[0,78 - \ln \frac{k^0}{D^{1/2}} + \ln \left(\frac{\alpha n_a F v}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad (\text{Equação 2.9})$$

Onde k^0 é a constante de velocidade para uma reacção heterogénea (em cm/s), α é o coeficiente de transferência de carga e n_a o número de electrões envolvidos na etapa da transferência de carga. Assim E_p ocorre a potenciais mais altos do que o E^0 , estando o sobrepotencial relacionado com k^0 e o α . Independentemente do valor de k^0 , o deslocamento do pico pode ser compensado por uma alteração adequada da velocidade de varrimento. O potencial do pico e o potencial de meio pico (a 25°C) terá uma diferença de $48/\alpha n$ mV, portanto o voltamograma torna-se mais alongado quando αn diminui [51].

Quando a corrente do pico é dado por **(Equação 2.10)**:

$$I_p = (2,99 \times 10^5) n (\alpha n_a)^{1/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \text{ (Equação 2.10)}$$

Nesta equação a corrente do pico ainda é proporcional à concentração, mas a sua altura será menor (dependendo do valor de α). Com efeito neste tipo de sistema a corrente do pico é cerca de 80% mais baixa do que no sistema reversível [52].

Nos sistemas quase reversíveis **(Figura 2.8 B)** (com $10^{-1} < k^0 < 10^{-5}$ cm/s) a corrente é controlada pela transferência de carga e pelo transporte de massa. A forma do voltamograma cíclico é uma função de $k^0/\sqrt{\pi a D}$ (onde $a = nFv/RT$). Quando $k^0/\sqrt{\pi a D}$ aumenta, o processo aproxima-se do caso reversível. No caso inverso, ou seja, para pequenos valores de $k^0/\sqrt{\pi a D}$ (isto é para um valor muito rápido de velocidade de varrimento), o sistema aproxima-se de um sistema irreversível. Em geral os voltamogramas de um sistema quase reversível (figura 2.8 B) são mais alongados e apresentam uma maior separação entre potenciais dos picos, em comparação com o sistema reversível [51].

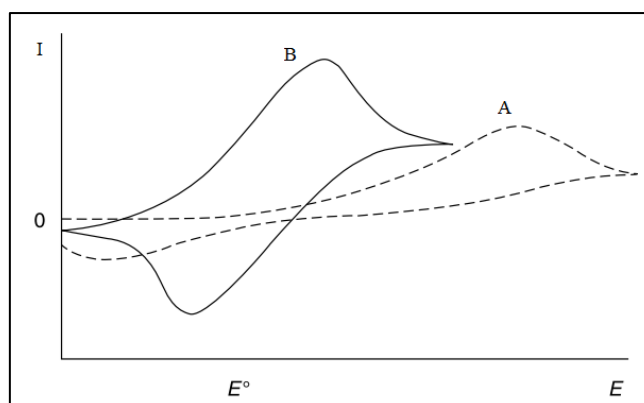


Figura 2.8. A) Voltamograma cíclico de um sistema irreversível, B) Voltamograma cíclico de um sistema quase reversível [51].

2.3.2. Cronoamperometria

Esta técnica envolve a aplicação de um valor fixo de potencial, no eléctrodo de trabalho, ao qual ocorre o processo faradaico. Na cronoamperometria, monitoriza-se a dependência da corrente em função do tempo. Nestas condições, o transporte de massa ocorre apenas por difusão e a curva da corrente em

função do tempo reflecte a alteração do gradiente de concentração na vizinhança da superfície do eléctrodo. Este facto provoca um aumento gradual da camada de difusão associada ao esgotamento do reagente, e portanto, diminui o perfil de concentração em função do tempo. Por conseguinte, a corrente decai com o tempo, comportamento descrito pela equação de *Cottrell* (**Equação 2.11**):

$$I(t) = \frac{nFACD^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} = kt^{1/2} \quad \text{(Equação 2.11)}$$

Onde n é o número de electrões, F é a constante *Faraday*, A é área superficial, C é concentração D é o coeficiente de difusão e t o tempo. Desvios ao comportamento de *Cottrell* podem ocorrer em períodos de tempo longos (geralmente acima 100 s), como consequência de efeitos naturais de convecção, devido a existir reacções químicas acopladas, quando os eléctrodos não são planares ou quando se utiliza microeléctrodos. Neste último caso, a corrente é independente do tempo (proporcional á concentração) sendo obtida para $t > 0,1$ s, devido a uma grande contribuição da difusão radial. Considerações semelhantes podem ser aplicadas a eléctrodos esféricos cuja resposta após aplicação do potencial, contém termos dependentes do tempo e termos independentes do tempo. No caso da aplicação de períodos de tempo curtos ($t < 50$ ms), o sinal cronoamperométrico contém uma contribuição adicional da carga da corrente. O decaimento exponencial da carga da corrente é a principal contribuição para a resposta na ausência de espécies electroactiva [51], [52].

A técnica da cronoamperometria é frequentemente usada na determinação de coeficientes de difusão das espécies electroactiva ou a área da superfície do eléctrodo de trabalho. Em termos práticos, esta técnica é aplicada em análises quantitativas e no estudo do mecanismo do processo no eléctrodo [51].

2.3.3. Espectroscopia de impedância

A espectroscopia de impedância é uma técnica que permite analisar as características dos eléctrodos quimicamente modificados e compreender as taxas das reacções electroquímicas. A impedância é a resistência de um determinado complexo, encontrada quando uma corrente passa através de um circuito constituído, por combinações de resistências e condensadores ou indutores. As transformações electroquímicas que ocorrem na interface solução/eléctrodo podem ser modeladas, utilizando componentes de um circuito electrónico equivalente que corresponde ao espectro de impedância experimental. O modelo do circuito electrónico equivalente de *Randles* e *Ershler* é particularmente útil a modelar fenómenos interfaciais (**figura 2.9 A**) [52].

O modelo do circuito electrónico equivalente inclui a capacitância da dupla camada C_d , a resistência ohmica da solução de electrólito R_s , a resistência á transferência de electrões R_p e a impedância de *Warburg* W . Estes parâmetros são resultantes da difusão de iões da solução para a superfície do

eléctrodo. A impedância da interface, derivada através da aplicação da lei de Ohm, consiste em duas partes, um número real Z' e um número imaginário Z'' (**Equação 2.12**) [54]:

$$Z(W) = R_s + R_p / (1 + w^2 R_p^2 C_d^2) - j w R_p^2 C_d / (1 + w^2 R_p^2 C_d^2) = Z' + j Z'' \text{ (Equação 2.12)}$$

$$j = \sqrt{-1}$$

A espectroscopia de impedância envolve a aplicação de uma pequena amplitude perturbando o sinal da tensão sinusoidal (a uma frequência w), resultando numa corrente. O espectro de impedância faradaica (**figura 2.9. B**), conhecido como um diagrama de “*Nyquist*”, corresponde á dependência do número imaginário no número real, e contém informações extensivas sobre a interface electrificada e a reacção de transferência de electrões [51].

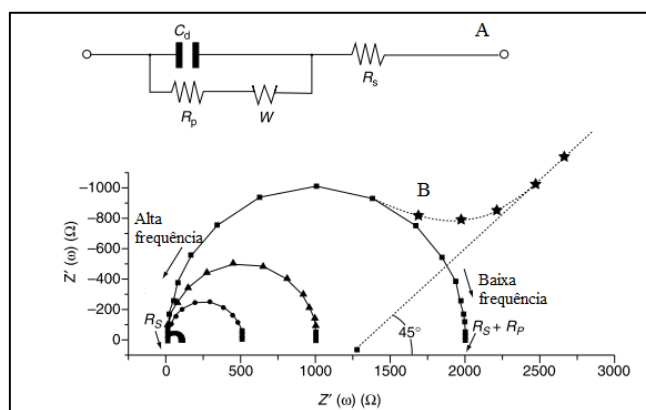


Figura 2.9. A) Modelo do circuito electrónico equivalente. B) Espectro de impedância faradaica presente na forma de curvas “Nyquist” [51].

Os diagramas de “*Nyquist*” dos processos controlados por difusão, geralmente, incluem uma região de semicírculo que se encontra no eixo, seguido de uma linha recta. A região do semicírculo (observado para frequências mais altas) corresponde ao processo de transferência de electrões limitada, enquanto a região da linha recta (onde é característico as baixas frequências) representa o processo de difusão limitada. Estes espectros são usados para determinar a cinética da transferência de electrões e as características dos processos de difusão. Por conseguinte, no caso em que a transferência electrónica é muito rápida, o espectro de impedância apenas apresenta a parte linear, enquanto no caso da transferência de electrões ser muito lenta, o espectro de impedância apenas vai apresentar um grande semicírculo. O diâmetro do semicírculo é igual á resistência da transferência de electrões. A intercepção do semicírculo com o eixo do Z' corresponde ao parâmetro R_s [53].

Esta técnica além de ser usada, neste trabalho, em estudos electroquímicos fundamentais, é também usada em imunossensores e em biossensores de DNA [51].

3. Parte Experimental

3.1. Reagentes, equipamentos e materiais

Reagentes: Tungstato de sódio ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) – Fluka 99,0 %; Ácido clorídrico (HCl) – Sigma-Aldrich 37 %; Cloreto de sódio (NaCl) – MERCK 99,5 %, Sulfato de sódio (Na_2SO_4) – Panreac 99 %; Água ultrapura – Milipore, Lavagem do substrato: Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) – AGA 96 %; Síntese: Etanol absoluto ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) – Fisher Chemical; Isopropanol ($\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$) – AGA 99,5 %; Etileno glicol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$) – ROTH 99,5 %; Polivinilpirrolidona ($(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n$) – PVP10 Sigma Aldrich; Poli(3,4-etilendioxitiofeno)-poli(estireno sulfonato) (Pedot/Pss) – Sigma Aldrich 1,3 % (p/p); Citocromo *c* (Cit. *c*) de coração de cavalo – Sigma Aldrich 95 %; Triton X-100 – BAKER ANALYSED; Cloreto de potássio (KCl) – José M. Vaz Ferreira, S.A; Ferricianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) – Roth 99% ; Metilsulfato-5-fenazina (PMS ou $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2 \cdot \text{CH}_3\text{SO}_4$) – Sigma Aldrich 98%; Ácido ferroceno carboxílico ($\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{FeO}_2$) – Sigma Aldrich 98%; Citocromo *c* (Cit *c*) de coração de cavalo – Sigma Aldrich 95 %; β -Nicotiamida adenina dinucleotido (NADH) – Sigma Aldrich 98 %; Hemoglobina (Hb) – Sigma Aldrich; Peróxido de hidrogénio (H_2O_2) – Fisher chemical 30 % (p/v); Nitrito de sódio (NaNO_2) – Sigma Aldrich 97 %.

Tampão Tris-HCl: Tris base ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) – Sigma Aldrich; Tampão fosfato: Fosfato de sódio monobásico ($\text{H}_2\text{NaO}_4\text{P}$) – Sigma Aldrich; fosfato de potássio dibásico trihidratado ($\text{HK}_2\text{O}_4\text{P} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) – Sigma Aldrich; Tampão citrato: Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) – Sigma Aldrich puro; Citrato de sódio dihidratado – Roth 99 %.

Equipamento: Placa térmica Heidolph MR Hei-Tec, Balança analítica OHAUS, Microondas Discover Synthesis Platform® da CEM Corporation, Centrifugadora Focus instruments, Estufa EHRET TK 4067, Aparelho de aplicação de filme BYK, Ultrassons Bandelin sonorex, Sonicador scansci sonics vibra cell, Balança analítica OHAUS, Impressora Xerox ColorQube 8570, Sistema RF magnetron sputtering, Micro-ondas Discover Synthesis Platform® da CEM Corporation, Sistema UV ozono digital NOVASCAN série PSD, Potencióstato - (600TM Gamry Instruments); Programa para o tratamento dos dados obtidos no potencióstato - Gamry Echem Analyst; Medidor de pH HANNA instruments 220.

Material: Vidro com ITO (do inglês “*Indium Tin Oxide*”) – Xyn Yan Technology Limited; FTO (do inglês “*Fluorine Tin Oxide*”) – Sigma Aldrich, Papel de “screen printing” – FS2, Papel de carbono – QUINTECH GDL 240, folha de kapton - Dupont.

3.2. Síntese das nanopartículas (nP's) de óxido de tungstênio (WO₃)

As nP's de WO₃ foram sintetizadas por um processo hidrotermal com radiação de micro-ondas. Para a síntese das nP's de WO₃ foi usado o tungstato de sódio desidratado (Na₂WO₄·2H₂O), como precursor, tendo este sido obtido comercialmente e dois sais diferentes, o cloreto de sódio (NaCl) e o sulfato de sódio (Na₂SO₄) como agentes directores de estrutura (ADE). Para cada ADE com o precursor foram preparadas soluções com um pH de 1,8 (utilizando para tal uma solução de ácido clorídrico (HCl) a 3M) e um volume final de 18 mL. As quantidades usadas de cada reagente são apresentadas na **tabela 3.1**.

Tabela 3.1. Reagentes e respectivas quantidades usadas para a síntese das nP's de WO₃.

Agente direccional de estrutura	Quantidade (g)	Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O (g)	[HCl] = 3M (g)
NaCl	0.3	0,8	2
Na ₂ SO ₄	0.72		

As soluções preparadas anteriormente são transferidas para recipientes de 35ml, seladas e colocadas no micro-ondas (**figura 3.1 A e B**).



Figura 3.1. A) Micro-ondas usado na síntese das nP's de WO₃ (marca: Discover Synthesis Platform® da CEM Corporation). B) Recipiente apropriado para o micro-ondas.

De modo a otimizar a síntese das nP's foram estudadas diferentes condições reaccionais (potência fixa e temperatura fixa) no micro-ondas, as quais são apresentadas na **tabela 3.2**, tendo-se optado por usar a potência fixa de 75 W durante 120 minutos (min) para a síntese das nP's de WO₃.

Tabela 3.2. Condições testadas no micro-ondas. A condição escolhida encontra-se a negrito.

Condição Usada	Tempo (min)	Temperatura máxima (°C)	Pressão máxima (psi)
Temperatura fixa (°C)	150	60	150
	50	60	300
Potência fixa (W)	75	90	200
	120	60	
	100	60	300

No final das reacções, as amostras foram lavadas 3 vezes em água destilada e recolhidas por centrifugação (4000 rpm, 45 minutos) e a seguir foram secas na estufa (80°C, 12h). Os aglomerados obtidos foram reduzidos a um pó fino num almofariz, para posterior caracterização e aplicação no eléctrodo para ensaios electroquímicos.

3.3. Construção do sensor modificado

Nesta secção descreve-se os processos de modificação dos eléctrodos, desde a aplicação das nP's até a adsorção da proteína redox.

3.3.1. Construção do eléctrodo

Para a construção dos eléctrodos depositou-se a solução de nP's de WO_3 no substrato, pela técnica *doctor blade*, utilizando o aparelho de aplicação de filmes (**figura 3.2**), no qual se usou o rolo nº2419 a uma velocidade de 50 mm/s.



Figura 3.2. Aparelho de aplicação de filmes (marca: BYK).

Para o processo de deposição foi usada uma solução inicial com uma concentração de 5% (p/p) de nP's de WO_3 em etanol. De modo a melhorar a aderência das nP's de WO_3 ao substrato, experimentou-se misturar um polímero na solução inicial de nP's de WO_3 (sintetizadas com Na_2SO_4). Para isso foram testados dois polímeros o pvp (polivinilpirrolidona) e o pedot/pss (Poli(3,4-etilendioxitiofeno)-poli(estireno sulfonato)) nas concentrações de 1,5 % (p/p), 5 % (p/p) e 15 % (p/p). Tendo-se ainda testado a preparação de eléctrodos com uma camada e três camadas, das soluções de nP's de WO_3 com e sem polímero.

Os eléctrodos ainda foram submetidos a um processo de secagem a 80°C, os eléctrodos com uma camada secaram 12 h, enquanto os eléctrodos com três camadas secaram 1 h entre camadas, com excepção da terceira camada, após a qual o eléctrodo secou 12h.

O substrato predominantemente usado no processo de desenvolvimento foi vidro revestido com óxido de índio estanho (ITO do inglês *Indium Tin Oxide*). Este foi cortado em tiras com a largura de 1,5 cm e lavado no aparelho de ultra-sons, pela seguinte ordem: água com detergente, etanol e por fim, isopropanol, durante 45 min a 65°C. Este substrato ainda foi submetido a um tratamento de 30 min no sistema ultravioleta (UV) ozono.

Foram testados outros substratos, nomeadamente: papel de *screen printing* o qual foi depositado com uma camada de óxido de índio estanho (IZO do inglês *indium zinc oxide* mas também foi testado com ouro; papel de carbono e Kapton com grafeno. Estes substratos foram cortados em tiras com 1,5 x 5 cm e depositados com uma camada da solução inicial de nP's de WO₃ (sintetizadas com o Na₂SO₄) com 1.5 % de PVP.

Por fim foi testado o crescimento directo das nP's de WO₃ (sintetizadas com Na₂SO₄) no vidro revestido com ITO e com óxido de fluor estanho (FTO do inglês *Fluorine Tin Oxide*). Para isso os vidros são colocados na solução inicial, usada para a síntese das nP's de WO₃ (descrita na secção 3.2), no recipiente apropriado para o micro-ondas, tendo-se aplicado uma potência fixa de 75W durante 1h. No fim da síntese lavou-se o eléctrodo abundantemente com água ultrapura de modo a remover as nP's que não estão bem agarradas.

3.3.2. Adsorção da proteína citocromo *c*

Nesta fase foram usados os eléctrodos cobertos com uma camada da solução inicial das nP's de WO₃ (sintetizadas com Na₂SO₄), 1,5 % PVP em etanol.

O citocromo *c* foi adsorvido aos eléctrodos por 2 protocolos diferentes. No primeiro mergulhou-se o eléctrodo numa solução de 500 µM de citocromo *c* durante 2h, após o qual se retirou o eléctrodo e se deixou secar a temperatura ambiente (T.A). No segundo protocolo depositou-se sobre o eléctrodo, pela técnica de *drop casting*, uma solução de 95 % de 500 µM de citocromo *c* com 5 % de triton X-100, deixando-se a secar á T.A durante 3h. Na **figura 3.3** é apresentada uma imagem esquemática do sensor.



Figura 3.3. Imagem esquemática do sensor modificado

3.4. Caracterização electroquímica

O eléctrodo de nP's de WO_3 e o eléctrodo nP's WO_3/PVP foram caracterizados pelas técnicas de espectroscopia de impedância (EI), voltametria cíclica (VC) e amperometria. Estas duas últimas técnicas ainda foram usadas na caracterização do sensor modificado. As medidas foram realizadas numa célula com uma configuração de três eléctrodos, o eléctrodo com nP's de WO_3 ou eléctrodo nP's WO_3/PVP ou sensor modificado foram usados como eléctrodos de trabalho, como eléctrodo de referência foi usado um eléctrodo de Ag/AgCl e, por fim, como contra eléctrodo foi usado um fio de platina. As soluções do electrólito de suporte foram purgadas com azoto e mantida a atmosfera de azoto, na célula electroquímica, durante as medidas. As experiências foram realizadas á temperatura ambiente (20 ± 2 °C).

3.4.1 Caracterização do eléctrodo/sensor modificado

O eléctrodo de nP's de WO_3 e o eléctrodo de nP's de WO_3/PVP foram caracterizados em primeiro lugar em solução tampão 0,05 M de Tris-HCl e 0,1 M KCl a pH 7,6, por espectroscopia de impedância usando as condições de um potencial alternado de 10 mV numa gama de frequências de $1-10^6$ Hz, por voltametria cíclica numa gama de velocidades de varrimento de 10-250 mV/s.

Os eléctrodos foram testados por VC usando como prova redox, três mediadores diferentes. Os VC's foram traçados numa gama de velocidades de varrimento entre 10-250 mV/s. Uma solução aquosa de 1mM de ferricianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) e 1 M de KCl. Em segundo temos a solução aquosa de 2 mM de Metilsulfato-5-fenazina (PMS) e por fim temos o ácido carboxílico ferroceno ($\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{FeO}_2$) em solução aquosa mas também se experimentou dissolver em tampão citrato a 0,1 M a pH 7,0, numa concentração 2mM com 1M KCl.

Os eléctrodos ainda foram testados em moléculas biológicas por VC. A proteína citocromo c foi usada em solução na concentração de 500 μM , em tampão 50 mM de Tris-HCl a pH 7.6 e 0.1 M KCl. Este procedimento foi também aplicado aos eléctrodos de papel, descritos na seção 3.3.1. No caso do sensor modificado (onde o citocromo c está adsorvido ao eléctrodo) é usado como electrólito de suporte o tampão 0.1M de fosfato a pH 6,1, a VC em ambos os casos deu-se a uma gama de velocidades de varrimento entre 10-1000 mV/s. O cofactor β -Nicotiamida adenina dinucleotido (NADH) na forma reduzida, foi outra das substâncias biológicas testadas, para isso o NADH foi dissolvido em tampão 0,05 M de tris-HCl a pH 8.5 e 0.1 M KCl. A hemoglobina foi testada na concentração de 4 mg/ml em tampão fosfato 0.1M a pH 6,1.

3.4.2 Teste da actividade catalítica do peróxido de hidrogénio.

Os testes da detecção do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) pelos sensores modificados foram realizados em tampão 0,1 M de fosfato a pH 6,1, para tal adicionou-se alíquotas de uma solução de H_2O_2 e variou-se a concentração numa gama de 200-30000 μM . Após a estabilização por VC, monitorizou-se a adição de H_2O_2 também por VC a uma velocidade de varrimento de 750 mV/s. Mas também se monitorizou a adição do H_2O_2 por amperometria, aplicando um potencial de - 0,3 V durante 360 s por adição de H_2O_2 . Na **figura 3.4** observa-se a imagem real e esquemática da montagem dos eléctrodos nos testes electroquímicos descritos.

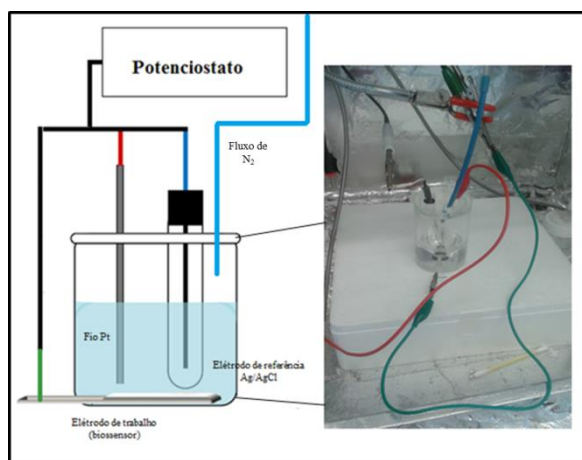


Figura 3.4. Imagem esquemática e real da montagem electroquímica na conformação dos 3 eléctrodos com o fluxo de azoto.

A concentração de H_2O_2 foi calibrada usando a absorvância a 240 nm e com um coeficiente de extinção molar de $43.6 M^{-1}.cm^{-1}$ [36].

3.4.2.1. Interferentes

Neste trabalho ainda foi verificada a interferência do nitrito, para isso adicionou-se uma concentração igual á do H_2O_2 (4,5 mM), as adições foram seguidas por amperometria aplicando um potencial de -0.3 V durante 360 s.

3.4.2.2. Amostras reais

Amostra de detergente tira-nódoas foi usada para prova de conceito do sensor modificado, para isso foram realizadas medidas amperimétricas a um potencial de -0,3V durante 360s.

Nota: As soluções tampão usadas neste trabalho laboratorial foram realizadas no laboratório e o pH ajustado com o aparelho de pH.

4. Técnicas de Caracterização

Este capítulo faz a descrição das técnicas usadas para a caracterização das nP's de WO₃, em pó, nomeadamente, por difracção de raios-X, espectroscopia de infravermelho com transformada de *fourier*, espectroscopia de *Raman*, microscopia electrónica de varrimento com feixe de iões focalizado ou SEM-FIB (do inglês *Scanning Electron Microscopie – Focused Ion beam*), dispersão dinâmica da luz, BET (*Brunauer-Emmett-Teller*), análise térmica. A caracterização do eléctrodo foi realizada por SEM-FIB, refletância, perfilometria e também por técnicas electroquímicas (princípios descritos no capítulo 2). Por fim o citocromo *c*, o NADH e a hemoglobina foram monitorizados por espectroscopia de visível - ultravioleta de modo a garantir a sua estabilidade ao longo do tempo.

4.1. Difracção de Raios-X (XRD, do inglês *X-rays diffraction*)

A difracção de raios-X é uma técnica de análise rápida, não destrutiva que permite a identificação de um material cristalino/policristalino, incluindo informações sobre a dimensão da célula unitária, os comprimentos das ligações, os ângulos das ligações e o local de coordenação.

Os raios X ao atingirem o alvo podem ser espalhados elasticamente, sem perda de energia pelos electrões do átomo (dispersão ou espalhamento coerente). O fotão do raio X após a colisão com os electrões muda de trajectória, no entanto mantêm a mesma fase e energia do fotão incidente, ou seja a onda electromagnética é instantaneamente absorvida e reemitida pelos electrões.

Se os átomos que geram o espalhamento estão organizados numa célula cristalina, na qual os átomos têm distâncias próximas do comprimento de onda da radiação incidente, pode-se verificar que as relações da fase entre os espalhamentos tornam-se periódicas e os efeitos dos raios x observam-se em vários ângulos, que se traduz no difractograma.

A difracção dos raios x (interferência construtiva) vai depender da diferença do caminho percorrido pelos raios X e o comprimento de onda da radiação incidente. Esta condição é expressa pela lei de Bragg (**equação 4.1**).

$$n \lambda = 2 d \sin\theta \text{ (Equação 4.1)}$$

onde λ corresponde ao comprimento de onda da radiação incidente, n a um numero inteiro (ordem de difracção), d a distância entre os planos cristalinos que dependem da orientação (hkl) e θ o ângulo de incidência dos raios X (medido entre o feixe incidente e os planos cristalinos). Na **figura 4.1** apresenta-se uma imagem esquemática da interferência dos raios-x com o material cristalino.

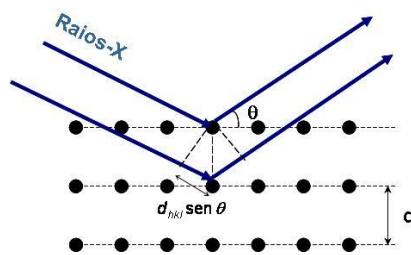


Figura 4.1. Interferência dos raios X com o material cristalino.

A identificação dos materiais é realizada por comparação do difractograma obtido com estruturas depositadas em bases de dados.

Os difractogramas foram adquiridos num intervalo de 2θ variando-se de 10 a 70° com intervalo de $0,03^\circ$. As medidas foram realizadas num difractómetro de raios-X X'Pert Pro da PANalytical, utilizando radiação à linha $K\alpha$ do cobre ($1,5406 \text{ \AA}$).

4.2. Espectroscopia de Infravermelho (IV)

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica analítica que permite a identificação de compostos inorgânicos e orgânicos. A espectroscopia de IV mede a absorção da radiação infravermelha pela amostra em função do comprimento de onda, originando a banda de absorção de infravermelho que permite a identificação dos componentes moleculares e das suas estruturas.

Os materiais quando absorvem a radiação infravermelha, provoca uma excitação das moléculas e passam de um estado de vibração de baixa energia para um estado de vibração com uma energia mais alta. Assim o comprimento de onda da luz absorvida por uma dada molécula é uma função da diferença de energia entre o estado de vibração em repouso e os estados de vibração excitado.

O espectrofotómetro de IV utiliza um interferómetro para modular o comprimento de onda a partir de uma fonte de infravermelhos. Um detector mede a intensidade da luz transmitida ou reflectida em função do comprimento de onda, obtendo-se um sinal que se traduz num interferograma. O interferograma depois de submetido num computador, origina um espectro de infravermelho. Nos espectros de IV representa-se graficamente a intensidade em função do número de onda (em cm^{-1}), sendo este último o inverso do comprimento de onda (**figura 4.2**).



Figura 4.2. Imagem esquemática dos passos para obter um espectro de IV.

Neste trabalho experimental, para realizar as medidas de espectroscopia de IV, usou-se um espectrofotômetro da *Thermo electron corporation*.

4.3. Espectroscopia de Visível - Ultravioleta (Vis-UV)

A espectroscopia Vis-UV é um dos métodos analíticos mais usados, permitindo a identificação de compostos orgânicos mas também inorgânicos. A região visível do espectro é geralmente considerada na faixa de 400 a 800 nm e a região do ultravioleta entre 200 a 400 nm. Este tipo de espectroscopia na prática expressa-se sobre a forma de espectroscopia reflectância e espectroscopia de absorção.

A espectroscopia de reflectância é o estudo da luz em função do comprimento de onda. Os fótons ao interagirem com a amostra analisada, alguns são reflectidos, outros passam através da amostra e outros são absorvidos. Os que são reflectidos da superfície da amostra podem reencontrar a superfície ou serem reflectidos para longe e esses são detectados e medidos, originando um espectro em que observamos a percentagem de luz reflectida em função do comprimento de onda (**figura 4.3**).

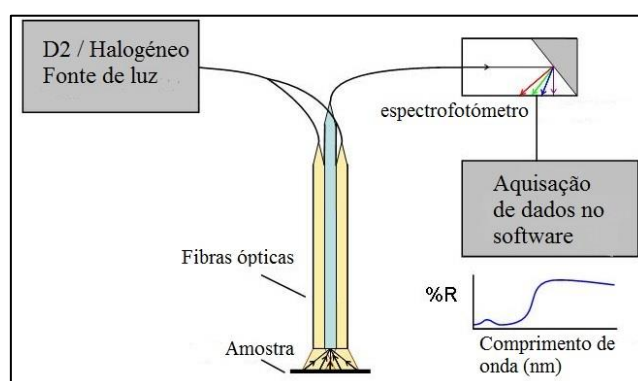


Figura 4.3. Imagem esquemática dos passos para obter um espectro de refletância.

A espectroscopia de absorção Vis – UV é uma técnica importante tanto para a identificação de grupos funcionais como para a quantificação dos compostos. As energias correspondentes a zona do visível em redor de 72 a 36 K.cal.mol⁻¹ e na região do ultravioleta em redor dos 150 a 72 K.cal.mol⁻¹, muitas vezes correspondem á diferença de energia entre estados electrónicos de muitas moléculas. A adsorção da região visível e ultravioleta depende do número e arranjo dos electrões nas moléculas ou dos iões, como consequência, o pico de adsorção pode ser correlacionado com o tipo de ligação que existe na espécie que está a ser estudada. Do ponto de vista prático, a quantificação da luz absorvida pela amostra, é descrita pela lei de Lambert – Beer (**equação 4.2**).

$$\text{Log}(I_0/I)=A=\epsilon cl \text{ (Equação 4.2)}$$

A **equação 4.2** dá-nos uma relação exponencial entre a absorção(A) de luz por uma substância e a concentração (c) dessa, assim como também entre o coeficiente de extinção molar (ϵ) e a distância (l) percorrida pela luz.

Os espectrofotómetros Vis–Uv (**figura 4.4**) tem um funcionamento semelhante aos espectrofotómetros de FTIR, um feixe de luz proveniente de uma fonte de luz visível ultravioleta, é separada em diferentes comprimentos de onda por um prisma ou rede de difracção. O feixe monocromático (constituído por um único comprimento de onda) é dividido em dois feixes de igual intensidade por um espelho, um dos feixes irá passar pela cuvete com a solução a estudar e o outro feixe irá passar pela cuvete que contém apenas o solvente da solução (referência). As intensidades dos feixes de luz são medidas pelos detectores e comparadas. A intensidade do feixe de referência, a qual deveria ter pouca ou nenhuma absorção de luz é definida como I_0 (**equação 4.2**), enquanto a intensidade do feixe da amostra é definida como I (**equação 4.2**). Em pouco tempo o espectrofotómetro percorre todos os comprimentos de onda da maneira descrita neste parágrafo.

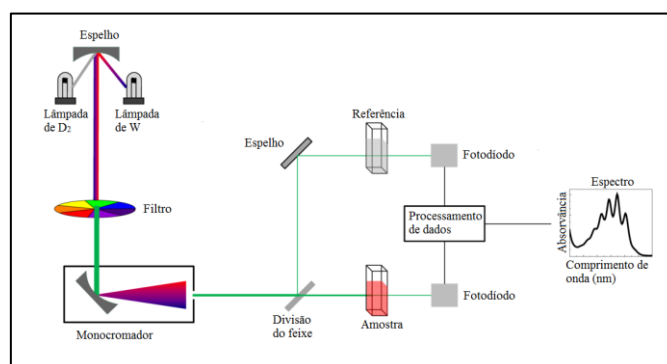


Figura 4.4. Imagem esquemática dos passos para obter um espectro de absorção.

Para estas medidas usou-se um espectrofotómetro Perkin Elmer LAMBDA 950 UV/Vis/Nir.

4.4. Espectroscopia de Raman

A espectroscopia de *Raman* é uma técnica de alta resolução que pode proporcionar informação química e estrutural de um dado material, composto orgânico ou inorgânico, permitindo assim a sua identificação.

Na espectroscopia de *Raman* a luz incidente, constituída por radiação electromagnética, pode afectar a nuvem electrónica de uma ligação molecular e fazê-la oscilar, de uma posição de equilíbrio para um nível vibracional mais alto e o respectivo regresso á posição de equilíbrio. Ao fenómeno de relaxamento e por isso o regresso da energia ao nível inicial, dá-se o nome de dispersão de *Rayleigh* (figura 4.5). Uma pequena parte da luz incidente, origina um relaxamento não elásticos, como consequência os electrões relaxam para um nível de energia mais alto ou mais baixo do que o inicial a esse fenómeno dá – se o nome de *Stokes* e *anti-Stokes* respectivamente (figura 4.5).

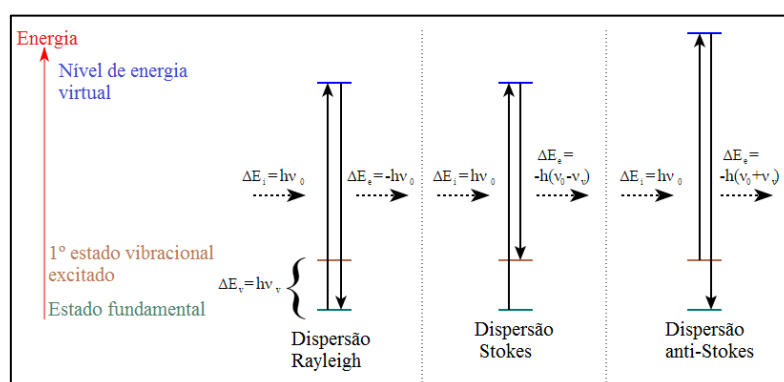


Figura 4.5. Diferentes possibilidades de dispersão de luz na espectroscopia de Raman, ΔE (diferença de energia), h (constante de Planck) e ν (frequência).

Com o objectivo de obter um espectro de *Raman*, um laser é focado sobre amostra e a luz é reemitida de volta, recolhida e filtrada para remover o comprimento de onda. A restante luz é focada sobre um espectroscópio dispersivo que separa as diferentes energias, antes de chegar ao detector. Os dados após recolhidos dão origem ao espectro de *Raman*, o qual nos dará uma relação da intensidade (a.u) em função do desvio de *Raman* (cm^{-1}).

Através desta técnica analisou-se as $\text{np}'\text{s}$ de WO_3 hexagonais, esta análise foi feita no laboratório de aplicação Raman da Horiba Scientific.

4.5. Microscopia electrónica de varrimento com feixe de iões focalizado (SEM – FIB)

A microscopia electrónica de varrimento é uma técnica poderosa e versátil de caracterização morfológica de materiais, com a qual se obtém imagens de alta resolução.

O SEM é uma técnica física que consiste na emissão de um feixe de electrões (eléctrodo negativo) por um filamento capilar de tungsténio ou de hexaborreto de lantânio, mediante a aplicação de

uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 kV, que são acelerados em direcção ao eléctrodo positivo. A correcção da direcção do feixe, nesse percurso, é realizada por lentes condensadoras que alinham o feixe em direcção á abertura da lente da objectiva. Esta última ajusta o foco do feixe antes dos electrões atingirem a amostra analisada. A imagem é assim obtida pelo varrimento do feixe electrónico incidente sobre a superfície da amostra. Depois da ampliação e processamento adequados, um detector de electrões é responsável pela geração da imagem. As imagens tanto podem ser obtidas pelo padrão de difracção de electrões secundários (emitidos pelos átomos excitados do feixe de electrões) como de electrões retrodifundidos. Quando é utilizado o padrão de electrões secundários, obtêm-se imagem da topografia da superfície, enquanto o padrão de electrões retrodifundidos, proporciona imagens com diferenças de contraste de acordo com amostra analisada, por exemplo, elementos pesados como o ferro aparecem mais claros e elementos leves como o carbono aparecem mais escuros.

As amostras para poderem ser caracterizadas por esta técnica têm de respeitar algumas condições: apresentar boa condutividade eléctrica superficial, a não existência desta condição leva á necessidade de metalização, através da aplicação de um revestimento ultrafino de ouro (Au); as amostras têm de suportar o vácuo, devido á utilização do feixe de electrões; estabilidade física e química, nas condições de observação/interacção com o feixe electromagnético. Na **figura 5.6** mostra-se uma representação esquemática de um equipamento do SEM.

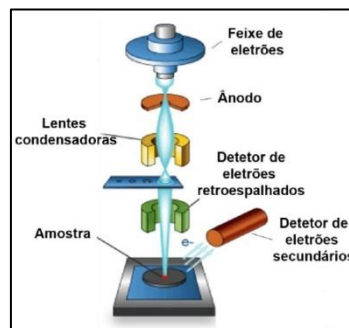


Figura 4.6. Imagem esquemática de um equipamento de SEM.

O feixe de electrões focalizado (FIB) possibilita melhores capacidades nanoanalíticas/nafabricação, como o controlo da imagem e a deposição á nanoescala. Esta técnica assemelha-se á SEM, no entanto utiliza um feixe de iões primário, em vez de electrões, na sua interacção com a amostra.

As análises foram realizadas num microscópio electrónico de varrimento Carl Zeiss Auriga Crossbeam SEM-FIB.

4.6. Dispersão dinâmica da luz (DLS, do inglês *dynamic Light Scattering*)

A dispersão dinâmica da luz é uma técnica física que permite determinar o perfil de distribuição do tamanho das partículas, nomeadamente de pequenas partículas em suspensão e polímeros em solução, até com diâmetros inferiores a 1 nm.

Com esta técnica, partículas de pequenas dimensões são submetidas a uma luz, proveniente do laser, esta é dispersa em todas as direcções, desde que o tamanho das partículas seja inferior ao comprimento de onda do fotão incidente. Este fenómeno é chamado de dispersão de *Rayleigh*. A intensidade da luz dispersa varia ao longo do tempo, já que, as partículas em suspensão encontram-se em movimento (movimento Browniano), variando por isso a distância entre os centros dispersores de luz. O tamanho das partículas pode ser determinado através da medição das mudanças da intensidade de luz ao longo do tempo (**Figura 4.6**).

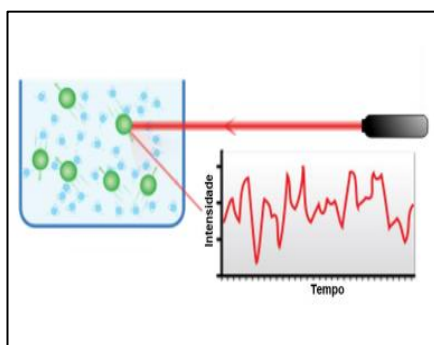


Figura 4.7. Imagem esquemática da dispersão da luz após incidir na amostra.

Para estas medidas usou-se um equipamento da AvidNano W130i optics.

4.7. Análise por BET (*Brunauer-Emmett-Teller*)

A análise por BET permite determinar a área específica da superfície dos materiais, através de medidas de adsorção de azoto em camadas múltiplas em função da pressão relativa e usando um sistema totalmente automático de análise. A técnica engloba a análise da área da superfície e área externa do poro de modo a determinar a área específica total (m^2/g), dando assim informações importantes no estudo da porosidade superficial e do tamanho das partículas em muitas aplicações.

A análise BJH (Barrett-Joyner-Halenda) é outro modelo usado complementarmente ao BET, sendo empregue na mesma na determinação da área do poro mas também no volume específico do poro, usando técnicas de adsorção e deadsorção. Esta técnica caracteriza a distribuição do tamanho do poro independentemente da área externa devido ao tamanho das partículas da amostra.

Esta análise foi realizada no departamento de química pelos serviços de análises, em que usaram o equipamento Micromeritics ASAP 2010.

4.8. Análise térmica

A análise térmica é definida como um conjunto de métodos, que permite perceber as alterações que a massa da amostra sofrerá quando submetida a um tratamento térmico e inferir sobre as suas reacções de decomposição ou degradação.

Neste trabalho usaram-se em simultâneo as técnicas de termogravimetria e de calorimetria diferencial de varrimento. A análise térmica das amostras foi efectuada em atmosfera de azoto, em cadinhos de alumínio, no intervalo entre 20°C e 550°C com uma taxa de aquecimento de 5 K/min. O aparelho utilizado foi o *NETZSCH* STA 449F3 Jupiter.

4.8.1. Termogravimetria

Na termogravimetria faz-se a análise da massa da amostra, numa atmosfera controlada, em função da temperatura ou do tempo. Esta técnica é usada na determinação de certas características da amostra que exibem perda ou ganho de massa devido a fenómenos de decomposição, oxidação ou a perda de compostos voláteis.

4.8.2. Calorimetria diferencial de varrimento (DSC do inglês *Differential Scanning Colorimetry*).

A calorimetria diferencial de varrimento é uma técnica de análise térmica que regista o fluxo de energia calorífica associada a transições nos materiais em função da temperatura. É um método de variação entálpica, no qual a diferença no fornecimento de energia calorífica entre uma amostra e um material de referência é medido a diferença da temperatura, enquanto ambos são submetidos a um mesmo programa de aquecimento ou arrefecimento, rigorosamente controlado. Estas medidas fornecem dados qualitativos e quantitativos em processos endotérmicos e exotérmicos, permitindo obter informações referentes a alterações de propriedades físicas e/ou químicas como a entalpia de transição de fase e de reacção, estabilidade térmica e oxidativa e grau de pureza. Na **figura 4.8** apresenta-se uma imagem esquemática do funcionamento de um aparelho de DSC.

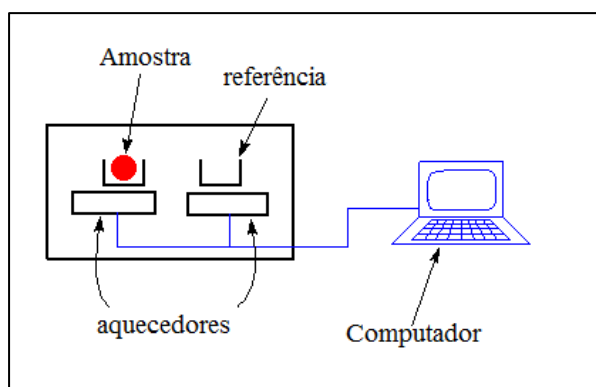


Figura 4.8. Imagem esquemática de um aparelho de DSC.

4.9. Perfilometria de contacto

A perfilometria de contacto é uma técnica utilizada para medir o perfil de uma superfície, com o objectivo de quantificar a sua espessura.

Nesta técnica uma agulha de diamante, em contacto com a amostra, move-se verticalmente e lateralmente, com uma determinada distância e força de contacto. Um perfilómetro pode medir pequenas variações da superfície no deslocamento vertical em função da posição. A posição em altura da agulha de diamante gera um sinal analógico que é convertido a um sinal digital, armazenado, analisado e apresentado graficamente. O funcionamento de um perfilómetro é demonstrado na **figura 4.9**.

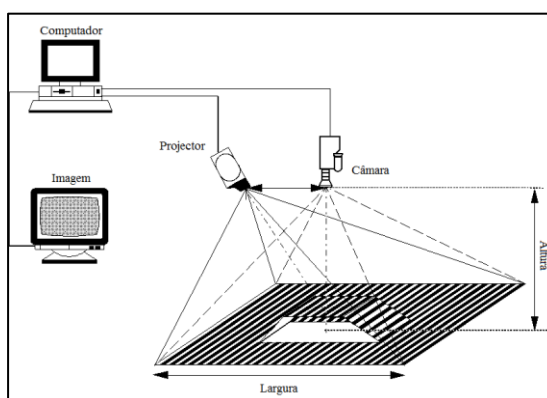


Figura 4.9. Imagem esquemática do funcionamento de um perfilómetro.

Para estas medidas usou-se um perfilómetro Ambios X-200.

5. Apresentação e Discussão dos Resultados

Neste capítulo, será apresentada a caracterização estrutural, morfológica e química das nanopartículas de WO_3 . Na grande maioria dos eléctrodos produzidos neste trabalho, as nP's de WO_3 foram aplicadas sobre o vidro revestido com ITO. Inicialmente foram produzidos eléctrodos só com nP's de WO_3 (sintetizadas com os dois agentes directores de estrutura diferentes (ADE)), posteriormente nas soluções de nP's de WO_3 sintetizadas com Na_2SO_4 misturou-se o polímero PVP. Os eléctrodos com um melhor desempenho, foram os construídos com uma camada da solução de nP's WO_3 (sintetizadas com o ADE Na_2SO_4) misturadas com PVP. Por isso estes foram os escolhidos para serem modificados pela proteína citocromo *c*. Todos os eléctrodos foram caracterizados morfológicamente e electroquimicamente enquanto o bioeléctrodo foi apenas caracterizado electroquimicamente. Por fim é realizada a prova de funcionalidade do bioeléctrodo em peróxido de hidrogénio.

5.1. Caracterização das nanopartículas de WO_3

No presente trabalho foi efectuada a optimização da síntese hidrotermal das nanopartículas de WO_3 (em relação ao que já tinha sido feito dentro do grupo) [55]. Para isso variaram-se alguns factores, tais como: a temperatura, a potência, o tempo de síntese e o agente direccionador de estrutura (ADE). As amostras obtidas foram caracterizadas por várias técnicas, tal como referido no capítulo anterior.

Com o objectivo de facilitar a identificação das amostras foi atribuída uma nomenclatura simples apresentada na **tabela 5.1**.

Tabela 5.1. Nomenclatura das nP's WO_3 sintetizadas.

Condições no microondas				
ADE	Potência fixa (W)	Temperatura fixa (°C)	Tempo (min)	Nomenclatura
NaCl	-	150	60	nP-NaCl-T
	100	-	60	nP-NaCl-P100
	75	-	90	nP-NaCl-P75_t90
	75	-	120	nP-NaCl-P75_t120
Na ₂ SO ₄	-	150	60	nP-Na ₂ SO ₄ -T
	100	-	60	nP-Na ₂ SO ₄ -P100
	75	-	90	nP-Na ₂ SO ₄ -P75_t90
	75	-	120	nP-Na ₂ SO ₄ -P75_t120
	50	-	60	nP-Na ₂ SO ₄ -P50

5.1.1. Microscopia electrónica de varrimento

A morfologia superficial das nP's de WO_3 foi caracterizada por microscopia electrónica de varrimento (SEM), tal como se pode visualizar na **figura 5.1**.

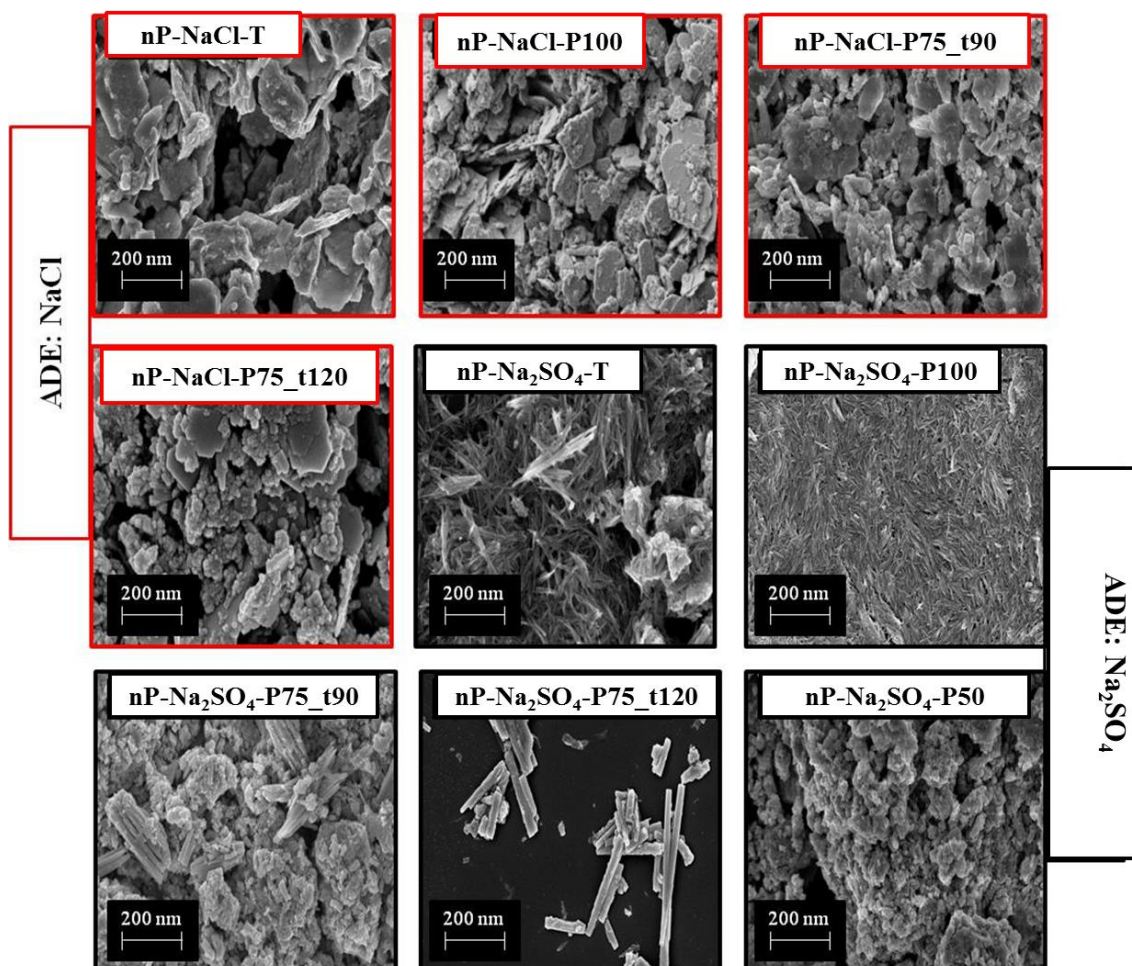


Figura 5.1. Imagens de SEM das amostras de nP's de WO_3 sintetizadas. Os contornos das imagens estão relacionados com o agente director de estrutura usado: vermelho – ADE é o NaCl e a preto o ADE é o Na_2SO_4 .

Os resultados apresentados na **figura 5.1** mostram claramente que partindo do mesmo precursor ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), mas variando os ADE, obtêm-se morfologias diferentes. No caso do NaCl as nP's vão ter a forma de nanofolhas, enquanto no caso do Na_2SO_4 , as nP's tem a forma de nanofios.

Na optimização das nP's, começou-se pela síntese das nP's de WO_3 nP-NaCl-T e nP- Na_2SO_4 -T, como se pode observar na **figura 5.1**, apesar de estas apresentarem a forma pretendida (nanofolhas e nanofios, respectivamente) ainda não estavam totalmente uniformes. No caso das nP's nP-NaCl-P100 e nP- Na_2SO_4 -P100 a morfologia é a pretendida. Contudo o processo de síntese não é reprodutível, pois apesar do micro-ondas ser programado para a síntese durar uma hora, este desliga-se ao atingir a temperatura de 200 °C ou a pressão de 300 psi. De modo a contornar esta limitação, baixou-se a potência do micro-ondas de 100 W para 50 W, porém, estas nP's (nP- Na_2SO_4 -P50) não chegavam a formar a estrutura

pretendida, concluindo-se pela análise da **figura 5.1** que a síntese foi incompleta. Assim aumentou-se a potência para 75 W durante 90 minutos, neste caso apesar de as nP's já apresentarem a forma esperada, estas ainda não tinham uma forma regular e não estavam totalmente formadas. Por fim, aplicou-se uma potência de 75 W durante 120 minutos, nos dois casos as nP's mostram uma morfologia uniforme. A estrutura cristalina das várias nP's de WO_3 foi determinada por difracção de raios-X, com excepção das nP's nP-NaCl-P100, nP- Na_2SO_4 -P100 e nP- Na_2SO_4 -P50, pelo facto de não apresentarem uma estrutura regular.

5.1.2. Difracção de raios-X

A técnica de difracção de raios-X (DRX) utilizada para determinar as estruturas cristalinas das amostras de nP's de WO_3 sintetizadas. A identificação das estruturas foi realizada com o auxílio do *software HighscorePlus, PANalytical*, por comparação com as fichas cristalográficas depositadas na base de dados do *International Centre for Diffraction Data (ICDD)* com as referências #01-072-0199, #01 075-2187 e #98-007-1506, para as fases ortorrômbica, hexagonal e monoclinica, respectivamente.

Os difractogramas e as fichas comparativas são apresentados na **figura 5.2**.

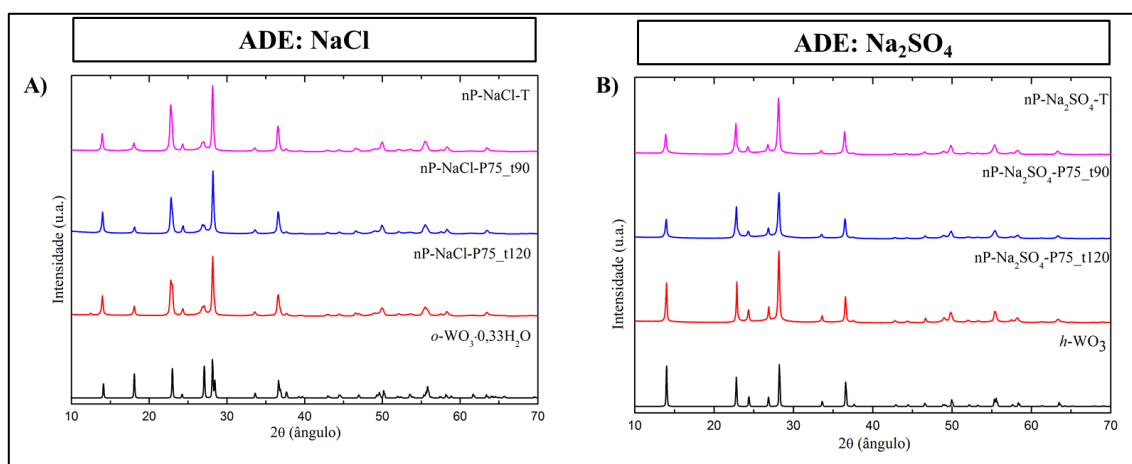


Figura 5.2. Difractogramas das nP's de WO_3 sintetizadas, obtidos á temperatura ambiente. A) nP's de WO_3 sintetizadas com o NaCl como agente director de estrutura. B) nP's de WO_3 sintetizadas com o Na_2SO_4 como agente director de estrutura.

Através da análise dos difractogramas da **figura 5.2**, verifica-se que nas condições experimentais testadas, foi possível obter-se duas das estruturas cristalográficas mais comuns do WO_3 : a ortorrômbica hidratada ($o-WO_3 \cdot 0,33H_2O$) e a hexagonal ($h-WO_3$).

A **figura 5.2** evidencia que a um mesmo valor de pH, dependendo do ADE, obtém-se estruturas cristalinas diferentes. Quando o ADE é o NaCl (**figura 5.2.A**) obtém-se uma estrutura cristalina ortorrômbica hidratada, mas no caso de ADE ser o Na_2SO_4 (**figura 5.2.B**) obtém-se a estrutura cristalina hexagonal. Os difractogramas, apresentados na **figura 5.2**, demonstram ainda que as nP's de WO_3 não continham impurezas.

Neste tipo de reacções, os ADE funcionam como agentes *capping*, ou seja, controlam cineticamente a taxa de crescimento de diferentes faces do cristal através da adsorção e desadsorção selectiva às mesmas. Aquando a adição dos iões durante o processo de síntese, estes ficam adsorvidos na superfície de algumas das faces, o que leva a um crescimento mais lento das mesmas e permitindo o crescimento mais acelerado das outras faces. No caso dos iões sulfato, a adsorção selectiva às faces, resulta num crescimento mais rápido mas apenas numa direcção (estrutura unidimensional), originando assim a estrutura hexagonal em forma de agulha, sendo que os iões de sódio, positivos, funcionam como estabilizador no processo de crescimento das nP's de WO₃ [56]–[58]. Um processo semelhante ocorreu no caso dos iões de cloreto, promovendo um crescimento bidimensional das nanopartículas [59].

As nP's nP-NaCl-P75_t120 e nP-Na₂SO₄-P75_t120 foram submetidas a um estudo do efeito do incremento da temperatura (de 80°C até 900°C e por fim até à temperatura ambiente (T.A)), o qual foi monitorizado através da técnica de DRX. Estes resultados são apresentados na **figura 5.3**. Através deste estudo determinou-se as mudanças de fase cristalina que ocorrem nestas nP's de WO₃ quando submetidas a elevadas temperaturas.

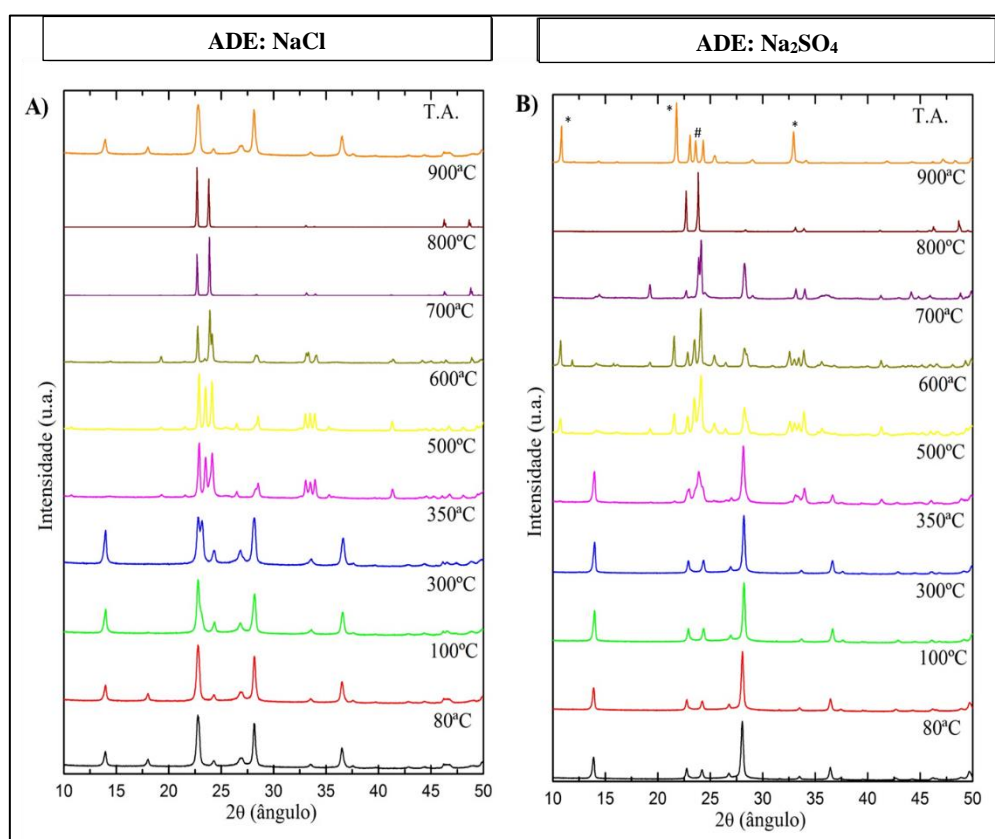


Figura 5.3. Difractogramas de Monitorização do incremento da temperatura às nP's de WO₃. A) nP-NaCl-P75_t120. B) nP-Na₂SO₄-P75_t120.

Nos difractogramas das nP's de WO₃ nP-NaCl-P75_t120 (**figura 5.3.A.**) pode observar-se que a estrutura cristalina mantém-se estável até 300 °C, começando a ocorrer uma mudança de fase a partir de 350 °C; aos 500 °C já ocorreu uma mudança, para a fase cristalina monoclinica. Esta estrutura

mantém-se até 600 °C; entre os 700 °C e os 900 °C aparecem dois picos que podem ser atribuídos á fase tetragonal [60]. Quando as nP's de WO₃ arrefecem até á temperatura ambiente, estas voltam a organizar-se na estrutura cristalina inicial (ortorrômbica hidratada), ou seja, no caso das nP's de WO₃ nP-NaCl-P75_t120 a mudança de estrutura cristalina é reversível. No caso das nP's nP-Na₂SO₄-P75_t120 (**figura 5.3.B.**), os difractogramas mostram que até 350 °C, se mantém a estrutura cristalina inicial (hexagonal). No entanto, é visível um desvio dos picos entre 300 °C - 350 °C, o que poderá ser devido a uma dilatação térmica do filamento induzindo, ou mesmo, devido à dilatação térmica do material. A 500 °C, começa a ocorrer uma mudança na organização dos cristais e entre 600 °C - 700 °C ocorre uma mistura de fases, a hexagonal com a monoclinica. À semelhança das nP's nP-NaCl-P75_t120 a 900°C as nP's adquirem a fase cristalina tetragonal [60]. Quando as nP's nP-Na₂SO₄-P75_t120 arrefecem, a estrutura cristalina é uma mistura entre a fase hexagonal (*) e a fase monoclinica (#). Ou seja, ao contrário das nP's nP-NaCl-P75_t120, nestas nP's a estrutura cristalina não é totalmente reversível.

5.1.3. Dispersão dinâmica da luz

A técnica de dispersão dinâmica da luz permite determinar o diâmetro hidrodinâmico, o que inclui a camada de solvente (etanol), que envolve as nP's de WO₃. O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas de WO₃ foi obtido antes e depois de as sonicar, à temperatura ambiente.

Tabela 5.2. Tamanho das nP's de WO₃ sintetizadas antes e depois de sonicar. Os valores apresentados foram obtidos através da média de três resultados consecutivos para a mesma dispersão de nP's de WO₃.

Amostra	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	
	Antes de sonicar	Depois de sonicar
nP-NaCl-T	195 ± 15	44 ± 4
nP-NaCl-P100	50 ± 10	40 ± 8
nP-NaCl-P75_t90	153 ± 15	62 ± 10
nP-NaCl-P75_t120	40 ± 6	31 ± 6
nP-Na ₂ SO ₄ -T	250 ± 24	189 ± 20
nP-Na ₂ SO ₄ -P100	164 ± 14	91 ± 8
nP-Na ₂ SO ₄ -P75_t90	126 ± 15	80 ± 10
nP-Na ₂ SO ₄ -P75_t120	300 ± 19	62 ± 13

Na **tabela 5.2** pode-se observar que o tamanho da maioria das nP's de WO₃, após sonicação, reduz aproximadamente para 50 %. Tal facto indica que inicialmente as nP's formam aglomerados de proporções significativas, sendo por isso importante sonicá-las antes da sua aplicação, de modo a aumentar a área superficial e, conseqüentemente, melhorar as características electroquímicas dos eléctrodos produzidos. No entanto algumas nP's de WO₃ ortorrômbicas (nP-NaCl-P100 e nP-NaCl-P75_t120) revelaram ser mais estáveis, uma vez que o seu tamanho, após sonicar, não teve uma alteração significativa, provavelmente porque não formaram aglomerados tão grandes.

5.1.4. Cálculo do rendimento da reacção

Ao longo do estudo de optimização das condições de síntese das nP's de WO_3 , foi determinado o rendimento das reacções efectuadas, os quais são apresentados na **tabela 5.3**.

Tabela 5.3. Rendimentos das reacções de síntese das nP's de WO_3 .

Amostra	Rendimento (%)
nP-NaCl-T	29
nP-NaCl-P100	40
nP-NaCl-P75_t90	52
nP-NaCl-P75_t120	60
nP-Na ₂ SO ₄ -T	14
nP-Na ₂ SO ₄ -P100	25
nP-Na ₂ SO ₄ -P75_t90	40
nP-Na ₂ SO ₄ -P75_t120	49

Os rendimentos apresentados na **tabela 5.3** foram um dos motivos que levaram a consecutivas mudanças nas condições de síntese. Inicialmente, as reacções de síntese das nP's nP-NaCl-T e nP-Na₂SO₄-T tinham um baixo rendimento, tendo-se começado a obter melhores rendimentos com as condições das nP's nP-NaCl-P100, nP-NaCl-P75_t90, nP-Na₂SO₄-P100 e nP-Na₂SO₄-P75_t90. No entanto estas revelaram ter alguns inconvenientes, já descritos atrás. A seguir chegou-se às nP's nP-NaCl-P75_t120 e nP-Na₂SO₄-P75_t120 que apresentam um bom rendimento e resultados favoráveis tanto de DRX como de SEM (já descritos). Por tudo isso, estas nP's foram as escolhidas para a aplicação nos eléctrodos utilizados na caracterização electroquímica e na produção do bioeléctrodo com a proteína.

Por último pode observar-se que o rendimento das nP's ortorrômbricas é sempre superior ao rendimento das nP's hexagonais, para as mesmas condições de síntese. Esta observação pode ser atribuída, ao facto de na presença do ADE NaCl a reacção ocorre em condições mais “suaves”, ou seja, em condições menos energéticas do que quando o ADE é o Na₂SO₄.

5.1.5. Análise térmica

Esta técnica foi usada para estudar as transformações que ocorrem nas nanopartículas nP-NaCl-P75_t120 e nP-Na₂SO₄-P75_t120, quando submetidas a temperaturas elevadas, já que alguns dos eléctrodos de nP's de WO_3 /polímero foram secos a 350 °C.

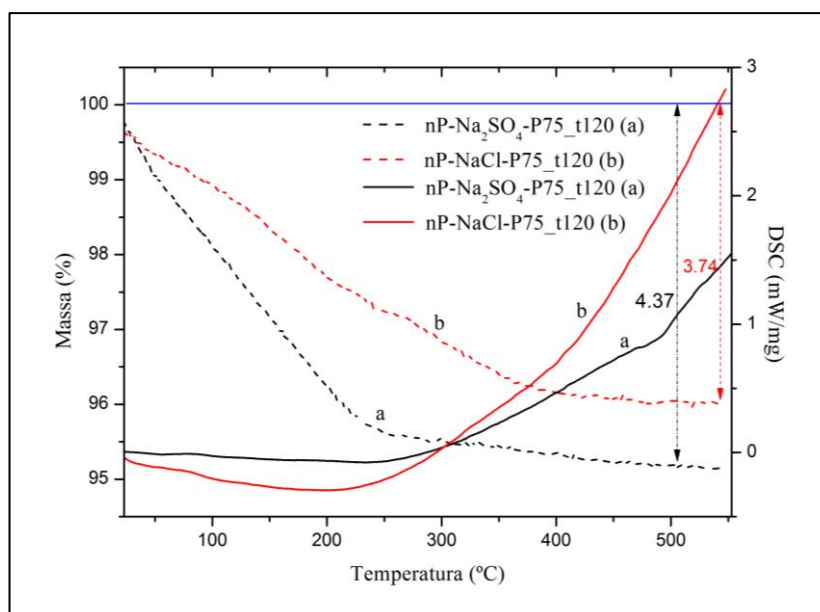


Figura 5.4. Análise térmica das nP's de WO_3 nP-NaCl-P75_t120 (linha a vermelho) e nP- Na_2SO_4 -P75_t120 (linha a preto) com as respectivas curvas TG (linha a tracejado) e DSC (linha contínua).

As curvas de termogravimetria (TG) representadas na **figura 5.4** demonstram que no caso das nP's nP-NaCl-P75_t120 ocorre uma perda de massa acentuada até cerca de 400°C e, no caso das nP's nP- Na_2SO_4 -P75_t120, até cerca de 240°C. A partir destes valores de temperatura, a perda de massa até 500°C é reduzida. A perda de massa das nP's nP-NaCl-P75_t120 é menor do que a das nP's nP- Na_2SO_4 -P75_t120 o que não é expectável, já que como já tinha sido determinado por DRX, as nP's nP-NaCl-P75_t120 tem uma estrutura cristalina ortorrômbicas hidratada. Estas nP's têm água coordenada e adsorvida fisicamente na sua estrutura [61]. Por isso estas deviam ter uma maior perda de massa do que as nP's nP- Na_2SO_4 -P75_t120 com estrutura cristalina hexagonal, o que sugere a presença de água adsorvida fisicamente também nas nP's nP- Na_2SO_4 -P75_t120, confirmado pela perda de massa mesmo antes dos 100 °C [61]. As curvas de DSC demonstram que as nP's nP-NaCl-P75_t120 e nP- Na_2SO_4 -P75_t120, quando submetidas a elevadas temperaturas, têm um comportamento característico de um processo exotérmico.

5.1.6. Análise da área superficial pelo modelo *Brunauer-Emmett-Teller*.

A caracterização da área superficial específica das nP's nP-NaCl-P75_t120 e nP- Na_2SO_4 -P75_t120 foi realizada empregando o método *Brunauer-Emmett-Teller* (BET), através da técnica de adsorção-dessorção de N_2 (**figura 5.5**).

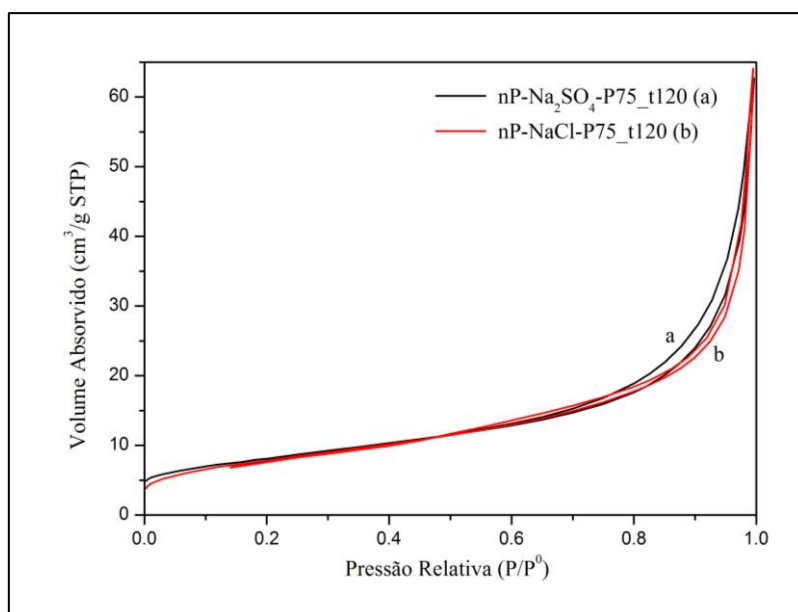


Figura 5.5. Isotérmicas de adsorção-desorção de N_2 das nP's nP-NaCl-P75_t120 (vermelho) e nP-Na₂SO₄-P75_t120 (preto).

A área superficial específica para as nP's nP-NaCl-P75_t120 é 28.67 m²/g e para as nP's nP-Na₂SO₄-P75_t120 é 29.00 m²/g. Estes valores são semelhantes entre si, apesar de terem formas geométricas diferentes, as quais já foram referidas anteriormente. No entanto a área superficial específica está em conformidade com estudos realizados anteriormente [57 , 62]. Vale a pena, ainda, mencionar que a partir da análise das curvas isotérmicas (**figura 5.5**) das duas amostras, não foi detectada qualquer microporosidade, uma vez que as isotérmicas resultantes eram do tipo III, típica de materiais sólidos sem porosidade.

5.1.7. Espectroscopia de Infravermelho

Os espectros obtidos por espectroscopia de infravermelho (IV), apresentados na **figura 5.6**, permitiram a identificação dos grupos terminais e as vibrações dos blocos WO₆ octaédricos das nP's nP-NaCl-P75_t120 e nP-Na₂SO₄-P75_t120. A análise através desta técnica permitiu verificar a estrutura das amostras de nP's de WO₃.

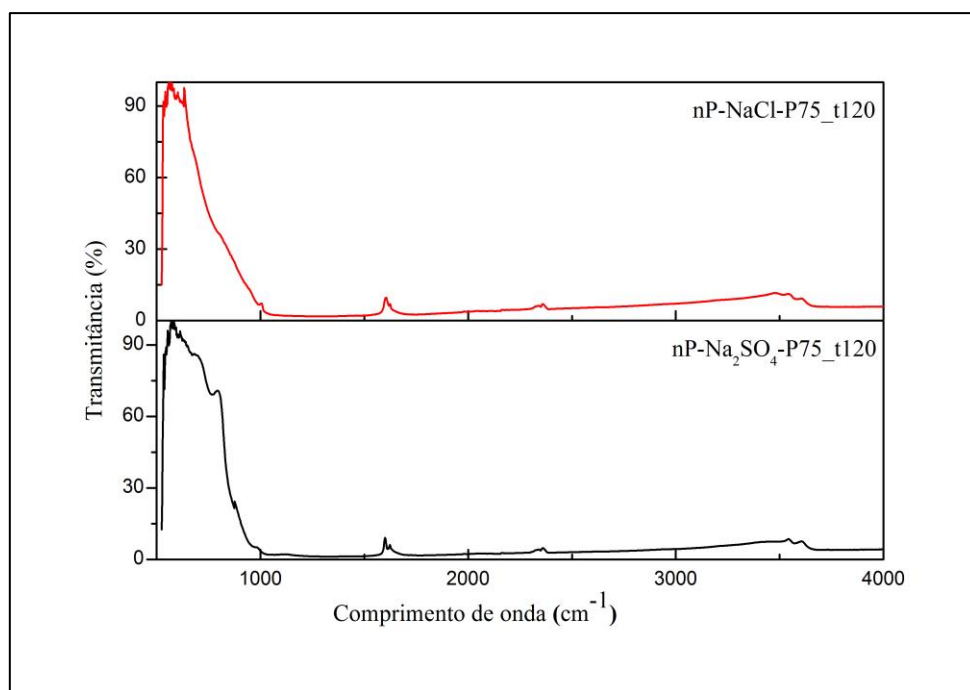


Figura 5.6. Espectro de IV das nP's nP-NaCl-P75_t120 e nP-Na₂SO₄-P75_t120

As bandas presentes no espectro de IV das nP's nP-NaCl-P75_t120 são semelhantes às bandas do espectro de IV das nP's nP-Na₂SO₄-P75_t120, as quais estão em conformidade com o estado de arte [63]. A banda de absorção a 3485 cm⁻¹ corresponde à ligação distendida –OH; a 1605 cm⁻¹ existe uma banda bem definida correspondente também a uma ligação –OH, mas num plano de flexão, a qual indica a presença de moléculas de água na estrutura, facto corroborado pela técnica de DSC. A banda larga entre 570 e 970 cm⁻¹ foi atribuída às ligações O-W-O e á ligação dupla W=O.

5.1.8. Espectroscopia de Raman

A espectroscopia de Raman foi utilizada para obter mais informações das características estruturais das nP's nP-Na₂SO₄-P75_t120, só estas últimas foram analisadas porque foram as escolhidas para serem aplicadas no bioeléctrodo. Uma das conclusões que se tira através da observação dos espectros da **figura 0.2 (informação suplementar)** é que as nP's nP-Na₂SO₄-P75_t120 são sensíveis à potência do laser; como tal a potência do laser deve ser mantida abaixo 1mW, de modo a manter a amostra intacta. Por isso, para análise do espectro escolheu-se aquele que foi obtido com uma potência de laser de 50 μW. O espectro de Raman da **figura 0.2 (informação suplementar)** mostra a presença de modos vibracionais característicos dos materiais de WO₃: os modos vibracionais perto de 814 cm⁻¹ e 661 cm⁻¹ podem ser atribuídos à distensão O-W-O, enquanto a banda fraca a 326 cm⁻¹ e 242 cm⁻¹ pode ser atribuído à vibração flectida δ(O-W-O), uma transferência de carga elevada origina um pico a 191 cm⁻¹, que provavelmente resulta de um modo de distensão n(W-O-O) e, por fim, temos um modo distinto

a 931 cm⁻¹ atribuída a uma vibração distendida W=O, que pode indicar a presença de água, corroborando os espectros de FTIR e os resultados de DSC.

5.2. Caracterização electroquímica dos eléctrodos

Nesta secção, usando técnicas electroquímicas, tais como a espectroscopia de impedância (EIS) e a voltametria cíclica (VC), determinou-se quais as melhores condições para a construção de um eléctrodo modificado com nP's de WO₃ e proteína citocromo *c*. Por fim testou-se a funcionalidade dos bioeléctrodos em peróxido de hidrogénio. À semelhança do que aconteceu na secção anterior, atribuiu-se uma nomenclatura aos eléctrodos construídos (**tabela 5.4**), de modo a facilitar a sua identificação. Estes eléctrodos foram construídos pela deposição dos dois tipos de nP's de WO₃ (nP-NaCl-P75_t120 e nP-Na₂SO₄-P75_t120 sem e com o polímero PVP) por *drop casting*, em uma e três camadas.

Tabela 5.4. Nomenclatura dos eléctrodos estudados.

nP's	Concentração das nP's (p/p %)	Camadas	Proporção nP's/PVP	Nomenclatura
nP-NaCl-P75_t120	5	1	-	EOr1
		3	-	EOr3
nP-Na ₂ SO ₄ -P75_t120		1	-	EHex1
		3	-	EHex3
		1	3:1	EHexP1
		3	3:1	EHexP3

5.2.1. Testes preliminares

Inicialmente avaliou-se o desempenho dos eléctrodos estudados por espectroscopia de impedância (EIS), em tampão 0,05 M tris – HCl, pH 7,6, 0,1 M KCl. Na **figura 5.7** compara-se o substrato (ITO) com os restantes eléctrodos, os quais demonstraram ter um comportamento semelhante entre si. As curvas de *nyquist* do ITO e dos eléctrodos EOr1, EOr3, EHex1, EHex3, EHexP1 e EHexP3 são constituídas apenas por uma zona linear, como já tinha sido referido na **secção 2.3.3**, tal facto indica que a transferência electrónica é muito rápida, possibilitando assim uma transferência electrónica eficiente.

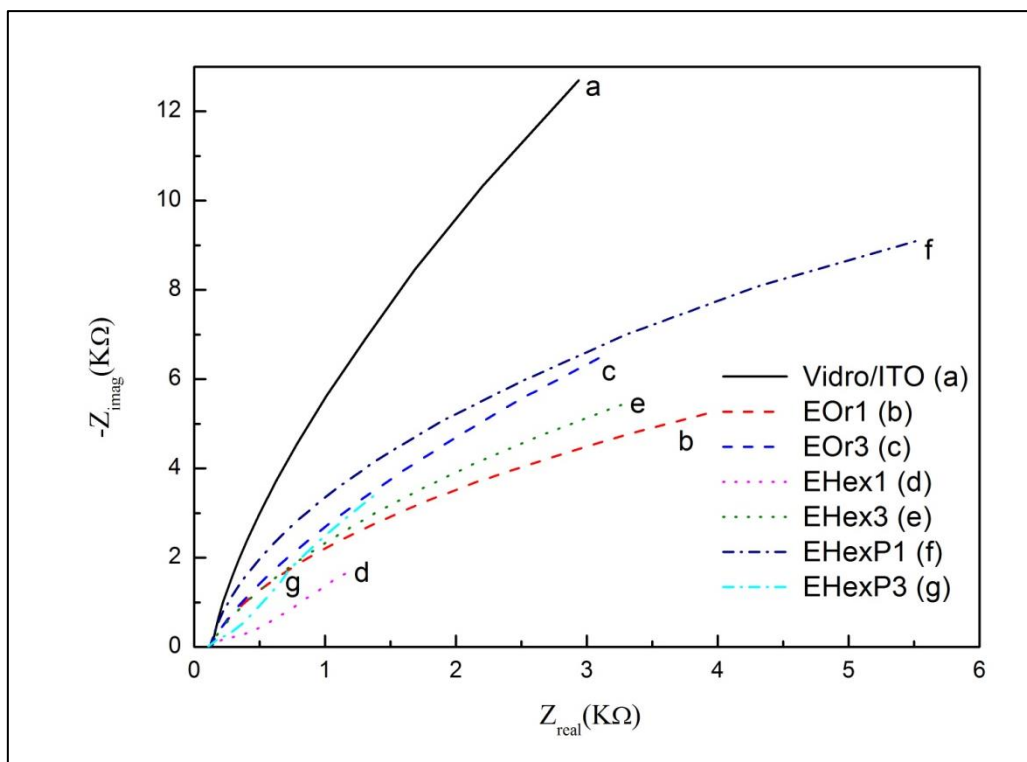


Figura 5.7. Curvas de *nyquist* do ITO, dos eléctrodos de ITO/WO₃ e dos eléctrodos de ITO/WO₃/PVP obtidas com uma voltagem alternada de 10 mV e uma gama de frequências de 1 – 10⁶ Hz.

De modo a calcular a resistência do ITO e dos eléctrodos à transferência de carga, desenhou-se um modelo de um circuito electrónico equivalente (**figura 0.3, informação suplementar**). Com este modelo fez-se uma aproximação aos resultados experimentais. Os valores de resistência calculados para o ITO e os eléctrodos são apresentados na **tabela 5.5**.

Tabela 5.5. Resistências do ITO, dos eléctrodos de ITO/WO₃ e de ITO/WO₃/PVP, cada valor de resistência apresentado são obtidos através da média das resistências calculadas para cinco ITO/eléctrodos diferentes.

Amostra	Resistência (K Ω)
ITO	46,5 \pm 17,4
EOr1	9,0 \pm 2,2
EOr3	8,3 \pm 2,2
EHex1	2,4 \pm 0,4
EHex3	6,8 \pm 1,5
EHexP1	1,0 \pm 0,3
EHexP3	6,9 \pm 0,9

Como se pode observar na **tabela 5.5**, a aplicação das nP's de WO₃ sobre o ITO levou a uma diminuição da resistência á passagem de corrente, a diminuição foi mais significativa nos eléctrodos EHex1 e EHexP1. No caso do eléctrodo EHexP1, o facto de ter uma só camada de polímero/nP's faz com que as nP's de WO₃ adiram melhor ao substrato e por isso observa-se uma maior diminuição da resistência á passagem de corrente. O contrário ocorre com os eléctrodos EOr1, EOr3 e EHex3 com resistências superiores aos eléctrodos já referidos.

Os VC's da **figura 5.8** foram realizados a uma velocidade de varrimento de 50 mV/s em tampão 0,05 M tris – HCl, pH 7,6, 0,1 M KCl; o pico anódico e o pico catódico são observados na gama - 0,4 / - 0,8 V. Os eléctrodos EOr1, EOr3 e EHex3 apresentam VC's com os picos mais intensos, ao contrário, dos eléctrodos EHex1 e EHexP1, nos quais a resistência é menor. O eléctrodo EHexP1 é o que demonstra um melhor compromisso entre resistência e corrente.

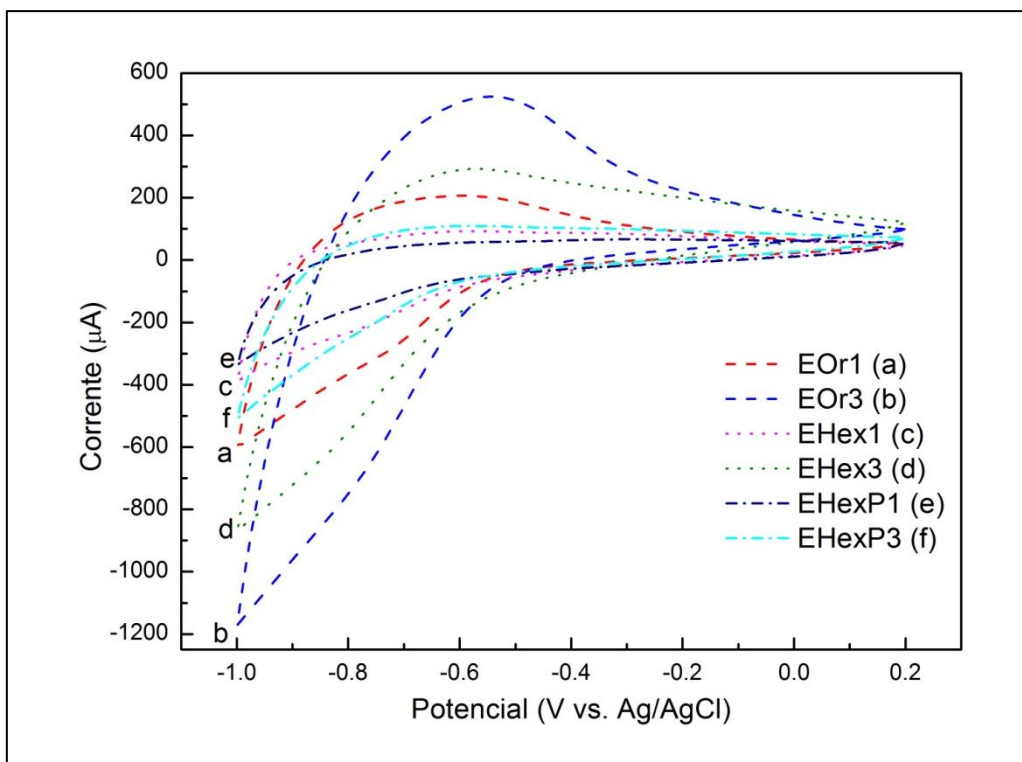


Figura 5.8. Voltamogramas cíclicos dos eléctrodos de ITO/WO₃ e dos eléctrodos ITO/WO₃/PVP em tampão 0,05 M tris-HCl a pH 7,6, 0,1M KCL. Velocidade de varrimento 50 mV/s.

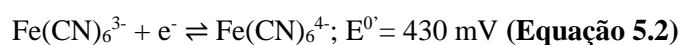
Esses picos são atribuídos à redução electroquímica do óxido de tungsténio, acoplado ao protão intercalado/desintercalado (**equação 5.1**) [64], resultando na formação reversível do bronze de tungsténio:



A dupla injeção de iões e electrões representada na **equação 5.1**, mantém a electroneutralidade do sistema. Outra evidência de que o processo descrito na **equação 5.1** ocorreu, efectivamente, foi o facto de se poder observar, a olho nu, a passagem de uma cor cinzenta clara para uma cor azul, aquando aplicação de um potencial negativo, que corresponde à redução dos iões de tungsténio [64].

5.2.2. Teste dos eléctrodos com ferricianeto de potássio

O ferricianeto de potássio foi uma das espécies electroactivas testadas durante este trabalho experimental. Os picos de redução/oxidação observados nos VC's são atribuídos ao equilíbrio descrito na **equação 5.2** [18]:



Uma das primeiras análises realizadas foi a escolha do substrato para a deposição das nP's de WO_3 (**figura 5.9. A**), entre o vidro revestido com ITO, o vidro revestido com óxido de fluor estanho (FTO) e o polímero de polietileno tereftalato (PET) revestido com ITO. Destes três o PET revestido com ITO foi o que proporcionou a obtenção de picos anódico e catódico mais intensos. Entre os outros dois substratos o vidro com ITO origina picos anódico e catódico mais intenso do que o vidro revestido com FTO, por isso o vidro revestido com ITO foi o escolhido para a construção da maioria dos eléctrodos.

Outra das análises realizadas inicialmente foi a comparação das técnicas de deposição das nP's de WO_3 sobre o ITO (**figura 5.9.B**).

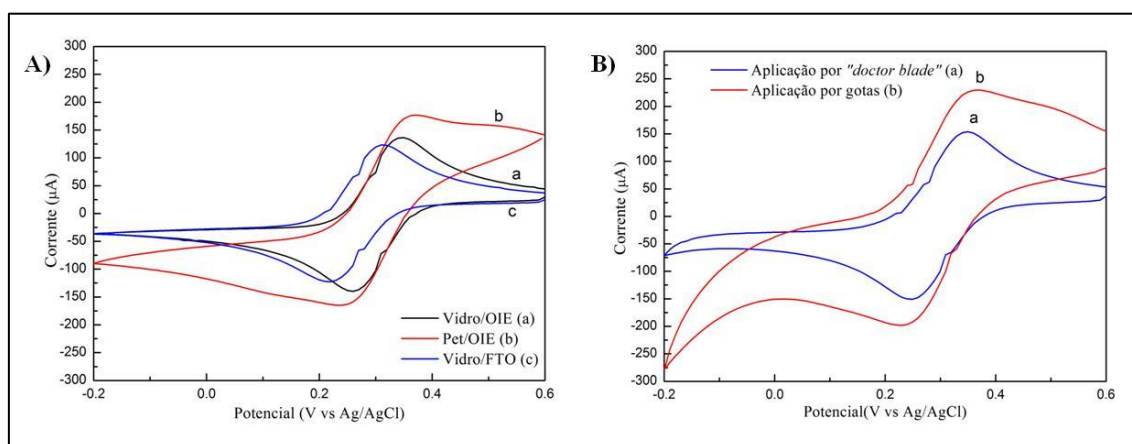


Figura 5.9. Voltamogramas cíclicos de 1 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, 0,1 M KCl. A uma velocidade de varrimento de 50 mV/s. A) Comparação dos substratos onde se vão depositar as nP's de WO_3 . B) Comparação das técnicas de deposição das nP's de WO_3 .

Os voltamogramas cíclicos da **figura 5.9.B** mostram as diferenças resultantes da técnica de aplicação das nP's, ou seja, por gota ou por *doctor blade*. Quando as nP's são aplicadas pela técnica de gota, o voltamograma cíclico apresenta um sinal mais alargado, o que significa uma cinética mais desfavorável. Por esse motivo, a técnica de *doctor blade* foi a escolhida para prosseguir o trabalho.

Nos voltamogramas cíclicos da **figura 5.10**, faz-se comparação de eléctrodos cobertos com uma ou três camadas de nP's de WO_3 .

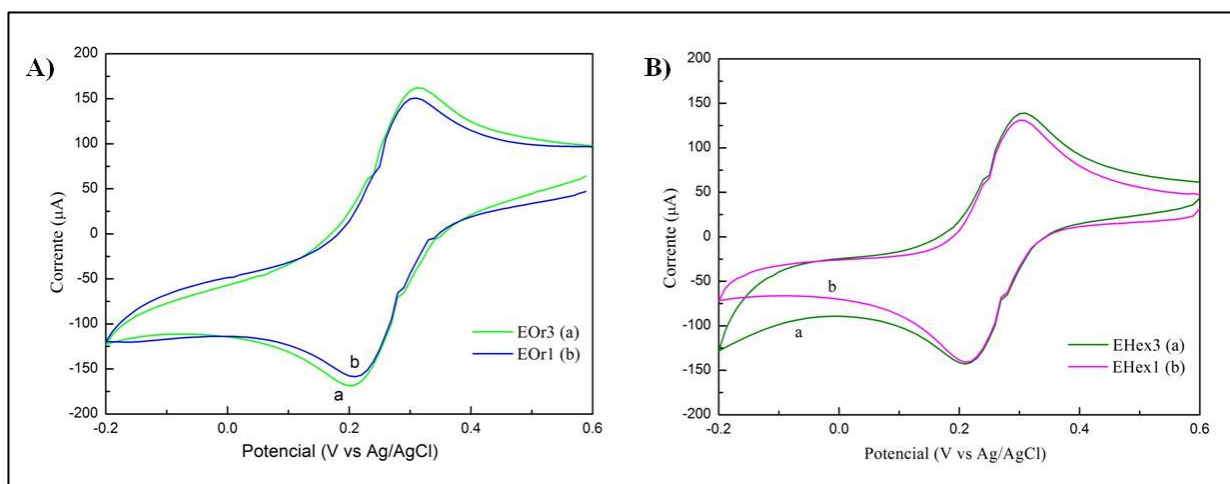


Figura 5.10. Voltamogramas cíclicos de 1 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, 0,1 M KCl, registados a uma velocidade de varrimento de 50 mV/s. A) Comparação de eléctrodo EOr1 (1 camada) e EOr3 (3 camadas). B) Comparação de eléctrodo EHex1 (1 camada) e EHex3 (3 camadas).

Os eléctrodos com nP's ortorrômnicas hidratadas (**figura 5.10.A**) e com nP's hexagonais (**figura 5.10.B**) têm um comportamento semelhante entre si. Como se pode observar na **figura 5.10**, a diferença entre os eléctrodos EOr3 e EHex3 e os eléctrodos EOr1 e EHex1, respectivamente, é a intensidade do pico anódico e do pico catódico ser ligeiramente superior nos eléctrodos modificados com três camadas, o que pode traduzir uma maior área electroactiva. Além disso, estes eléctrodos demonstraram ter valores de resistência na mesma ordem de grandeza (ver secção anterior).

De modo a estudar a cinética da reacção do $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ nos eléctrodos EOr3 (**figura 5.11.B**) e EHex3 (**figura 5.11.C**), traçaram-se os voltamogramas cíclicos a diferentes velocidades de varrimento (10 – 250 mV/s) e comparou-se com os obtidos em ITO (**figura 5.11.A**).

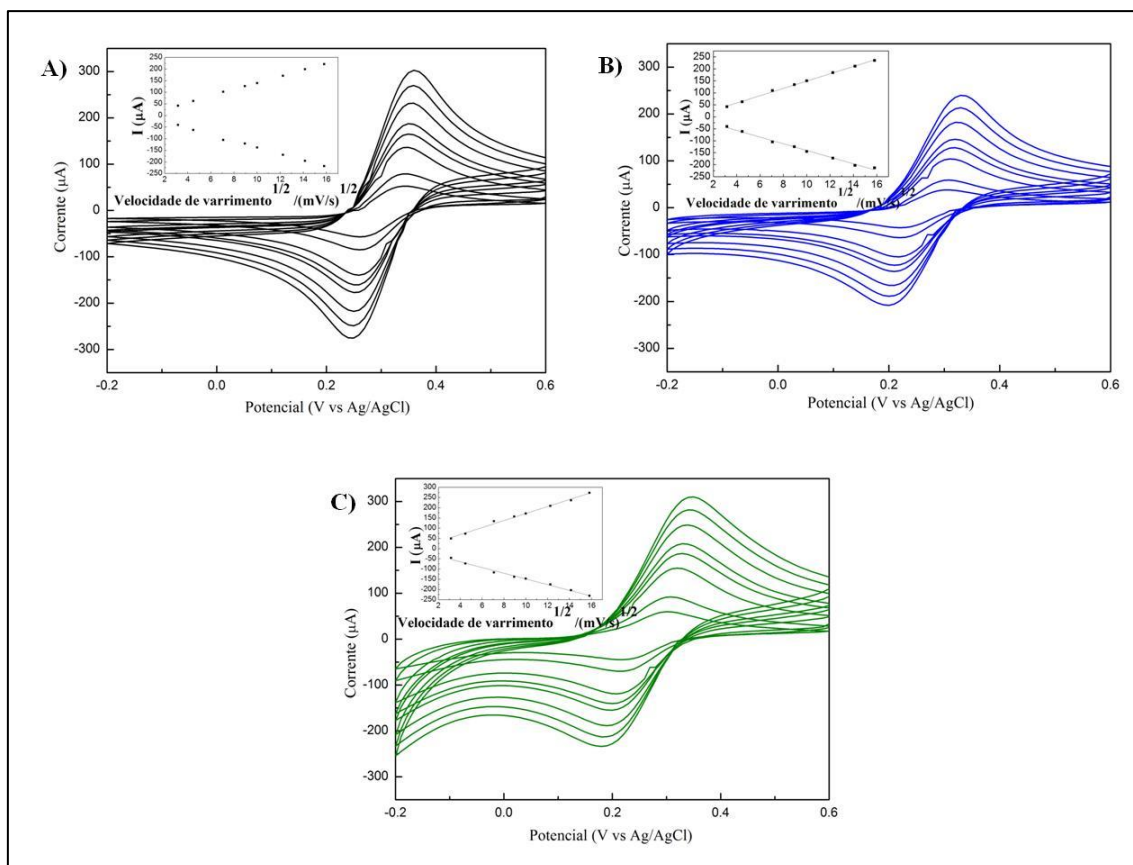


Figura 5.11. Voltamogramas cíclicos de 1 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, 0,1 M KCl, usando eléctrodos modificados com nP's de WO_3 , estudados a diferentes velocidades de varrimento (10-250 mV/s). A) Vidro com ITO. B) Eléctrodo EOr3. C) Eléctrodo EHex3.

Tipicamente, as nP's de WO_3 têm um pK_a de cerca de 2,5 [65]. Como tal, espera-se que a pH neutro ocorra uma repulsão entre WO_3 e os aniões ferricianeto [17], o que se verifica experimentalmente, uma vez que os eléctrodos EOr3 (**figura 5.11.B**) e EHex3 (**figura 5.11.C**) apresentam picos de oxidação e redução, apesar de bem definidos, inferiores aos picos do ITO (**figura 5.11.A**). A corrente nos picos de oxidação e redução nos eléctrodos EOr3 e EHex3 variam linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varrimento, o que demonstra que o processo electroquímico é controlado pela difusão.

Alguns dos parâmetros que permitem avaliar a reversibilidade do processo electroquímico são apresentados na **tabela 5.6**, tais como a razão entre a corrente dos picos (I_c/I_a), a separação entre os picos (ΔE_p), o potencial formal E^0 e área electroactiva (A_e).

Tabela 5.6. Parâmetros calculados para os eléctrodos vidro/ITO e os eléctrodos EOr3 e EHex3 numa gama de velocidades de varrimento de 10-250 mV/s; os valores foram obtidos através da média de cinco eléctrodos diferentes.

Amostra	I _c /I _a	ΔE _p (mV)	E ^{0'} (mV)	A _e (cm ²)
Vidro/ITO	0,97 ± 0	92 ± 2	266 ± 1	0,61 ± 0
EOr3	0,87 ± 0	130 ± 0	263 ± 1	0,73 ± 0,1
EHex3	0,87 ± 0	116 ± 6	268 ± 2	0,70 ± 0

Os valores I_c/I_a e de ΔE_p apresentados na **tabela 5.6** demonstram que a electroquímica do ferricianeto nos eléctrodos EOr3 e EHex3 não é reversível, não estando de acordo com os valores teóricos [66] de transferência electrónica para o processo de um electrão (I_c/I_a = 1 e ΔE_p = 59mV). No entanto, o potencial de redução formal dos eléctrodos está de acordo com os da literatura [66–68]. Além disso, a resposta do eléctrodo de controlo (vidro/ITO), mostra que a electroquímica do ferricianeto não melhora na presença das nanopartículas.

A área electroactiva apresentada na **tabela 5.6** foi determinada usando a equação de *Sevick-Randles* (ver capítulo 2, secção 2.3.1). Assumindo que os eléctrodos têm um comportamento *nernstiano* e o processo é controlado por difusão, a intensidade da corrente no pico está relacionado com a velocidade de varrimento do potencial, onde o coeficiente de difusão para o ferricianeto é igual a 7,18 x 10⁻⁶ cm²s⁻¹ [68]. Os valores de área electroactiva dos eléctrodos EOr3 e EHex3 são semelhantes entre si, mas superiores ao valor da área do eléctrodo de controlo e ao valor da área geométrica (0,64 cm²). Portanto, a rugosidade do filme de WO₃ depositado, em conjunto com a elevada área superficial das nP's de WO₃, aumenta a área electroactiva dos eléctrodos. Os parâmetros electroquímicos calculados para os eléctrodos revestidos apenas com nP's de WO₃ são característicos de um sistema quasi-reversível.

O VC do ferricianeto no eléctrodo EHex3 apresentou uma menor separação dos picos (ΔE_p) do que o eléctrodo EOr3, o que pode estar associado à possibilidade da estrutura electrónica 1d das nP's hexagonais facilitar a transferência electrónica heterogénea [6]. Por esse motivo, as nP's nP-Na₂SO₄-P75_t120 foram as escolhidas para misturar com os polímeros PEDOT/PSS (Poli(3,4-etilenodioxitiofeno)-poli(estireno sulfonato)) e PVP. Neste trabalho experimental, os polímeros foram testados com as nP's nP-Na₂SO₄-P75_t120 com o objectivo de melhorar os parâmetros electroquímicos, mas também de evitar a perda de nP's WO₃ (facto que foi determinado por testes de reflectância, tal como apresentado mais à frente, na secção 5.4.2). Para tal, usou-se uma solução de nP's de WO₃ a 5 (p/p %), a qual foi misturada com os polímeros em várias proporções. No caso do polímero PEDOT/PSS, os resultados são apresentados na **tabela 0.3 (informação suplementar)** em anexo e, no caso, do PVP, na **tabela 5.7**. Experimentalmente, observou-se que às temperaturas de 200 °C e 350 °C, alguns

eléctrodos modificados com os polímeros de PEDOT/PSS e PVP ficaram danificados, não apresentando nenhum sinal electroquímico.

Os eléctrodos modificados com o polímero PEDOT/PSS apresentam ΔE_p superiores e áreas electroactivas inferiores ou iguais aos eléctrodos modificados apenas com nP's de WO_3 . Conclui-se, assim, que os eléctrodos de WO_3 com o polímero PEDOT/PSS não apresentam qualquer vantagem.

Na **tabela 5.7** são apresentados os parâmetros electroquímicos calculados para os diferentes eléctrodos modificados com nP's de WO_3 e PVP. A grande maioria destes apresenta um melhor desempenho do que os restantes eléctrodos estudados neste trabalho experimental. Entre os eléctrodos WO_3 /PVP, os que demonstraram ter um melhor desempenho são os eléctrodos EHexP1 (azul escuro) e o EHexP3 (azul claro). Nestes, a razão entre os picos de corrente é aproximadamente 1. No entanto, continuam com um ΔE_p elevado e distante dos 59 mV/s característicos dos processos electroquímicos reversíveis ($n=1$). Apesar disso, a reversibilidade melhorou face aos eléctrodos cobertos só com nP's. Os potenciais formais estão dentro dos parâmetros apresentados na literatura [68]. As áreas electroactiva são superiores a todos os eléctrodos estudados até aqui, sendo a área electroactiva do eléctrodo EHexP1 ligeiramente superior ao eléctrodo EHexP3. Por isso, este eléctrodo foi o escolhido para ser usado, mais à frente, na preparação do bioeléctrodo.

Tabela 5.7. Parâmetros calculados para os eléctrodos modificados com o polímero PVP (os parâmetros a azul-escuro são correspondentes ao eléctrodo EHexP1 e a azul claro ao eléctrodo EHexP3).

Temp. de recozimento (°C)	Tempo de recozimento (h)	Nº de camadas	Proporção de nP's/polímero	Ic/Ia	ΔE_p (mV)	E° (mV)	A_e (cm ²)
350	1		3:1	0,89	197	249	0,53
	12			0,90	192	251	0,61
200	1	1	1:1	0,85	163	250	0,62
	1			0,89	87	255	0,23
	12			0,97	158	251	0,52
	12			0,97	134	244	0,74
80	12	3	1:1	0,94	113	257	0,76
	12			0,96	115	256	0,80
	1	1	1:3	0,97	107	255	0,81
	12			0,95	117	256	0,85
	12			0,95	113	257	0,86
	1	1	3:1	0,96	112	257	0,83
	12			0,97	121	258	0,90
	12			0,96	116	259	0,87

O voltamograma cíclico do ião ferricianeto no eléctrodo EHexP1 é apresentado na **figura 5.12**, onde se pode observar que à semelhança dos eléctrodos modificados só com nP's WO_3 , apresentam picos anódico e catódico bem definidos. A corrente destes picos variam linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varrimento, o que permite concluir que o processo electroquímico é controlado pela difusão. Com o objectivo de avaliar a reversibilidade, calculou-se alguns parâmetros electroquímicos a partir dos voltamogramas cíclicos de cinco eléctrodos EHexP1 diferentes, incluindo, o eléctrodo apresentado na **tabela 5.7**. A razão entre a corrente dos picos foi igual a $0,98 \pm 0,01$ e o afastamento entre os picos igual a 100 ± 12 mV/s, enquanto o potencial de redução formal foi igual a 264 ± 4 mV/s e a área electroactiva igual a $0,87 \pm 0,02$. Estes valores são próximos aos resultados obtidos inicialmente para um só eléctrodo, demonstrando assim uma boa reprodutibilidade. Os parâmetros estudados são compatíveis com um sistema quasi-reversível (os parâmetros de comparação são apresentados no capítulo 2).

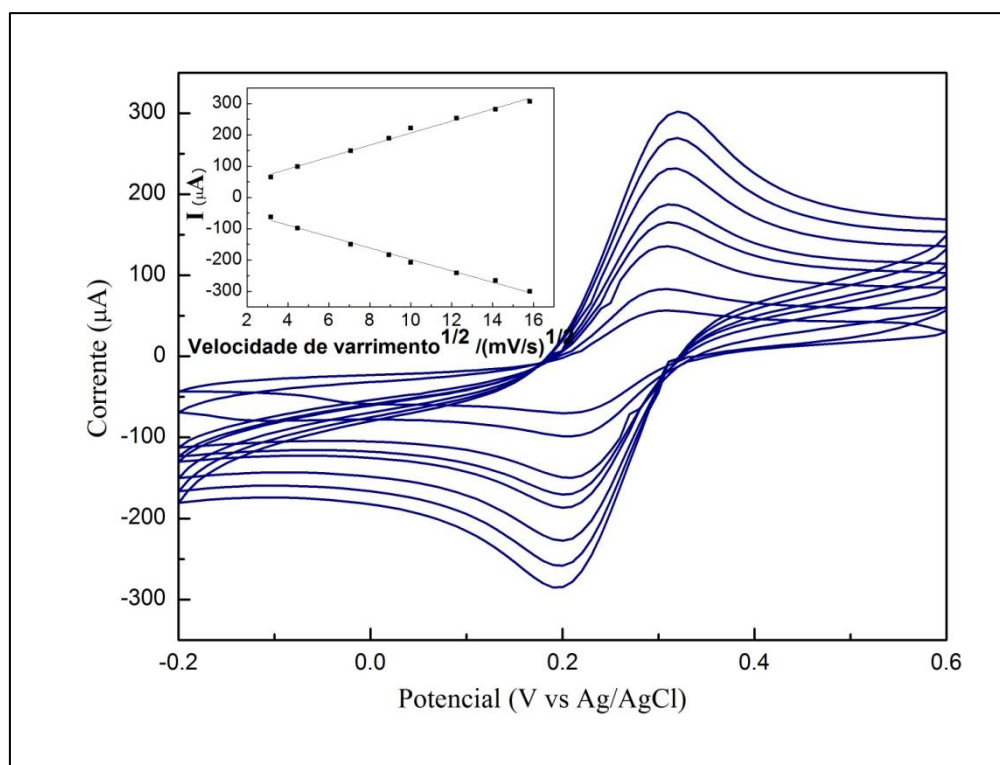


Figura 5.12. Voltamogramas cíclicos de 1 mM Fe(CN)_6^{4-} , 0,1 M KCl, usando o eléctrodo EHexP1, a diferentes velocidades de varrimento (10-250 mV/s).

Além de todos os eléctrodos já estudados, ainda se experimentou crescer o filme de WO_3 , *in situ* na solução e condições usadas para a síntese das nP's nP-NaCl-P75_t120. Neste caso, o substrato escolhido foi o vidro revestido com FTO, uma vez que este resistiu às condições de síntese ao contrário do vidro revestido com ITO. Os voltamogramas cíclicos do ferricianeto no eléctrodo sintetizado *in situ* são apresentados na **figura 5.13**, a qual demonstra que os picos de oxidação e redução estão bem definidos. Além disso, e tal como acontece com os outros eléctrodos estudados, a corrente nos picos

varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varrimento e, por isso, o processo electroquímico é controlado por difusão.

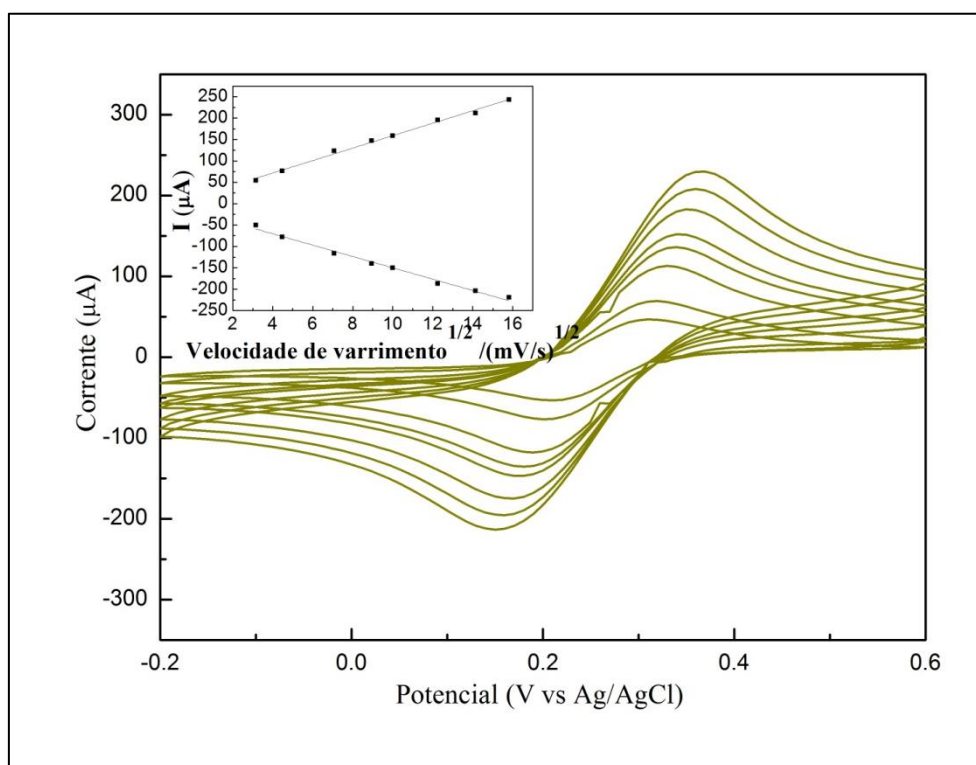


Figura 5.13. Voltamogramas cíclicos de 1 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, 0,1 M KCl, no eléctrodo sintetizado *in situ* no microondas, a diferentes velocidades de varrimento desde 10-250 mV/s.

Os parâmetros electroquímicos relativos à redução/oxidação do ferricianeto foram calculados através dos voltamogramas cíclicos e são apresentados na **tabela 5.8**.

Tabela 5.8. Parâmetros calculados para o Vidro/FTO e o eléctrodo sintetizado *in situ* no microondas (ENIM) numa gama de velocidades de varrimento de 10-250 mV/s.

Amostra	I_c/I_a	ΔE_p (mV)	E^0 (mV)	A_e (cm ²)
Vidro/FTO	0,94	112	263	0,79
ENIM	0,95	159	260	0,70

A área electroactiva nos eléctrodos ENIM, ao contrário de todos os outros eléctrodos estudados, diminui face ao eléctrodo de controlo, o que pode acontecer devido ao facto de o filme produzido ser muito compacto, podendo assim obstruir o FTO. Outra hipótese, é as condições de síntese terem danificado ligeiramente o FTO. No entanto, a área electroactiva continua a ser superior à geométrica.

Através dos resultados apresentados conclui-se que estes eléctrodos não têm um bom desempenho e por isso o estudo do crescimento dos filmes de WO_3 “*in situ*” restringiu-se a este teste.

Por fim, avaliou-se a estabilidade do eléctrodo EOr3, apresentando-se os voltamogramas cíclicos na **figura 5.14**.

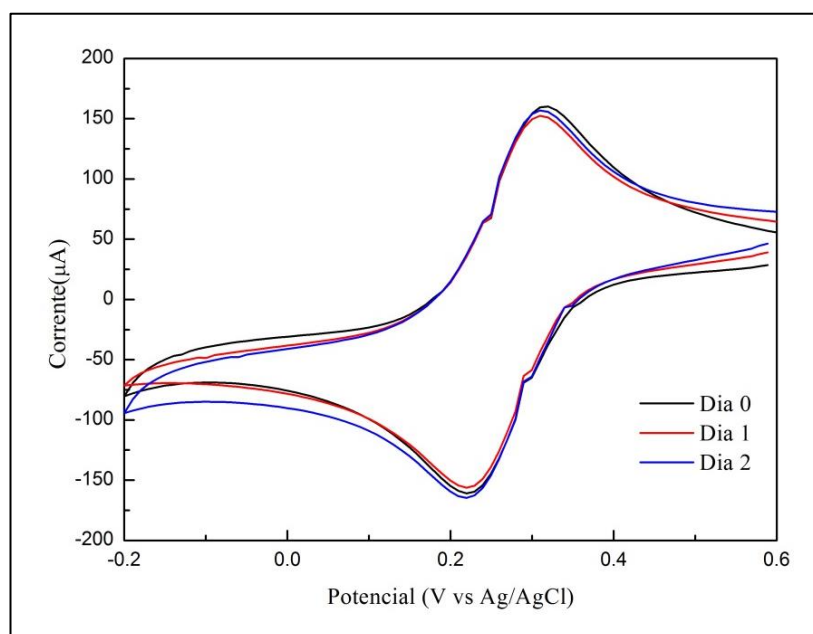


Figura 5.14. Voltamogramas cíclicos de 1 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, 0,1 M KCl, usando o eléctrodo EOr3, ao longo de três dias consecutivos a uma velocidade de varrimento de 50 mV/s.

Os voltamogramas cíclicos obtidos ao longo de três dias consecutivos estão praticamente sobrepostos entre si; por isso, o eléctrodo mantém as suas propriedades electroquímicas pelo menos, durante este período de tempo.

5.2.3. Teste dos eléctrodos com metilsulfato-5-fenazina

A metilsulfato-5-fenazina (PMS, do inglês *phenazine methasulfate*) foi outra das espécies electroactivas usadas para testar os novos eléctrodos. A reacção de redução do PMS [69] é a descrita na **equação 5.3**:



Os voltamogramas cíclicos do vidro revestido com ITO e dos eléctrodos EOr3, EHex3 e EHexP1 são apresentados na **figura 5.15**. Os voltamogramas cíclicos demonstram que os eléctrodos EOr3 (**figura 5.15.B**) e EHex3 (**figura 5.15.C**) têm um comportamento semelhante entre si; os picos de oxidação e redução do PMS são bem definidos, o que não ocorre no eléctrodo EHexP1 (**figura 5.15.D**). Neste último os picos catódico e anódico perdem definição a velocidades de varrimento elevadas. Além disso, pode-se observar na **figura 5.15. B, C e D** que a corrente destes picos não varia linearmente com

a raiz quadrada da velocidade de varrimento, o que significa que o processo electroquímico não é controlado por difusão ou pelo menos, não totalmente, podendo estar associado a processos de adsorção.

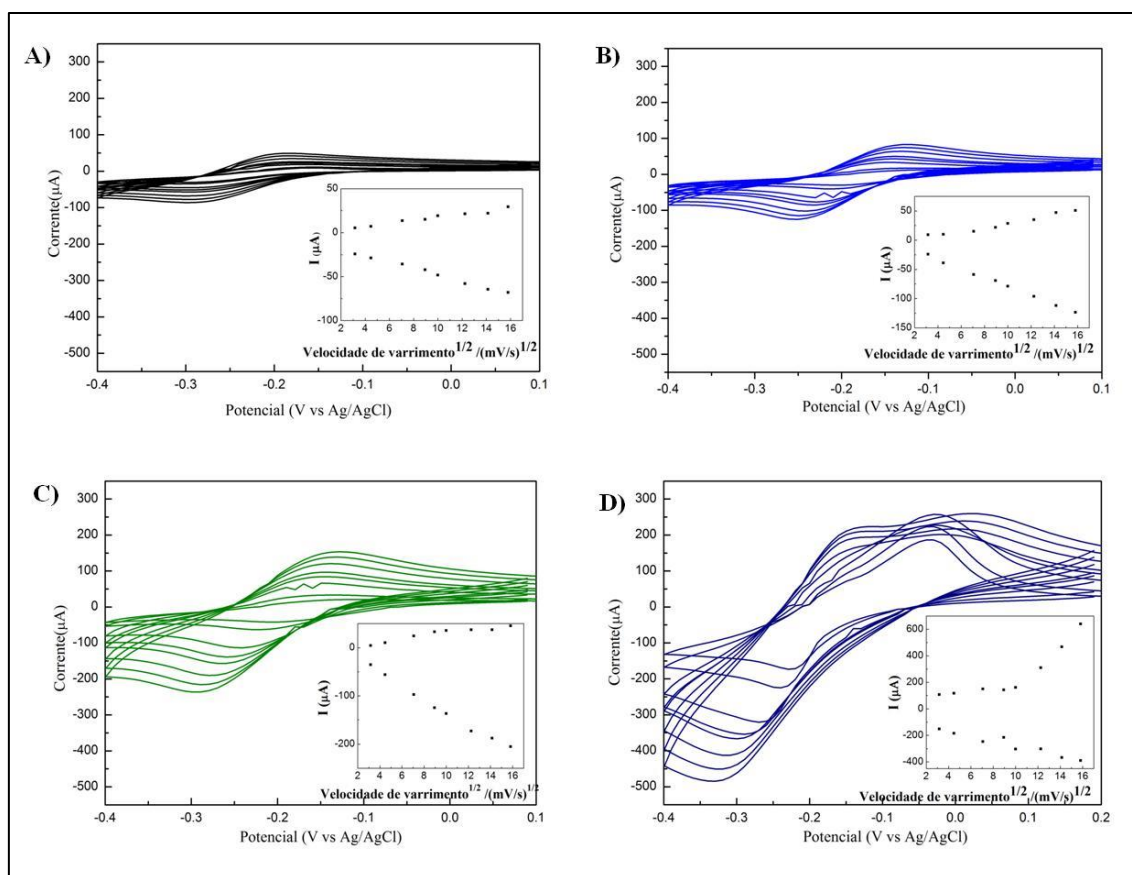


Figura 5.15. Voltamogramas cíclicos de 2mM PMS, 0,1M de KCl, nos eléctrodos de WO₃ estudados a diferentes velocidades de varrimento desde 10-250 mV/s. A) Eléctrodo Vidro/ITO. B) Eléctrodo EOr3. C) Eléctrodo EHex3. D) Eléctrodo EHexP1.

Os voltamogramas cíclicos apresentados na **figura 5.15** permitiram calcular os parâmetros relativos à redução/oxidação electroquímica do PMS nos eléctrodos modificados. Os resultados são apresentados na **tabela 5.9**.

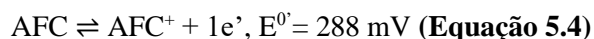
Tabela 5.9. Parâmetros electroquímicos de 2mM PMS, 0,1M KCl, no vidro/ITO e nos eléctrodos EOr3, EHex3 e EHexP1, numa gama de velocidades de varrimento de 10-250 mV/s. Os parâmetros calculado para o eléctrodos de controlo, EOr3 e EHex3 são o resultado da média dos valores de cinco eléctrodos diferentes, enquanto no caso do eléctrodo EHexP1 são o resultado apenas de um eléctrodo.

Amostra	I _a /I _c	ΔE _p (mV)	E ⁰ (mV)
Vidro/ITO	0,42 ± 0,1	126 ± 6	235 ± 4
EOr3	0,33 ± 0,1	116 ± 13	177 ± 15
EHex3	0,23 ± 0	134 ± 13	185 ± 13
EHexP1	0,89	308	148

A razão dos picos dos eléctrodos modificados apenas com nP's é muita baixa, e consegue mesmo ser inferior ao eléctrodo de controlo. No eléctrodo EHexP1, apesar da razão da intensidade dos picos ser superior á obtida no eléctrodo de controlo, ainda está distante do valor teórico ($I_a/I_c=1$) [53]. Os valores de ΔE_p para todos os eléctrodos estão afastados do valor esperado (59 mV/s) [53] e sendo a diferença mais marcante no eléctrodo EHexP1. Também os valores de potencial formal estão distantes do valor teórico de -112 mV [51]. Estes valores estão de acordo com um processo electroquímico quasi-reversível. Por conseguinte, os resultados apresentados indicam que os eléctrodos construídos não favorecem a electroquímica do PMS.

5.2.4. Teste dos eléctrodos com ácido ferroceno carboxílico.

O ácido ferroceno carboxílico (AFC) foi outro dos compostos usados para os eléctrodos de controlo, EOr3 e EHex3. A reacção de redução do AFC [70] é descrita na **equação 5.4**:



Na **figura 5.16** apresenta-se os voltamogramas cíclicos do AFC nos eléctrodos estudados, podendo observar-se que os picos de oxidação e redução estão bem definidos. A corrente dos picos oxidação e redução dos eléctrodos EOr3 e EHex3 varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varrimento, o que demonstra que o processo electroquímico é controlado por difusão.

A *performance* dos eléctrodos foi avaliada através da comparação dos parâmetros electroquímicos apresentados na **tabela 5.10**, os quais foram calculados a partir dos voltamogramas cíclicos da **figura 5.16**.

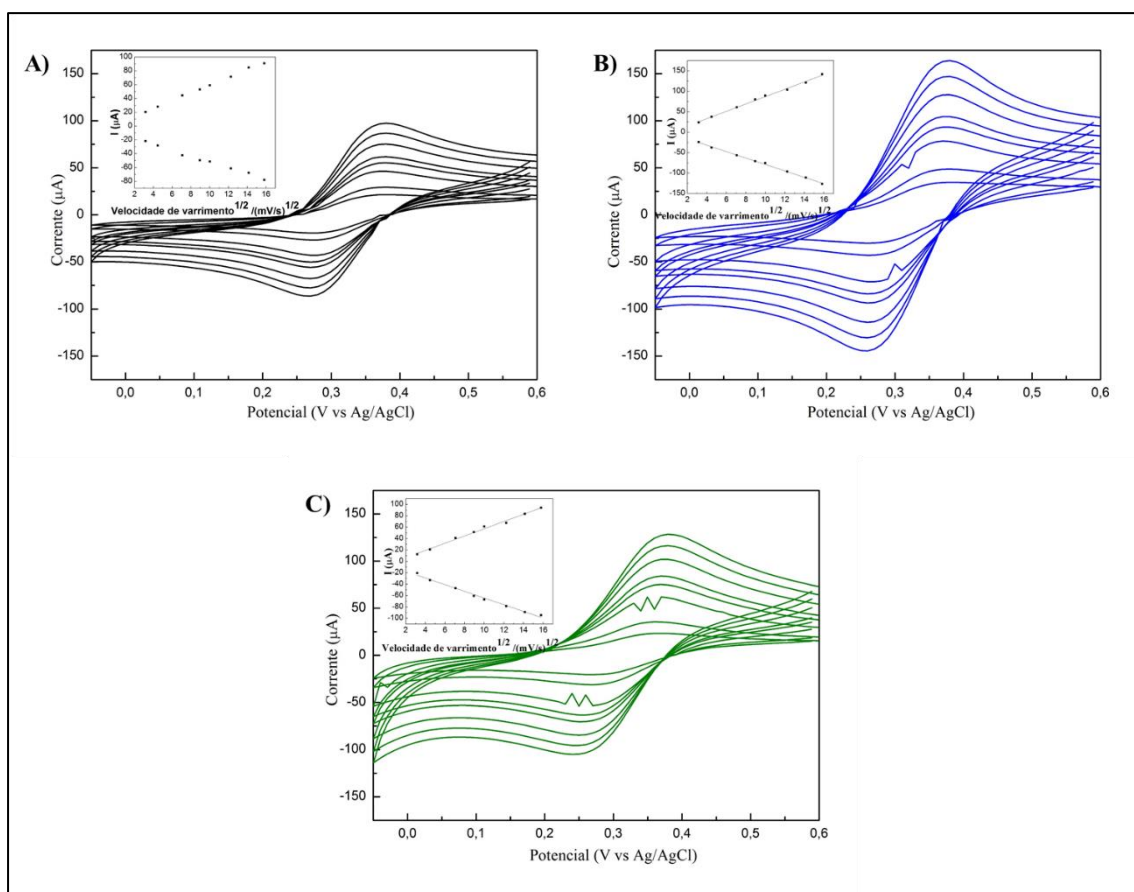


Figura 5.16. Voltamogramas cíclicos de 2mM de AFC, 0,2M de Na_2HPO_4 , usando eléctrodos modificados com nP's WO_3 , registados a diferentes velocidades de varrimento (10-250 mV/s). A) Eléctrodo Vidro/ITO. B) Eléctrodo EOr3. C) Eléctrodo EHex3.

Tabela 5.10. Parâmetros electroquímicos calculados para 2mM AFC, 0,2M de Na_2HPO_4 , no vidro/ITO e nos eléctrodos EOr3, EHex3, numa gama de velocidades de varrimento de 10-250 mV/s. Os valores aprentados são o resultado da média de cinco electrodos diferentes.

Amostra	I_c/I_a	ΔE_p (mV)	E^0 (mV)	A_e (cm ²)
Vidro/ITO	$0,90 \pm 0$	116 ± 8	330 ± 8	$0,17 \pm 0$
EOr3	$0,93 \pm 0,1$	119 ± 7	319 ± 1	$0,18 \pm 0$
EHex3	$1,11 \pm 0,1$	125 ± 14	317 ± 4	$0,15 \pm 0$

A razão da corrente dos picos nos eléctrodos EOr3 e EHex3 melhorou face ao eléctrodo de controlo e estão próximos do valor teórico ($I_c/I_a=1$). Os valores de ΔE_p aumentaram face ao eléctrodo de controlo e são muito superiores ao valor teórico 59 mV/s. Enquanto os valores do potencial de redução formal dos eléctrodos EOr3 e EHex3, estão próximo aos valores da literatura [71]. Estes parâmetros indicam que se está na presença de um sistema quasi reversível.

A área electroactiva foi calculada através da equação de *Sevick-Randles* e tendo em conta que o coeficiente de difusão é igual a $5,7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [72 - 73]. A área electroactiva dos eléctrodos EOr3 e

EHex3 são praticamente iguais tendo em conta o erro. No entanto a área electroactiva dos três eléctrodos é inferior á área geométrica ($0,64 \text{ cm}^2$). Esta diferença pode ser explicada pelo facto de durante a actividade experimental ter-se observado que o AFC não estar totalmente dissolvido. Por isso repetiram-se as experiências em tampão $0,1 \text{ M}$ citrato, a $\text{pH } 7$, os resultados são apresentados na **figura 5.17**.

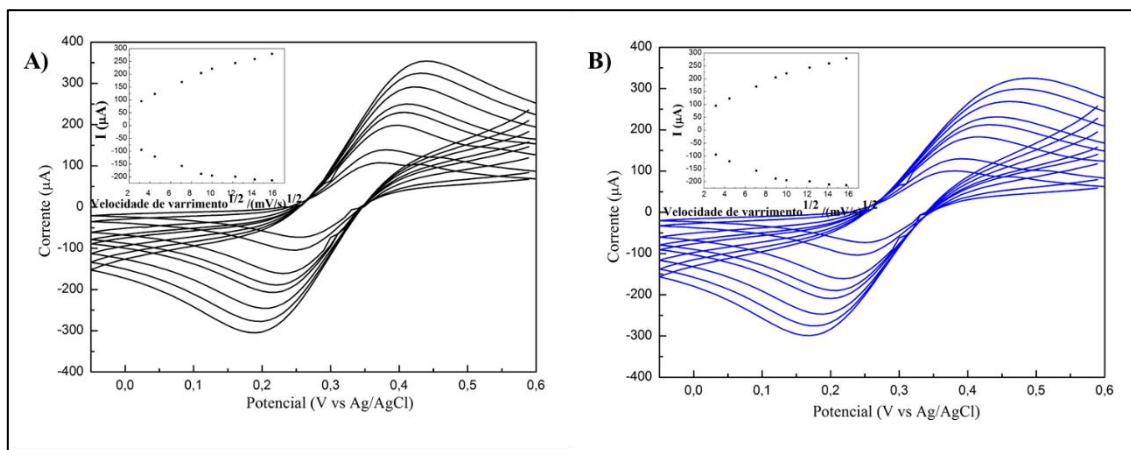


Figura 5.17. Voltamogramas cíclicos de 2mM de AFC em tampão $0,1 \text{ M}$ citrato, $\text{pH } 7$, nos eléctrodos de controlo e EOr3 estudados a diferentes velocidades de varrimento ($10\text{-}250 \text{ mV/s}$); os testes foram realizados em duplicado. A) Eléctrodo Vidro/ITO. B) Eléctrodo EOr3.

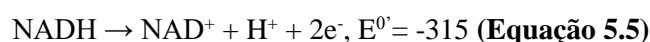
Os voltamogramas do eléctrodo de controlo e o eléctrodo EOr3 (**figura 5.17**), mostram picos bem definidos. Ao contrário do que tinha acontecido quando AFC é dissolvido em água, a corrente dos picos anódicos e catódicos do eléctrodo EOr3 não varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varrimento, o que significa que o processo electroquímico não é controlado por difusão ou pelo menos não totalmente, podendo ter associado um processo de adsorção. Os parâmetros electroquímicos calculados para estes eléctrodos são apresentados na **tabela 5.11**. Contudo, estes não demonstraram nenhuma melhoria face aos parâmetros apresentados na **tabela 5.10**, para os mesmos eléctrodos. Por isso, pode-se concluir que os eléctrodos analisados nesta secção não favorecem a electroquímica do AFC.

Tabela 5.11. Parâmetros electroquímicos calculados para 2mM de AFC em tampão $0,1 \text{ M}$ citrato, $\text{pH } 7$, no vidro/ITO e nos eléctrodos EOr3 numa gama de velocidades de varrimento de $10\text{-}250 \text{ mV/s}$. Os testes foram realizados em duplicado.

Amostra	I_c/I_a	ΔE_p (mV)	E^0 (mV)
Vidro/ITO	$0,88 \pm 0$	177 ± 3	310 ± 7
EOr3	$0,89 \pm 0$	233 ± 7	321 ± 0

5.2.5. Teste dos eléctrodos com NADH.

A oxidação electroquímica do NADH (nicotamina adenina dinucleotido) é de grande interesse, uma vez que este composto é necessário para o funcionamento de uma larga variedade de biossensores baseados em desidrogenases [74]. Por isso, nesta secção estudou-se o comportamento electroquímico do NADH usando os eléctrodos EHex3 e EHexP1. Os voltamogramas cíclicos obtidos são apresentados na **figura 5.18**, nos quais se pode observar um pico de oxidação a cerca de 1 V, em ambos os casos. A oxidação electroquímica do NADH é descrita na **equação 5.5**:



O pico de oxidação do NADH nos eléctrodos, aparece a um potencial mais alto do que por exemplo no caso dos eléctrodos com nanotubos de carbono onde o pico de oxidação surge a 0,47 V [74]. Além disso, os voltamogramas cíclicos não apresentam nenhum pico de redução o que indica que com este tipo de eléctrodos não consegue regenerar o NADH.

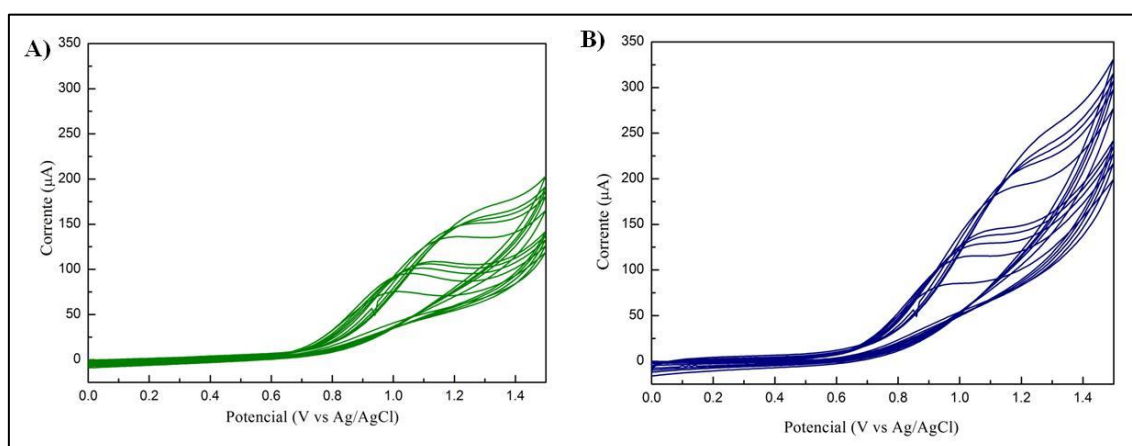


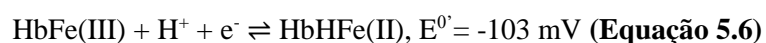
Figura 5.18. Voltamogramas cíclicos de 5mM de NADH em tampão 0,05 M tris-HCl, pH 8,5, usando os eléctrodos de WO₃, estudados a diferentes velocidades de varrimento desde 2-150 mV/s. A) Eléctrodo EHex3. B) Eléctrodo EHexP1.

A estabilidade da solução de NADH foi monitorizado por espectrofotometria de absorção UV-Vis. Os espectros de absorvância (**figura 0.4 informação suplementar**) demonstram que a solução de NADH mantém-se estável não só ao longo dos ensaios electroquímicos, como também ao longo do tempo, visto que os espectros não sofreram alteração (resultados não apresentados).

Devido ao fraco comportamento electroquímico do NADH nos eléctrodos estudados, não foi realizado mais nenhum teste com este composto.

5.2.6. Teste dos eléctrodos na presença de hemoglobina.

Nos últimos anos tem-se assistido a uma maior investigação da estrutura das proteínas, do mecanismo de transformação redox destas e dos processos metabólicos que envolvem a transformação redox, dando assim um impulso ao desenvolvimento de novos biossensores. A hemoglobina é uma importante proteína redox, existente nos glóbulos vermelhos, que participa em diferentes funções fisiológicas, incluindo o transporte de O₂; esta proteína contém, como grupo prostético, um complexo porfírico com ferro (II) ou hemina (III). A reação redox desta proteína é apresentada na **equação 5.6** [75]. Refira-se que a hemoglobina pode ser usada para catalisar a redução do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) [75].



Nos voltamogramas cíclicos da **figura 5.19** compara-se a resposta da hemoglobina no vidro coberto com ITO (**figura 5.19 A**) e com o eléctrodo EHexP1 (**Figura 5.19B**). Como se pode constatar, não se observou nenhuma vantagem na aplicação das nP's de WO₃, uma vez que os voltamogramas cíclicos da **figura 5.19.B** não apresentam nenhum sinal electroquímico. O mesmo ocorre no caso do voltamograma cíclico da **figura 5.19.C** onde a única diferença é a proteína ter sido adsorvida ao eléctrodo EHexP1. O facto de não existirem sinais redox nos voltamogramas cíclicos pode ser explicado por não ocorrer transferência electrónica heterogénea ou a ocorrer, será a uma taxa bastante lenta. Provavelmente, a hemoglobina não apresenta electroactividade nos eléctrodos estudados, devido aos seus grupos prostéticos estarem bastante profundos na sua estrutura, bem como a proteína poder adquirir uma orientação desfavorável no eléctrodo [75 - 76].

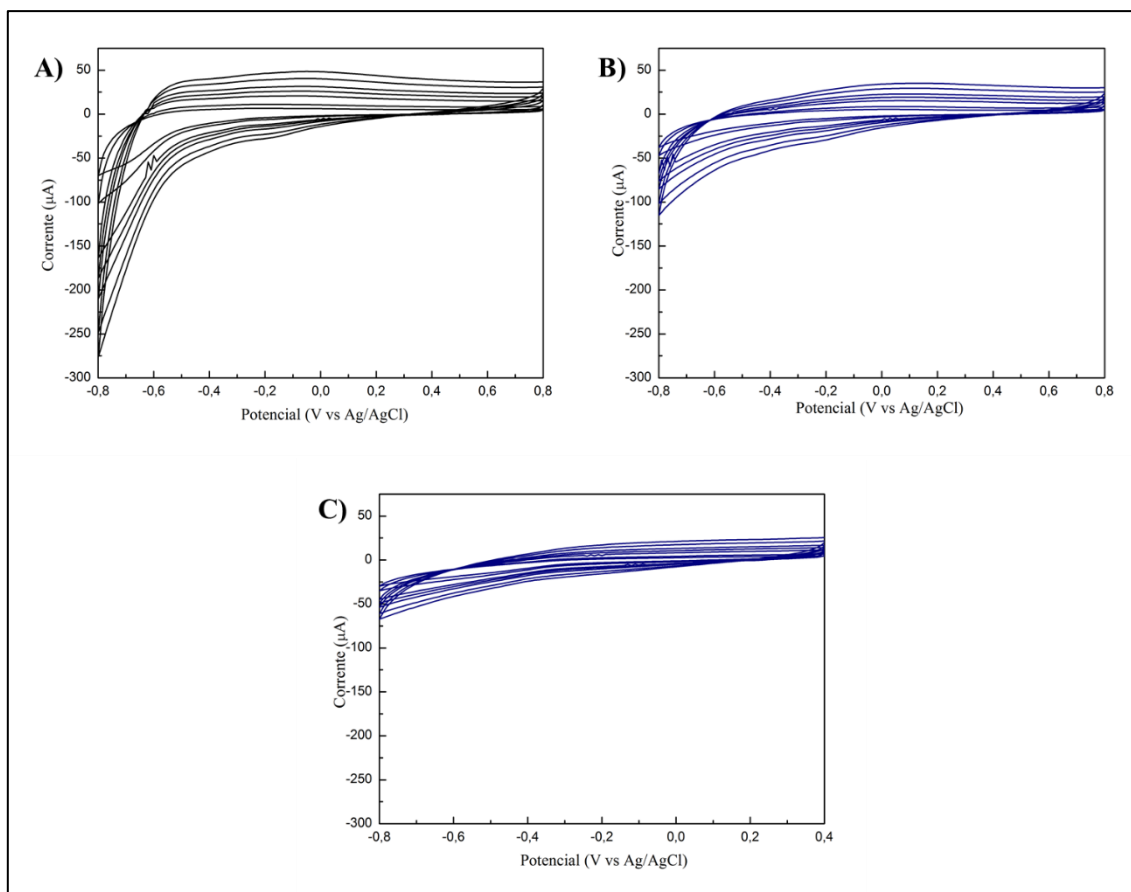


Figura 5.19. Voltamogramas cíclicos de hemoglobina (4.0 mg/ml) em tampão 0,1 M fosfato, pH 6,1, numa gama de velocidades de varrimento entre 10-200 mV/s. A) Vidro/ITO B) Eléctrodo EHexP1 C) Eléctrodo EHexP1 modificado com 5 µl de solução de hemoglobina adsorvida.

A estabilidade da hemoglobina foi seguida por espectrofotometria de UV-Vis, tendo-se realizado um espectro com a solução fresca e outro após medidas de voltametria cíclica; estes resultados são apresentados na **figura 0.5 (informação suplementar)**. A posição da banda de absorção *Soret* do grupo do hemo prostético possibilita informações sobre a possível desnaturação das proteínas hémicas, especialmente quando ocorre uma mudança conformacional na região do grupo hémico. No caso da hemoglobina usada neste trabalho apresenta a banda de Soret situou-se na mesma posição da proteína nativa (409 nm), antes e depois das medidas [75].

No decorrer deste trabalho experimental ainda se tentou adsorver a solução de hemoglobina a um substrato flexível, no qual se depositou, previamente, uma camada de nP's de WO_3 nP- Na_2SO_4 -P75_t120 com PVP na proporção 3:1 (compósito). Os substratos escolhidos foram o papel de carbono e o kapton com grafeno. De acordo com os resultados apresentados na **figura 0.7 (informação suplementar)**, não se observa nenhum sinal redox para ambos os substratos. No caso do papel de carbono (**figura 0.7.A, informação suplementar**), mesmo que houvesse picos redox da hemoglobina estes seriam mascarados pela elevada corrente deste eléctrodo. No caso do kapton com grafeno (**figura**

0.7.A, informação suplementar) observou-se, experimentalmente, que o eléctrodo se danificava após as medidas de voltametria cíclica, uma vez que o grafeno e o compósito se soltavam da superfície.

Por isso, à semelhança do que aconteceu na secção anterior, e visto que também aqui os eléctrodos não revelaram ter um bom desempenho electroquímico, não foi realizado mais nenhum teste com esta proteína.

5.2.7. Teste dos eléctrodos na presença de citocromo *c*.

Nesta secção avaliou-se o comportamento do citocromo *c* (cit. *c*) em solução, usando os eléctrodos EHex3 e EHexP1 como eléctrodos de trabalho. Além disso, testou-se o cit. *c* adsorvido no eléctrodo EHexP1, através de dois processos diferentes; no primeiro, a adsorção ocorre com o eléctrodo mergulhado durante 2 h na solução de cit. *c* e, de modo a simplificar a sua identificação, a partir daqui passa a ser designado por EHexP1a. Num segundo processo, depositou-se 10 µl de cit. *c* misturado com triton X-100 sobre o eléctrodo e deixou-se secar ao ar, passando a designar-se por EHexP1b. Os voltamogramas cíclicos resultantes deste estudo são apresentados na **figura 5.20**. Quando os eléctrodos EHex3 (**figura 5.20.B**), EHexP1 (**figura 5.20.C**), EHexP1a (**figura 5.20.D**) e EHexP1b (**figura 5.20.E**) foram usados, são observados picos de oxidação e redução, ao contrário do que acontece com o eléctrodo de controlo (**figura 5.20A**) que não apresenta nenhum pico, demonstrando assim que a resposta electroquímica com o citocromo *c* era inexistente sem a presença das nP's WO₃. Tal facto indica que a interface de WO₃ nanoestruturado facilita, não apenas a troca de electrões com pequenas espécies redox inorgânicas, mas também com moléculas biológicas estruturalmente muito maiores e mais delicadas, como por exemplo o citocromo *c*. O par de picos redox que se observa em todos os eléctrodos com nP's de WO₃, numa gama de velocidades de varrimento de 10 - 750 mV/s, são o resultado da transferência de electrões directa do par redox Fe^{III}/Fe^{II} no hemo da proteína. No caso do eléctrodo EHex3, os picos não são tão definidos como no eléctrodo EHexP1, o que associado ao facto de quando se adsorve o citocromo *c* as nP's se soltarem, levou a que não se realizasse mais nenhum teste com este eléctrodo. Através dos voltamogramas cíclicos da **figura 5.20** ainda se pode concluir que o processo é controlado por difusão, o que é indicada pela dependência linear da corrente do pico com a raiz quadrada da velocidade de varrimento.

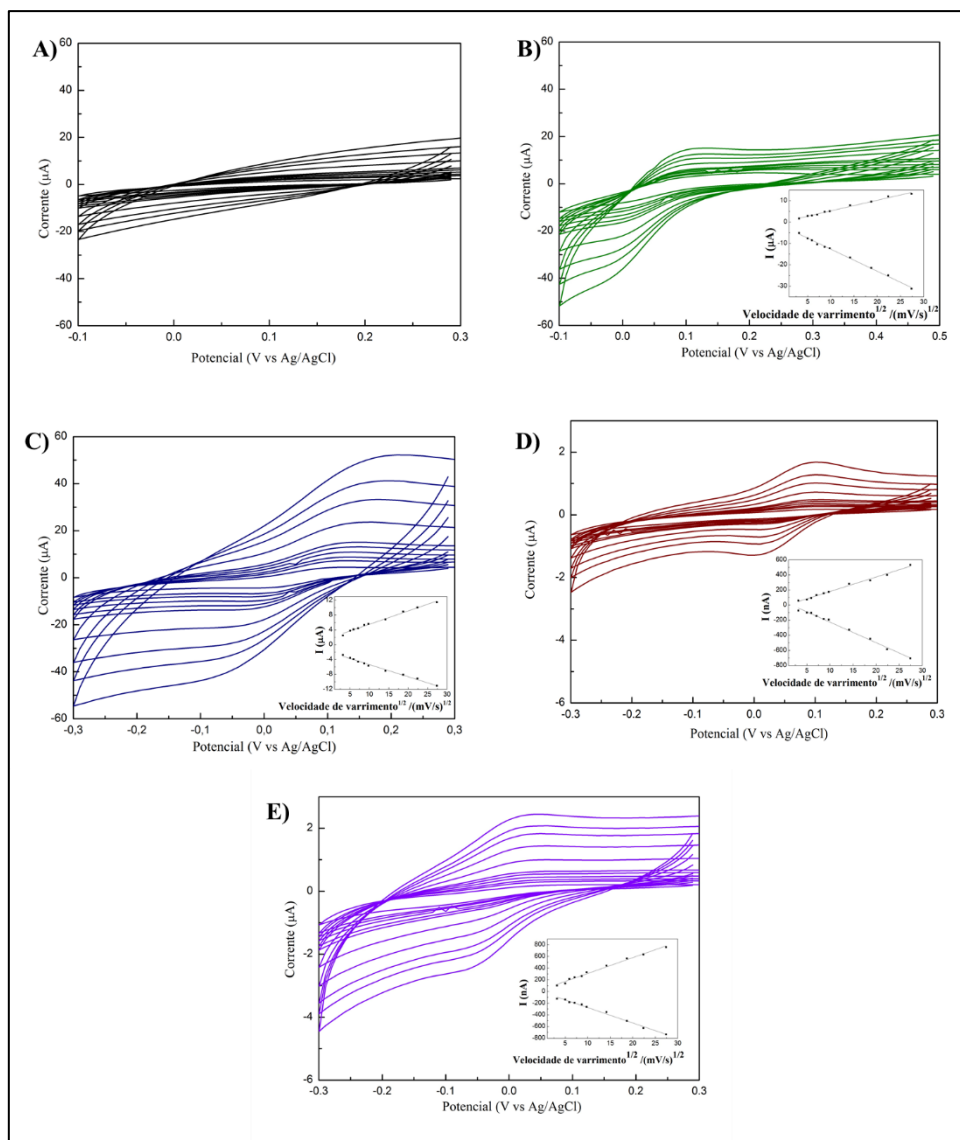


Figura 5.20. Voltamogramas cíclicos de cit. *c* (0,2 mM): A, B e C foram registados em tampão 0,05 M tris-HCl, pH 7,6 e os voltamogramas cíclicos D e E são obtidos em tampão 0,05 M tris-HCl, pH 7,6. Os VC foram traçados numa gama de velocidades de varrimento entre 10-750 mV/s. As medidas foram realizadas em duplicado. A) Vidro com ITO, B) Eléctrodo EHex3. C) Eléctrodo EHexP1. D) Eléctrodo EHexP1a. E) Eléctrodo EHexP1b.

Os parâmetros I_c/I_a , ΔE_p e E^0 apresentados na **tabela 5.12**, foram posteriormente comparados, para avaliar a reversibilidade do sistema. Os resultados obtidos com os eléctrodos com nP's de WO_3 são consistentes com um sistema quasi-reversível. Os valores de E^0 estão próximos do valor teórico de 40 mV [77 - 78].

O coeficiente de difusão (D_0) foi calculado através da equação de *Randles-Sevick* e apresenta valores inferiores aos apresentados na literatura [79], o que significa que o transporte de massa do cit. *c* ocorre com menor facilidade.

A constante de troca electrónica heterogénia (k^0) foi determinada usando o método de *Kochi* [80] que deriva da equação de Nicholson (**equação 5.7**)[81]:

$$k^0 = \left(\frac{vnFD_0}{RT} \right)^{0,5} \exp \left(- \frac{2nF\Delta E_p}{RT} \right) \quad (\text{Equação 5.7})$$

onde α é o coeficiente de transferência de carga (0,5) e v a taxa da velocidade de varrimento (F, R e T são constantes). Os valores de k^0 do citocromo *c* nos eléctrodos modificados são consistentes com os da literatura [79], os eléctrodos EHex3 e EHexP1 que apresentam valores mais elevados, o que pode ser explicado por uma troca electrónica mais rápida.

Tabela 5.12. Parâmetros calculados a partir dos voltamogramas cíclicos de 0,2 mM de citocromo *c*, em tampão 0,05 M tris-HCl, pH 7,6.

Amostra	I _c /I _a	ΔE _p (mV)	E ⁰ (mV)	D ₀ (cm ² s ⁻¹)	K ⁰ (cm ¹ s ⁻¹)
EHex3	0,36 ± 0,1	121 ± 3	50 ± 3	3,63x10 ⁻⁵ ± 3,4x10 ⁻⁶	0,10 ± 0
EHexP1	0,92 ± 0,2	142 ± 4	59 ± 4	8,82x10 ⁻⁶ ± 1,5x10 ⁻⁶	0,14 ± 0
EHexP1a	0,79 ± 0	75 ± 4	65 ± 3	3,93x10 ⁻⁸ ± 4,0x10 ⁻⁸	2x10 ⁻³ ± 1x10 ⁻³
EHexP1b	1,16 ± 0,1	95 ± 1	6 ± 4	1,82x10 ⁻⁸ ± 0.1x10 ⁻⁸	2x10 ⁻³ ± 0

À semelhança do que se fez para a hemoglobina, também aqui se testou um substrato flexível, o papel de *screen printing*. Este foi depositado com IZO (óxido de índio zinco) e com ouro. Os voltamogramas cíclicos são apresentados na **figura 0.8 (informação suplementar)**. Através destes voltamogramas cíclicos pode-se concluir que a electroquímica neste substrato, e na presença de nP's de WO₃/PVP, não é favorável, uma vez não se terem detectados quaisquer sinais redox.

Por fim, monitorizou-se a integridade da solução de cit. *c*, os espectros de absorvância são apresentados na **figura 0.6 (informação suplementar)**, demonstrado que o cit. *c* se mantém estável ao longo das varias experiências de voltametria cíclica, já que não ocorre desvios da banda de *Soret* entre o espectro da solução fresca e espectro realizado após várias medidas de voltametria cíclica [77].

5.3. Prova de conceito: sensor amperimétrico de peróxido de hidrogénio

Como já ficou demonstrado na secção anterior, a presença do WO₃ nanoestruturado possibilita a transferência electrónica directa de electrões com o citocromo *c*. Este resultado forneceu uma base para a construção de um biossensor modificado de 3ª geração para detecção de peróxido de hidrogénio (H₂O₂), dado que o cofactor hemo *c*, tem sido referido na literatura [18], como tendo um sítio activo onde ocorre a catálise da redução deste substrato.

5.3.1. Teste do biossensor amperimétrico.

Na **figura 5.21** são apresentados os resultados das respostas dos sensores EHexP1a (**figura 5.21 B e C**), EHexP1b (**figura 5.21 D e E**) e do eléctrodo de controlo (**figura 5.21 A**) ao aumento da concentração do H₂O₂. Os valores da concentração de H₂O₂ foram determinados por espectrofotometria

e corrigidos nos cálculos dos parâmetros cinéticos e analíticos. Comparando os voltamogramas cíclicos dos eléctrodos EHexP1a e EHexP1b com o eléctrodo de controlo (EHexP1), pode-se concluir que o cit. *c* não é a única espécie a responder à presença de H_2O_2 , observando-se a interferência do WO_3 . No entanto, na presença da proteína existe um aumento da corrente na resposta ao H_2O_2 .

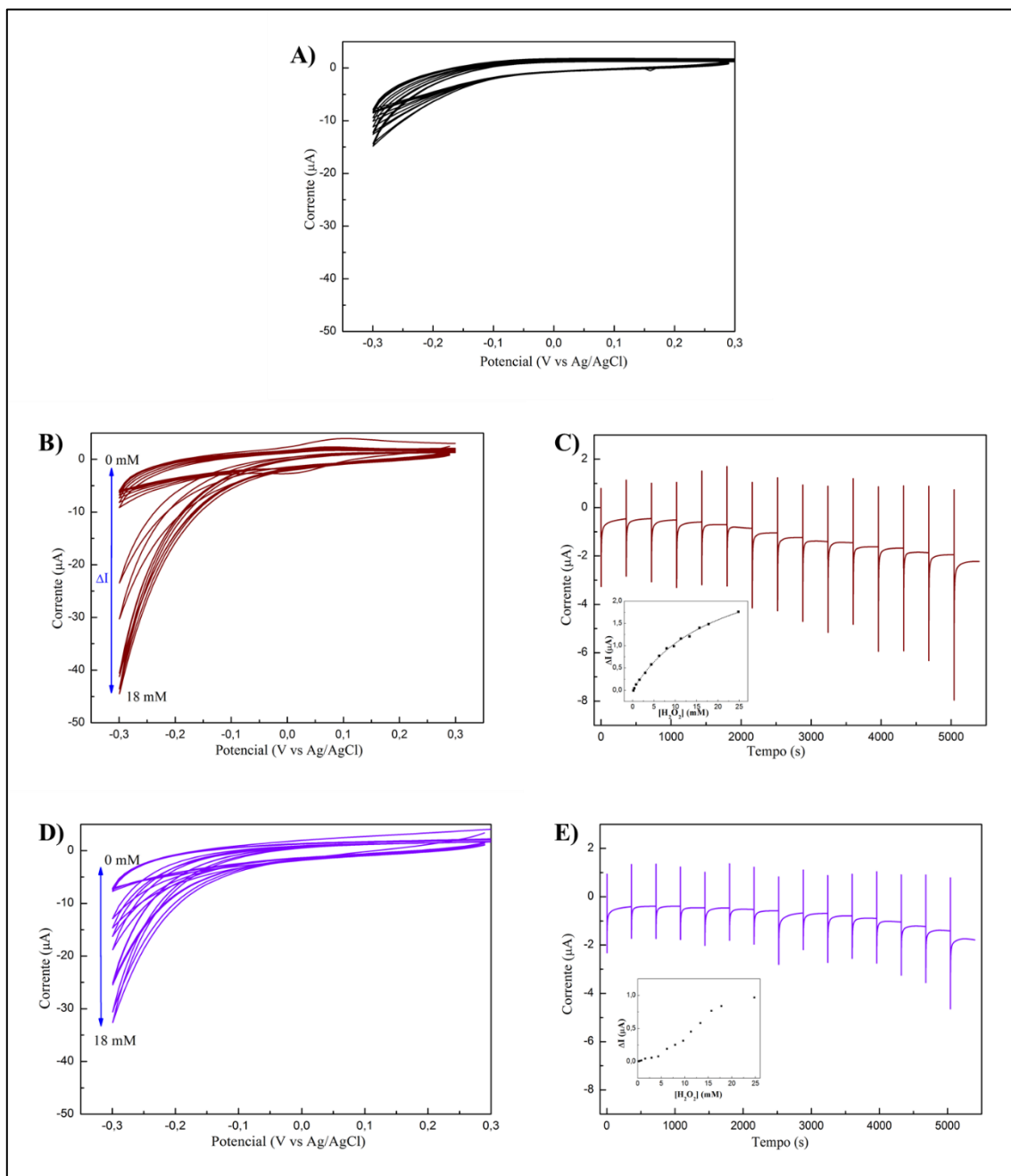


Figura 5.21. Resposta electroquímica á variação da concentração de H_2O_2 em tampão 0.05 M tris-HCl, pH 7,6, com 0,1M KCl nos electrodos de controlo e modificados com cit. *c*. As medidas foram realizadas em duplicado. A) Voltamogramas cíclicos no eléctrodo de controlo (EHexP1). B) Voltamogramas cíclicos no eléctrodo EHexP1a. C) Resposta amperimétrica com o gráfico da corrente catalítica em função da $[\text{H}_2\text{O}_2]$ no eléctrodo EHexP1a e a respectiva curva de aproximação á equação de Michaelis-Menten. D) Voltamogramas cíclicos no eléctrodo de controlo EHexP1b. E) Resposta amperimétrica com o gráfico da corrente catalítica em função da $[\text{H}_2\text{O}_2]$ no eléctrodo EHexP1b e a respectiva curva de aproximação á equação de Michaelis-Menten.

Os voltamogramas cíclicos dos sensores EHexP1a e EHexP1b foram realizados a uma velocidade de varrimento de 750 mV/s. Estes demonstram o aumento da corrente catódica correspondente à redução electrocatalítica do H₂O₂ (mecanismo apresentado na **figura 5.22**), demonstrando existir uma biocompatibilidade entre o cit. *c* e as nanopartículas de WO₃.

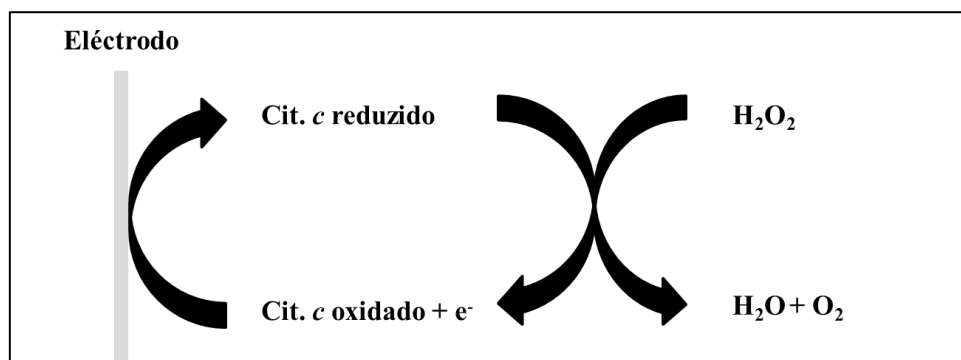


Figura 5.22. Mecanismo da reacção de redução electrocatalítica do H₂O₂.

A corrente catalítica foi determinada a -300 mV, através da diferença das correntes catódicas na presença e na ausência de H₂O₂. A curva da corrente catalítica em função da concentração de H₂O₂ (**figura 5.21 C e E**) pode ser ajustada a uma versão electroquímica da equação de *Michaelis-Menten* (**equação 5.8**) [17]:

$$I_{Cat} = \frac{I_{max}C}{C+K_M} \text{ (Equação 5.8)}$$

onde I_{max} é a corrente catalítica máxima quando o sistema está saturado com analito (H₂O₂), C a concentração de H₂O₂ e K_m a constante de *Michaelis-Menten*. Esta constante só foi possível calcular para os eléctrodos EHexP1a, uma vez que os resultados para os eléctrodos EHexP1b não se ajustavam à equação de *Michaelis-Menten*.

Na **tabela 5.13** são apresentados o valor de K_M para o sensor EHexP1, bem como a zona de linearidade, o limite de detecção mínimo (LDM) e a sensibilidade para ambos os sensores. A sensibilidade foi calculada através do declive da recta.

Tabela 5.13. Parâmetros cinéticos e analíticos dos bioeléctrodos EHexP1a e EHexP1b .

Sensor	K_M (μM)	LDM (mM)	Zona de linearidade (mM)	Sensibilidade (mAM ⁻¹ cm ⁻²)
EHexP1a	$6,25 \times 10^5 \pm 6 \times 10^5$	0,2	0,2 - 8	$0,08 \pm 0,01$ $R^2=0,96$
EHexP1b	-	0,8	0,8 - 10	$0,05 \pm 0,01$ $R^2= 0,97$

Os valores de LDM e a zona de linearidade são superiores para os sensores aqui estudados do que na literatura [18]. Sendo por isso esperados os valores baixos de sensibilidade com os respectivos coeficientes de correlação apresentados na **tabela 5.13**. No entanto o sensor EHexP1a demonstra uma selectividade ligeiramente maior para o H_2O_2 do que o sensor EHexP1b.

Por fim, o sensor EHexP1a foi testado numa amostra de detergente tira-nódoas, na presença de peróxido de hidrogénio. A resposta amperométrica (**figura 5.23 A**) demonstra um aumento da corrente com as sucessivas adições de amostra real, provando-se que o biossensor pode ser aplicado nestas matrizes. A fim de avaliar o possível efeito de interferentes passíveis de reagir com o cit. *c*, apresenta-se na **figura 5.23 B** a resposta amperimétrica do eléctrodo EHexP1a, após adição do nitrito, na presença de 4,5 mM de H_2O_2 . Tal como se pode ver, a corrente não se altera, comprovando que o nitrito não interfere na detecção do analito. Contudo, apesar de promissores, estes resultados carecem de validação, através da realização de experiências de controlo, nomeadamente, no eléctrodo modificado sem cit. *c*.

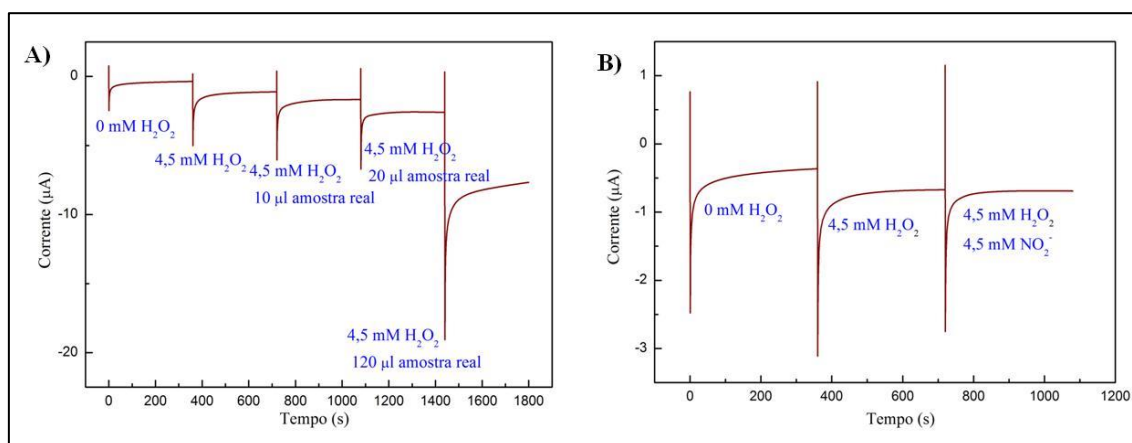


Figura 5.23. Resposta amperimétrica em tampão 0.05 M tris-HCl, pH 7,6, com 0,1 M de KCl no eléctrodo EHexP1a a um potencial de -300 mV. A) Resposta a uma amostra real (detergente tira-nodoas). B) Estudo da interferência de NO_2^- .

5.4. Caracterização morfológica dos eléctrodos de WO_3

Nesta secção pretende-se estudar a morfologia dos eléctrodos. Em primeiro lugar verificou-se como as nP's de WO_3 cobrem o substrato e como se organizam em camadas, a seguir a aderência destas ao substrato depois de realizadas medidas electroquímicas e, por fim, determinou-se as espessuras dos filmes dos vários eléctrodos.

5.4.1. Microscopia electrónica de varrimento

Com o auxílio desta técnica, visualizou-se a cobertura dos eléctrodos EOr3 e EHex3 (**figura 5.24**), pelas respectivas nP's de WO_3 .

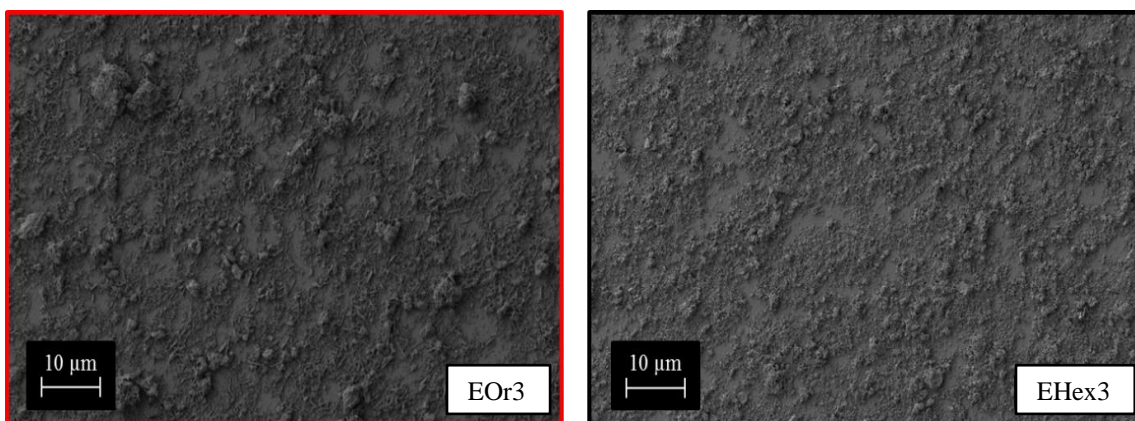


Figura 5.24. Imagens de SEM dos eléctrodos EOr3 e EHex3. A cor do contorno da imagem está relacionada com a estrutura cristalina das nP's usadas: vermelho – estrutura ortorrômbica hidratada e a preto – estrutura hexagonal.

Na **figura 5.24** observa-se que os eléctrodos EOr3 e o EHex3 não estão totalmente cobertos pelas nP's de WO_3 , deixando espaços vazios. Em ambos os eléctrodos existem aglomerados das nP's de WO_3 . Estas imagens foram obtidas antes dos eléctrodos serem submetidos a testes electroquímicos. A seguir na **figura 5.25** são apresentadas imagens de SEM destes mesmos eléctrodos, mas depois de terem sido realizados testes electroquímicos.

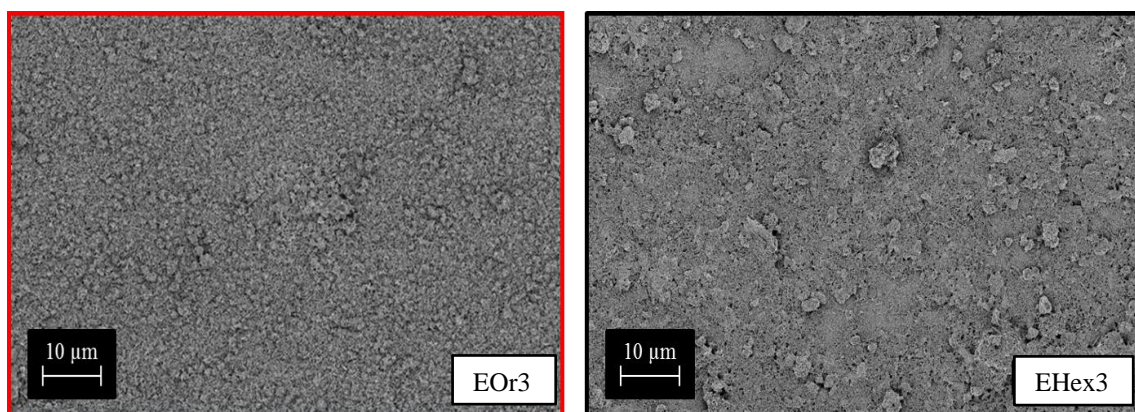


Figura 5.25. Imagens de SEM dos eléctrodos EOr3 e EHex3 depois dos testes electroquímicos. A cor do contorno da imagem está relacionada com a estrutura cristalina das nP's usadas: vermelho – estrutura ortorrômbica hidratada e a preto – estrutura hexagonal.

Na **figura 5.25** pode-se observar que após os testes electroquímicos os eléctrodos continuam cobertos com as nP's de WO_3 , se existir perda não se consegue visualizar nestas imagens e por isso realiza-se os testes de refletância (na secção 5.4.2) de modo a complementar estes resultados.

Por fim outra análise realizada foi a observação da sobreposição das camadas de nP's de WO_3 (**figura 5.26**) através da técnica SEM-FIB por *cross section*, estes eléctrodos não foram submetidos a nenhum teste electroquímico.

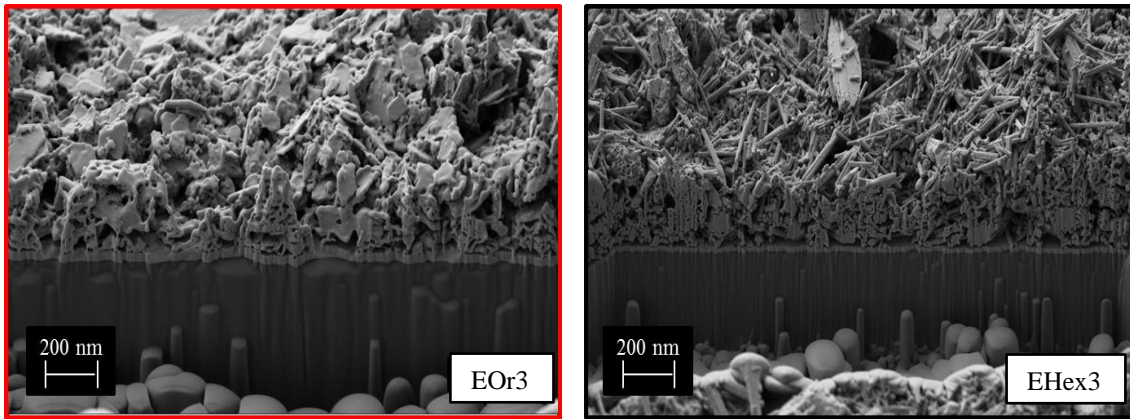


Figura 5.26. Imagens de SEM dos eléctrodos EOr3 e EHex3 obtidas pela técnica de *cross section*. A cor do contorno da imagem está relacionada com a estrutura cristalina das nP's usadas: vermelho – estrutura ortorrômbica hidratada e a preto – estrutura hexagonal.

As três camadas de nP's nos eléctrodos EOr3 e EHex3, não estão sobrepostas de forma regular. Além disso, em ambos os eléctrodos se observa espaços vazios entre camadas, o que pode facilitar as trocas electrónicas entre a proteína e as nP's de WO_3 mas, também, pode provocar uma maior degradação do eléctrodo. A rugosidade/porosidade de superfície aumenta a área superficial e deve facilitar a passagem da corrente.

5.4.2. Reflectância

Através desta técnica monitorizou-se a aderência das nP's de WO_3 nos eléctrodos, antes e após os testes electroquímicos descritos no capítulo 5.2. A seguir apresenta-se os gráficos de reflectância (**figura 5.27**), a qual vai depender da quantidade de nP's WO_3 nos eléctrodos EOr3, EHex3 e EHexP1.

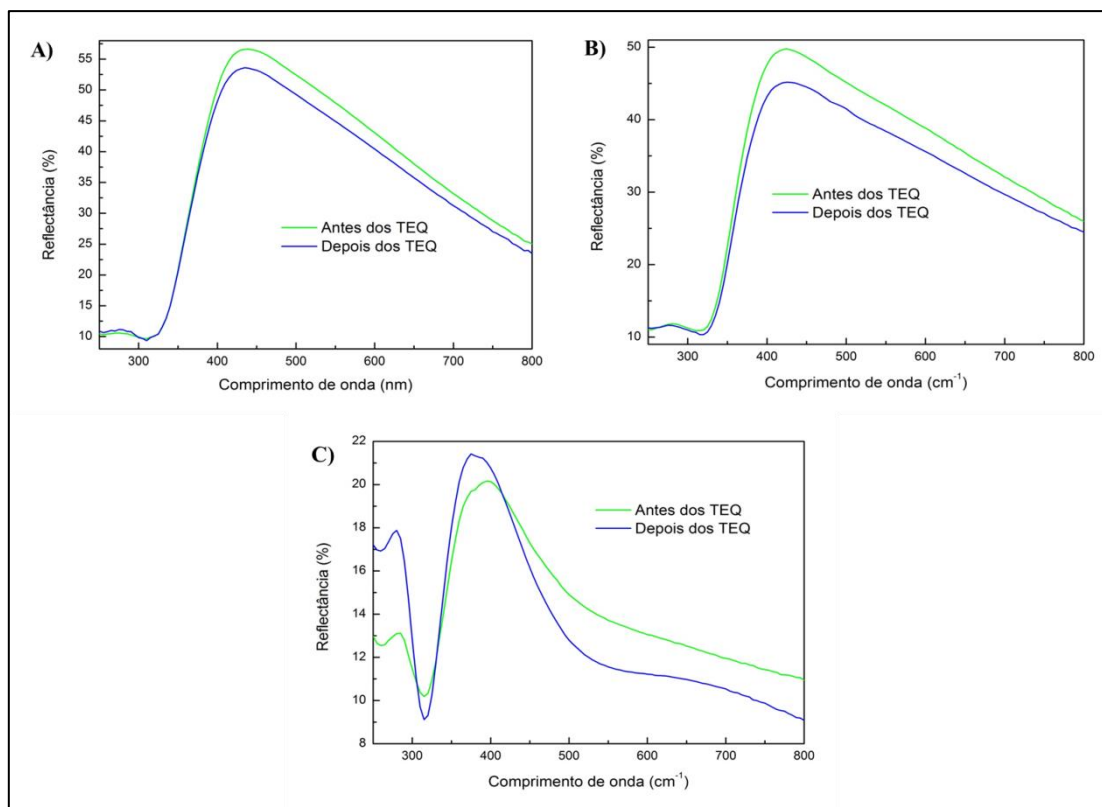


Figura 5.27. Espectros de reflectância que permitem a monitorização da aderência das nP's aos eléctrodos antes e depois de testes electroquímicos (TEQ). A) EOr3, B) EHex3 e C) EHexP1.

A **figura 5.27** demonstra que no caso dos eléctrodos EOr3 e EHex3 a reflectância diminuiu o que equivale a uma perda de nP's WO_3 , ao contrário do eléctrodo EHexP1 onde ocorre um aumento residual da reflectância. Este facto pode indicar que além de não ter ocorrido perda de nP's WO_3 ainda se pode ter ligado algumas moléculas, da substância analisada por VC, ao eléctrodo. Esta observação pode ser explicada pela presença do polímero PVP na solução de nP's nP- Na_2SO_4 -P75_t120, usada para construir o eléctrodo, já que o PVP deve ajudar na adesão das nP's nP- Na_2SO_4 -P75_t120 ao vidro com ITO. Outra observação é que a reflectância dos eléctrodos EOr3 e EHex3 é superior entre 25% a 30% ao eléctrodo EHexP1 o que era expectável visto que este último eléctrodo só tem uma camada de nP's de WO_3 ao contrário dos eléctrodos EOr3 e EHex3 com 3 camadas de nP's de WO_3 .

5.4.3. Perfilometria de contacto

Com o objectivo de determinar a espessura dos filmes dos eléctrodos de WO_3 que demonstraram ter um melhor desempenho electroquímico, recorreu-se á técnica de perfilometria de contacto. Os resultados são apresentados na **tabela 5.14**.

Tabela 5.14. Espessuras dos vários eléctrodos estudados. Os valores apresentados são a média de três medidas efectuadas em zonas distintas, em cada eléctrodo.

Eléctrodos	Espessura (μm)
EOr1	$0,07 \pm 0,02$
EOr3	$1,17 \pm 0,12$
EHex1	$0,07 \pm 0,01$
EHex3	$1,21 \pm 0,02$
EHexP1	$0,12 \pm 0,04$

Como se pode observar na **tabela 5.14** os eléctrodos de uma camada de nP's WO_3 (EOr1 e EHex1) têm uma espessura inferior ao dos eléctrodos de três camadas de nP's WO_3 (EOr3 e EHex3) em cerca de $1 \mu\text{m}$. Os filmes dos eléctrodos que têm o mesmo número de camadas, têm aproximadamente a mesma espessura, o que corrobora os resultados obtidos para as nanopartículas isoladas visto que as nP's tinham sensivelmente o mesmo tamanho e a mesma área específica. O filme do eléctrodo EHexP1 contém o polímero PVP, o que explica o facto do filme deste eléctrodo ser ligeiramente mais espesso que os filmes dos eléctrodos EOr1 e EHex1.

6. Conclusões e perspectivas futuras

As nanopartículas de óxido de tungsténio foram sintetizadas através do método hidrotermal assistido por micro-ondas. O uso deste método na síntese de nP's de WO_3 trouxe diversas vantagens em relação aos métodos convencionais como, por exemplo: os tempos de reacção rápidos (2h em vez de 8h); controlo da estrutura; morfologia das nanopartículas e baixo custo energético. A variação dos parâmetros de síntese no micro-ondas levou a uma melhoria significativa do rendimento da síntese das nP's de WO_3 , tendo aumentado em cerca de 30% o rendimento das nP's de WO_3 sintetizadas a 75W durante 2 h em relação às nP's de WO_3 sintetizadas a 150 °C durante 1 h. O uso de dois agentes direccionais de estrutura diferentes permitiu a obtenção de duas estruturas cristalográficas distintas: ortorrômbica hidratada e hexagonal. As nP's de WO_3 foram totalmente caracterizadas, utilizando diversas técnicas de microscopia e espectroscopia. Estas demonstraram que as nP's de WO_3 sintetizadas são muito semelhantes entre si, apesar de as nP's de WO_3 ortorrômbicas hidratadas apresentarem uma estrutura ligeiramente mais estável.

O vidro revestido com ITO foi o material que revelou um melhor desempenho electroquímico comparando com outros suportes testados. Sobre este, foram depositadas nP's de WO_3 sozinhas ou misturadas com o polímero PVP. Os eléctrodos foram caracterizados electroquimicamente e morfologicamente. O eléctrodo WO_3/PVP (EHexP1) apresentou valores de resistência menores, para além de as nP's WO_3 com PVP terem revelado uma maior aderência ao vidro com ITO do que as nP's WO_3 sozinhas.

As propriedades electroquímicas dos eléctrodos foram estudadas usando três substâncias redox diferentes: o ferricianeto de potássio, o ácido ferroceno carboxílico e a metilsulfato-5-fenazina. Nos dois primeiros casos o processo electroquímico ocorreu por difusão, no entanto, no caso da metilsulfato-5-fenazina pensa-se que esteja associado um processo de adsorção. Os eléctrodos demonstraram um melhor desempenho electroquímico na presença do ferricianeto de potássio, já que os VC's destes eléctrodos apresentam picos de oxidação e redução mais bem definidos do que na presença de outras espécies electroactivas. O eléctrodo que electroquimicamente proporcionou melhores resultados, aquando o uso de ferricianeto de potássio, foi o eléctrodo EHexP1. Este ultimo revelou uma maior área electroactiva face aos outros eléctrodos, bem como um valor de I_c/I_a perto de 1, ou seja, apresentou uma maior reversibilidade.

O comportamento dos eléctrodos com nP's hexagonais com e sem PVP, enquanto interface electroquímica, foi estudado na presença da hemoglobina e do NADH. No caso da hemoglobina, os eléctrodos não proporcionaram nenhum tipo de resposta electroquímica, podendo ser explicado pela estrutura e orientação da proteína no eléctrodo. No caso do NADH apenas se obteve um pico de oxidação a cerca de 1 V, já que o eléctrodo não foi capaz de regenerar o NADH.

O estudo dos eléctrodos modificados com a proteína de citocromo *c*, demonstra que a presença de WO_3 é essencial para que a transferência electrónica ocorra. O eléctrodo com um melhor desempenho foi o EHexP1 e por isso foi escolhido para a adsorção do citocromo *c*, formando assim o sensor para a detecção do H_2O_2 . A resposta á detecção do H_2O_2 pelo sensor ITO/ WO_3 /Citocromo *c* revelou não ser específica do citocromo *c*, já que o eléctrodo EHexP1, sem proteína, respondeu á adição do H_2O_2 . A curva da corrente catalítica em função da concentração de H_2O_2 , do sensor no qual o citocromo *c* foi adsorvido sem triton-X100, revelou um comportamento típico da equação de *Michaelis-Menten*. Apesar de este sensor revelar uma ligeira melhoria em relação ao sensor, no qual o citocromo *c* foi adsorvido com triton X-100, ambos os sensores apresentam baixos valores de sensibilidade e limites de detecção do H_2O_2 elevados. Para além disso determinou-se que o sensor responde na detecção de H_2O_2 numa amostra real e que o nitrito não interfere na detecção do H_2O_2 .

Estes sensores ainda têm vários problemas para resolver, tais como os elevados limites de detecção e as baixas sensibilidades. No futuro ainda se pode experimentar a substituição das nP's WO_3 hexagonais pelas ortorrômbricas hidratadas, já que estas foram referidas como proporcionando reacções redox mais rápidas e reversíveis. A substituição do vidro com ITO por um substrato flexível biocompatível iria trazer uma grande vantagem a este tipo de sensores, visto que na prática estes sensores poderiam ser aplicados na detecção do H_2O_2 em células vivas.

7. Referências Bibliográficas

- [1] E. van der Spoel *et al.*, *Association analysis of insulin-like growth factor-1 axis parameters with survival and functional status in nonagenarians of the Leiden Longevity Study*, vol. 7, no. 11. 2015.
- [2] C. C. . Kock, I. A. . Ovid'ko, S. Seal, and S. Veprek, *Strutural Nanocrystalline Materials, Fundamentals and Applications*, vol. 1. 2015.
- [3] L. Santos *et al.*, "Electrodeposition of WO₃ Nanoparticles for Sensing Applications," *Electroplat. Nanostructures*, pp. 1–22, 2015.
- [4] H. Zheng, J. Z. Ou, M. S. Strano, R. B. Kaner, and A. Mitchell, "Nanostructured Tungsten Oxide – Properties , Synthesis , and Applications," pp. 2175–2196, 2011.
- [5] K. Bange and T. Gambke, "Electrochromic materials for optical switching devices," vol. 2, no. 1. 1990.
- [6] S. Balaji, Y. Djaoued, A.-S. Albert, R. Z. Ferguson, and R. Bruning, "Hexagonal tungsten oxide based electrochromic devices: Spectroscopic evidence for the Li ion occupancy of four-coordinated square windows," *Chem. Mater.*, vol. 21, no. 7, pp. 1381–1389, 2009.
- [7] B. Desbat and J. C. Lassegues, "Infrared and Raman Study of W₀₃ Tungsten xHzO Tungsten Trioxide Hydrates Trioxides and W₀₃," *J. Solid State Chem.*, vol. 247, no. 2, pp. 235–247, 1987.
- [8] L. S. L. Santos, "Engineering of Metal Oxide Nanoparticles for Application in Electrochemical Devices", Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, 2015, Tese de Douturamento, p.153.
- [9] J. H. Ha, P. Muralidharan, and D. K. Kim, "Hydrothermal synthesis and characterization of self-assembled h-WO₃ nanowires/nanorods using EDTA salts," *J. Alloys Compd.*, vol. 475, no. 1–2, pp. 446–451, 2009.
- [10] S. Komarneni and H. Katsuki, "Nanophase materials by a novel microwavehydrothermal process," *Pure Appl. Chem*, vol. 74, no. 9, pp. 1537–1543, 2002.
- [11] S. Rajagopal, D. Nataraj, D. Mangalaraj, Y. Djaoued, J. Robichaud, and O. Y. Khyzhun, "Controlled growth of WO₃ nanostructures with three different morphologies and their structural, optical, and photodecomposition studies," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 4, no. 11, pp. 1335–1342, 2009.
- [12] S. S. Kalanur, Y. J. Hwang, S. Y. Chae, and O. S. Joo, "Facile growth of aligned WO₃ nanorods on FTO substrate for enhanced photoanodic water oxidation activity," *J. Mater. Chem. A*, vol. 1, no. 10, p. 3479, 2013.
- [13] D. Vernardou, H. Drosos, E. Spanakis, E. Koudoumas, C. Savvakis, and N. Katsarakis, "Electrochemical and photocatalytic properties of WO₃ coatings grown at low temperatures," *J. Mater. Chem.*, vol. 21, no. 2, pp. 513–517, 2011.
- [14] S.-J. Yuan *et al.*, "A photometric high-throughput method for identification of electrochemically active bacteria using a WO₃ nanocluster probe.," *Sci. Rep.*, vol. 3, p. 1315, 2013.
- [15] L. Santos; J.P. Neto; A. Crespo; D. Nunes; N. Costa; I.M. Fonseca; P. Barquinha; L. Pereira; J. Silva; R. Martins; E. Fortunato, "WO₃ nanoparticle-based conformable pH sensor," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, no. 15, pp. 12226–12234, 2014.
- [16] X. Han, X. Han, L. Li, and C. Wang, "Controlling the morphologies of WO₃ particles and tuning the gas sensing properties," *New J. Chem.*, vol. 36, no. 11, p. 2205, 2012.
- [17] L. Santos; C.M. Silveira; E. Elangovan; J.P. Neto; D. Nunes; L. Pereira; R. Martins; J. Veigas; J.J.G. Moura; S. Todorovic; M.G. Almeida; E. Fortunato, "Synthesis of WO₃ nanoparticles for biosensing applications," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 223, pp. 186–194, 2016.
- [18] Z. Deng, Y. Gong, Y. Luo, and Y. Tian, "WO₃ nanostructures facilitate electron transfer of enzyme: Application to detection of H₂O₂ with high selectivity," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 8, pp. 2465–2469, 2009.
- [19] R. M. D. E. Lorimier *et al.*, "Construction of a fluorescent biosensor family," pp. 2655–2675, 2002.
- [20] J. M. Walker and R. Rapley, *Molecular Biology and Biotechnology*, 5th Edition, UK,

- ISBN:978-0-85404-125-1, p.624, 2009.
- [21] J. S. Marvin, H. W. Hellinga, N. Carolina, and R. V August, "Engineering Biosensors by Introducing Fluorescent Allosteric Signal Transducers : Construction of a Novel Glucose Sensor," vol. 7863, no. 20, pp. 5017–5021, 1998.
- [22] "<http://redeglobo.globo.com/globouniversidade/noticia/2011/12/saiba-o-que-sao-os-biossensores.html>."
- [23] L. Gorton, A. Lindgren, T. Larsson, F. D. Munteanu, T. Ruzgas, and I. Gazaryan, "Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors," *Anal. Chim. Acta*, vol. 400, no. 1–3, pp. 91–108, 1999.
- [24] "https://www.researchgate.net/figure/236196556_fig2_The-evolution-from-1st-to-3rd-generation-electrochemical-biosensors-The-figure/html."
- [25] A. L. Ghindilis, P. Atanasov, and E. Wilkins, "Enzyme-Catalyzed Direct Electron Transfer: Fundamentals and Analytical Applications," 1997.
- [26] J. Berg, J. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemistry*, 5^a. W. H. FREEMAN AND Company, 2002.
- [27] "Oncologist Learning Objective Fundamentals of Cancer Medicine," pp. 226–227, 2004.
- [28] H.-Z. Zhao, Q. Du, Z.-S. Li, and Q.-Z. Yang, "Mechanisms for the Direct Electron Transfer of Cytochrome c Induced by Multi-Walled Carbon Nanotubes," *Sensors*, vol. 12, no. 8, pp. 10450–10462, 2012.
- [29] R. Schweitzer-stenner, "Cytochrome c : A Multifunctional Protein Combining Conformational Rigidity with Flexibility," vol. 2014, 2014.
- [30] J. Liu *et al.*, "Metalloproteins Containing Cytochrome , Iron – Sulfur , or Copper Redox Centers," 2015.
- [31] "<http://www.rcsb.org/pdb/results/results.do?qrid=D0D42879&tabtoshow=Current/html>."
- [32] O. H. Liang-Hong Guo, H. Allen, "Direct Electrochemistry of Proteins and Enzymes," *Adv. Inorg. Chem.*, vol. 36, pp. 341–375, 1991.
- [33] F. Armstrong, *Structure and Bonding*. Springer, ISBN: 978-3-642-21180-5, 1990.
- [34] B. C. Larisch and S. J. B. Duff, "Effect of H₂O₂ and DTPA on the characteristics and treatment of TCF (totally chlorine-free) and ECF (elementally chlorine-free) kraft pulping effluents," *Water Sci. Technol.*, vol. 35, no. 2–3, pp. 163–171, 1997.
- [35] E. Nagababu and J. M. Rifkind, "Reaction of Hydrogen Peroxide with Ferrylhemoglobin : Superoxide Production and Heme Degradation," no. Iii, pp. 12503–12511, 2000.
- [36] J. M. Cheeseman, "Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions," *J. Exp. Bot.*, vol. 57, no. 10, pp. 2435–2444, 2006.
- [37] F. Miyamoto, M. Saeki, and T. Yoshizawa, "Improved protocol for an oxygen electrode method for determining hydrogen peroxide in foods," *J. AOAC Int.*, vol. 80, no. 3, pp. 681–687, 1997.
- [38] L. Madsen and I. Dalsgaard, "Effect of Hydrogen Peroxide on Immersion Challenge of Rainbow Trout Fry with *Flavobacterium psychrophilum*," vol. 8, no. 4, pp. 4–10, 2013.
- [39] L. Campanella, R. Roversi, M. P. Sammartino, and M. Tomassetti, "Hydrogen peroxide determination in pharmaceutical formulations and cosmetics using a new catalase biosensor," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 18, no. 1–2, pp. 105–116, 1998.
- [40] "<http://www.puroxi.com/about/hydrogen-peroxide/html>."
- [41] M. B. Everse, J.; Everse, K. E.; Grisham, *Peroxidases in Chemistry and Biology*. 1991.
- [42] R. G. Zepp, B. C. Faust, and J. Holgne, "Hydroxyl Radical Formation in Aqueous Reactions (pH 3-8) of Iron(II) with Hydrogen Peroxide: The Photo-Fenton Reaction," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 26, no. 2, pp. 313–319, 1992.
- [43] D. Price, P. J. Worsfold, and R. F. C. Mantoura, "Hydrogen peroxide in the marine environment: cycling and methods of analysis," *Trends Anal. Chem.*, vol. 11, no. 10, pp. 379–384, 1992.
- [44] R. M. Pen and H. Lucas, "Measurements and analysis of hydrogen peroxide rainwater levels in a Northwest region of Spain," vol. 35, 2001.
- [45] E. C. Division, "Improved Nonenzymatic Method for the Determination of Gas-Phase Peroxides," vol. 28, no. 6, pp. 0–5, 1994.
- [46] W. J. Cooper, R. Zlka, R. G. Petasne, and J. M. C. Plane, "Photochemical Formation of H₂O₂

- in Natural Waters Exposed to Sunlight,” vol. 22, no. 10, 1988.
- [47] I. L. De Mattos *et al.*, “PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO: IMPORTÂNCIA E DETERMINAÇÃO,” vol. 26, no. 3, pp. 373–380, 2003.
- [48] B. Norouzi, M. Moradian, and A. Malekan, “An Efficient Amperometric Sensor for Hydrogen Peroxide by Using a Carbon Paste Electrode Modified with Cobalt Impregnated Zeolite,” *Port. Electrochim. Acta*, vol. 33, no. 2, pp. 111–124, 2015.
- [49] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications*. 1944.
- [50] M. F. Silva, “Voltametria Cíclica — Aplicações ao Estudo de Mecanismos de Reações Induzidas por Transferência Electronica,” *QUÍMICA*, vol. 70, pp. 20–26, 1998.
- [51] J. Wang, *Analytical Electrochemistry, Third Edition*, Canada, Wiley - VCH, ISBN: 100-471-67879-1, 2006.
- [52] J. Melorose, R. Perroy, and S. Careas, *Handbook of Electrochemistry*, vol. 1. 2015.
- [53] J. Silverstein and J. F. Kennedy, *Instrumental Methods in Chemistry*, no. March. 2007.
- [54] P. Rieger, *Electrochemistry*. 1994.
- [55] A.C. Marques, L. Santos, M.N. Costa, J.M. Dantas, P. Duarte, A. Gonçalves, R. Martins, C.A. Salgueiro, E. Fortunato, “Office Paper Platform for Bioelectrochromic Detection of Electrochemically Active Bacteria using Tungsten Trioxide Nanoprobes” vol. 3, pp. 1–7.
- [56] K. Huang, Q. Pan, F. Yang, S. Ni, and X. Wei, “Controllable synthesis of hexagonal WO₃ nanostructures and their application in,” *J. Phys. DAppl. Phys.*, vol. 155417, p. 41, 2008.
- [57] Z. Gu *et al.*, “Large-scale synthesis of single-crystal hexagonal tungsten trioxide nanowires and electrochemical lithium intercalation into the nanocrystals,” *J. Solid State Chem.*, vol. 180, no. 1, pp. 98–105, 2007.
- [58] J. Shi, G. Hu, R. Cong, H. Bu, and N. Dai, “Controllable synthesis of WO₃.nH₂O microcrystals with various morphologies by a facile inorganic route and their photocatalytic activities,” *RSC Publishing*, vol. 37, pp. 1538–1544, 2013.
- [59] A. Phuruangrat, J. Ham, J. Hong, and J. Sung, “Synthesis of hexagonal WO₃ nanowires by microwave-assisted hydrothermal method and their electrocatalytic activities for hydrogen evolution reaction,” *J. Mater. Chem.*, vol. 20, pp. 1683–1690, 2010.
- [60] S. Pokhrel *et al.*, “In situ high temperature X-ray diffraction, transmission electron microscopy and theoretical modeling for the formation of WO₃ crystallites,” *CrystEngComm*, vol. 17, no. 36, pp. 6985–6998, 2015.
- [61] L. Santos *et al.*, “Structure and morphologic influence of WO₃ nanoparticles on the electrochromic performance of dual-phase a-WO₃/WO₃ inkjet printed films,” *Adv. Electron. Mater.*, vol. 1 (1-2), 2015.
- [62] Z. Lu, M. Kanan, and C. P. Tripp, “Synthesis of high surface area monoclinic WO₃ particles using organic ligands and emulsion based methods,” pp. 983–989, 2002.
- [63] M. Deepa, N. Sharma, P. Varshney, S. P. Varma, and S. A. Agnihotry, “FTIR investigations of solid precursor materials for sol-gel deposition of WO₃ based electrochromic films,” *J. Mater. Sci.*, vol. 35, no. 21, pp. 5313–5318, 2000.
- [64] G. F. Cai, J. P. Tu, D. Zhou, X. L. Wang, and C. D. Gu, “Solar Energy Materials & Solar Cells Growth of vertically aligned hierarchical WO₃ nano-architecture arrays on transparent conducting substrates with outstanding electrochromic performance,” vol. 124, pp. 103–110, 2014.
- [65] M. Anik and T. Cansizoglu, “Dissolution kinetics of WO₃ in acidic solutions,” *J. Appl. Electrochem.*, vol. 36, pp. 603–608, 2006.
- [66] A. A. Tanaka, T. A. F. Lassali, J. R. dos S. Jr., M. C. R. C. Otani, and H. A. Polidoro, “Electrochemical activities of glassy carbons produced by thermal degradation of polyfurfuryl alcohol resin,” *Chem. Soc.*, pp. 37–41, 1991.
- [67] R. S. Nicholson and I. Shain, “Stationary Electrode Polarography,” *Anal. Chem.*
- [68] S. J. Konopka and B. McDuffie, “Diffusion coefficients of ferri- and ferrocyanide ions in aqueous media, using twin-electrode thin-layer electrochemistry,” *Anal. Chem.*, vol. 42, no. 14, pp. 1741–1746, 1970.
- [69] X. Xu, J. Zhao, D. Jiang, and J. Kong, “TiO₂ sol-gel derived amperometric biosensor for H₂O₂ on the electropolymerized phenazine methosulfate modified electrode,” pp. 1261–1266,

- 2002.
- [70] T. Matsue, D. Evans, T. Osa, and N. Kobayashi, "Electron-Transfer Reactions Associated with Host-Guest Complexation. Oxidation of Ferrocenecarboxylic Acid in the Presence of beta-Cyclodextrin," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 107, no. 4, pp. 3411–3417, 1985.
- [71] T. Matsue, D. H. Evans, T. Osa, and N. Kobayashi, "Electron-transfer reactions associated with host-guest complexation. Oxidation of ferrocenecarboxylic acid in the presence of .beta.-cyclodextrin," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 107, no. 12, pp. 3411–3417, 1985.
- [72] P. N. Bartlett and K. F. E. Pratt, "A Study of the Kinetics of the Reaction between Ferrocene Monocarboxylic Acid and Glucose-Oxidase Using the Rotating-Disc Electrode," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 397, no. 1–2, pp. 53–60, 1995.
- [73] N. A. M. Said, K. Twomey, V. I. Ogurtsov, D. W. M. Arrigan, and G. Herzog, "Fabrication and Electrochemical Characterization of Micro- and Nanoelectrode Arrays for Sensor Applications," *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 307, no. 1, p. 12052, 2011.
- [74] C. E. Banks and R. G. Compton, "Exploring the electrocatalytic sites of carbon nanotubes for NADH detection: an edge plane pyrolytic graphite electrode study," *Analyst*, vol. 130, no. 9, p. 1232, 2005.
- [75] J.-Y. Sun, K.-J. Huang, S.-F. Zhao, Y. Fan, and Z.-W. Wu, "Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin on chitosan-room temperature ionic liquid-TiO₂-graphene nanocomposite film modified electrode," *Bioelectrochemistry*, vol. 82, no. 2, pp. 125–130, 2011.
- [76] W. Wen *et al.*, "Sensors and Actuators B : Chemical A highly sensitive nitric oxide biosensor based on hemoglobin – chitosan / graphene – hexadecyltrimethylammonium bromide nanomatrix," *Sensors Actuators B. Chem.*, vol. 166–167, pp. 444–450, 2012.
- [77] M. Collinson and E. F. Bowden, "UV-visible spectroscopy of adsorbed cytochrome c on tin oxide electrodes," *Anal. Chem.*, vol. 64, no. 13, pp. 1470–1476, 1992.
- [78] R. A. Clark; and E. F. Bowden, "Voltammetric Peak Broadening for Cytochrome c/Alkanethiolate Monolayer Structures: Dispersion of Formal Potentials," *ACS Publ.*, vol. 13, no. 3, pp. 559–565, 1997.
- [79] A. El Kasmi *et al.*, "Adsorptive immobilization of cytochrome c on indium/tin oxide (ITO): Electrochemical evidence for electron transfer-induced conformational changes," *Electrochem. commun.*, vol. 4, no. 2, pp. 177–181, 2002.
- [80] N. K. Bhatti, M. S. Subhani, A. Y. Khan, R. Qureshi, and A. Rahman, "Heterogeneous electron transfer rate constants of viologen at a platinum disk electrode," *Turkish J. Chem.*, vol. 29, no. 6, pp. 659–668, 2005.
- [81] R. S. Nicholson, "Some Examples of the Numerical Solution of Nonlinear Integral Equations," *Anal. Chem.*, vol. 37, no. 6, pp. 667–671, 1965.

Anexos

A – Difractograma padrão do WO_3 com a estrutura cristalina monoclinica.

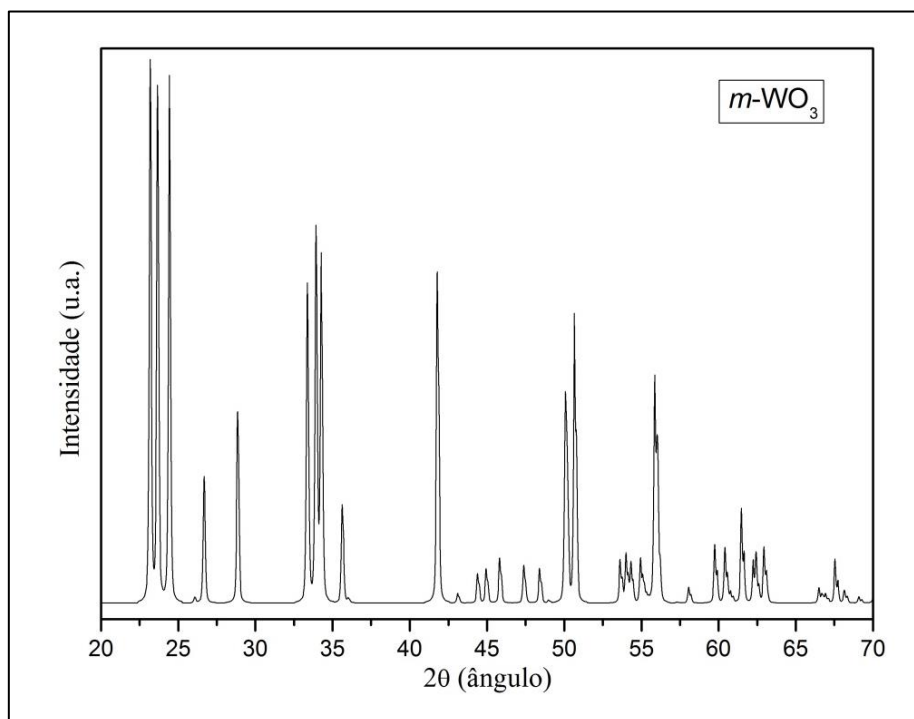


Figura 0.1. Difractograma padrão do WO_3 com a estrutura cristalina monoclinica

B- Espectros de Raman das nP's nP-Na₂SO₄-P75_t120.

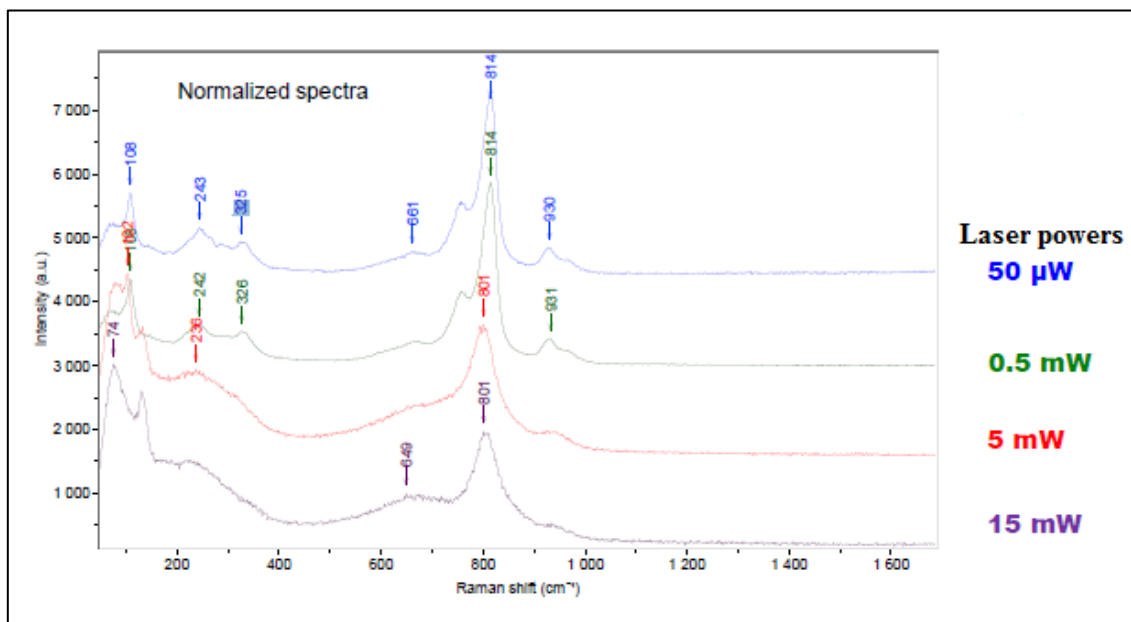


Figura 0.2. Espectros de Raman das nP's nP-Na₂SO₄-P75_t120 com diferentes poderes de laser: a roxo 15 mW, a vermelho 5 mW, a verde 0,5 mW e a azul 50μW.

C- Modelo de um circuito electrónico equivalente usado no cálculo da resistência do OIE e dos eléctrodos.

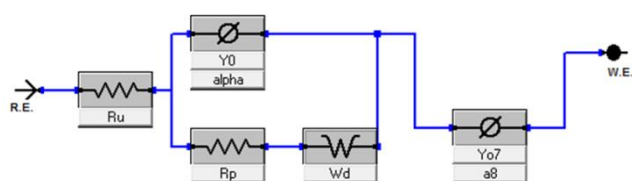


Figura 0.3. Modelo do circuito electrónico equivalente constituído por uma resistência ohmica da solução do electrólito R_u , a resistência á transferência de electrões R_p , dois elementos constantes de fase (Y_0 e Y_{o7}) e a impedância de Warburg W_d .

D- Parâmetros calculados para os eléctrodos com o polímero PEDOT/PSS.

Tabela 0.1. Parâmetros calculados para os eléctrodos com o polímero Pedot/PSS.

Temp. de recozimento (°C)	Tempo de recozimento (h)	Nº de camadas	Proporção de nP's/ polímero	Ic/Ia	ΔE_p (mV)	E° (mV)	A _e (cm ²)
350	1	1	3:1	0,87	242	249	0.58
	12			0,84	299	249	0,54
	12	3		0,92	286	249	0,51
	1	1	1:3	0,96	197	252	0.66
	12			0,78	300	266	0.51
	12	3		0,89	264	247	0,58
200	1	1	1:1	0,99	98	256	0,70
	12			1,04	120	255	0,73
	1		3:1	0,98	105	256	0,68
	12			0,97	121	257	0,68
	1		1:3	1.01	108	256	0,68
	12			0,97	151	253	0,65
	12	3		0,90	182	248	0,65
	80	1	1	3:1	1,02	125	255
12			0,95		112	255	0,70
1			1:3	0,97	113	256	0.69
12				1,00	107	255	0,72
12		3		0,99	115	254	0,74

E- Monitorização dos compostos por espectrofotometria de UV-Vis.

E.1. Monitorização da estabilidade do NADH

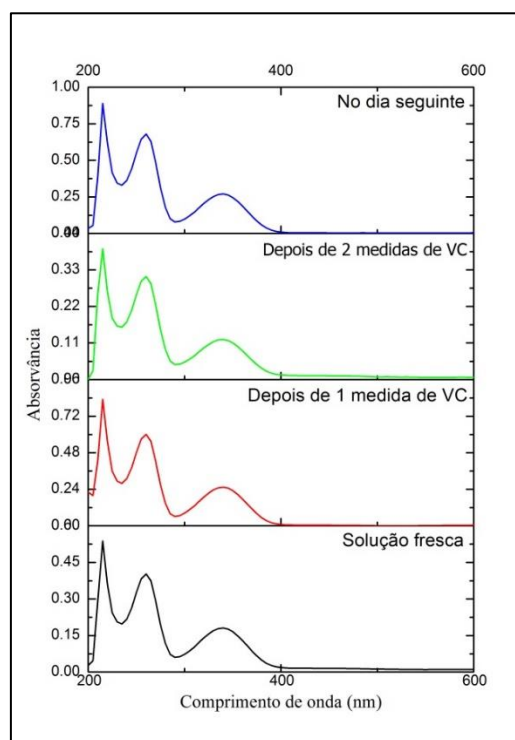


Figura 0.4. Monitorização da estabilidade do NADH ao longo das medidas de voltametria cíclica e no dia seguinte.

E.2. Monitorização da estabilidade da hemoglobina

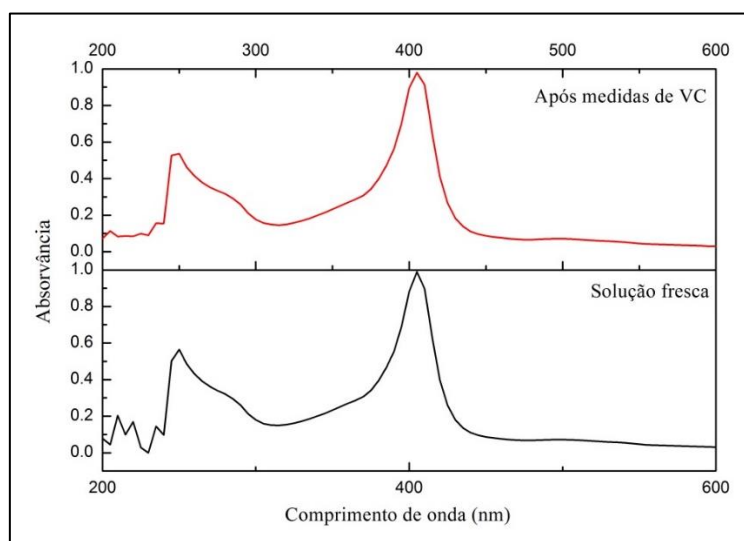


Figura 0.5. Monitorização da estabilidade da hemoglobina através de espectrofotometria de UV-Vis antes e depois de medidas de voltametria cíclica

E.3. Monitorização da estabilidade do citocromo *c*

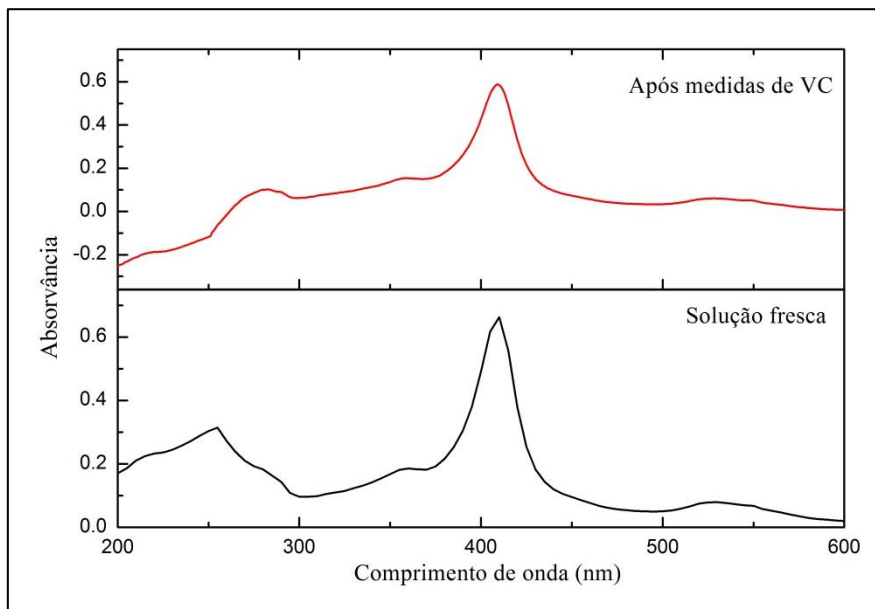


Figura 0.6. Monitorização da integridade da solução de citocromo *c* depois das medidas de voltametria cíclica.

F- Voltametria cíclica nos substratos flexíveis

F.1. Voltamogramas cíclicos da hemoglobina nos substratos flexíveis.

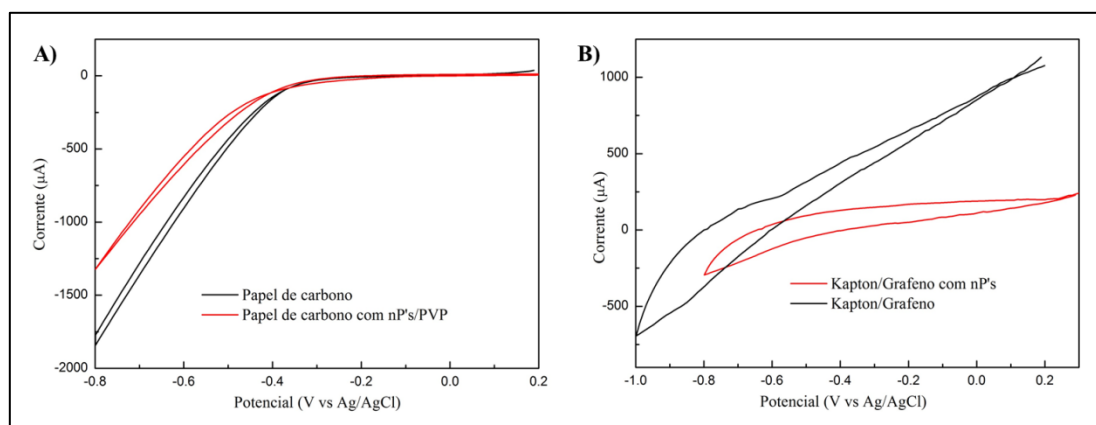


Figura 0.7. Voltamogramas cíclicos duma solução de hemoglobina a 4.0 mg/ml em tampão 0,1 M fosfato, pH 6,1, nos eléctrodos construídos com substratos flexíveis a uma velocidade de varrimento igual a

20 mV/s. A) Comparação do papel de carbono sem nP's (preto) e com nP's de WO_3 (vermelho). B) Comparação do Kapton com grafeno sem nP's de WO_3 (preto) e com nP's de WO_3 (vermelho).

F.2. Voltamogramas cíclicos do citocromo *c* nos substratos flexíveis

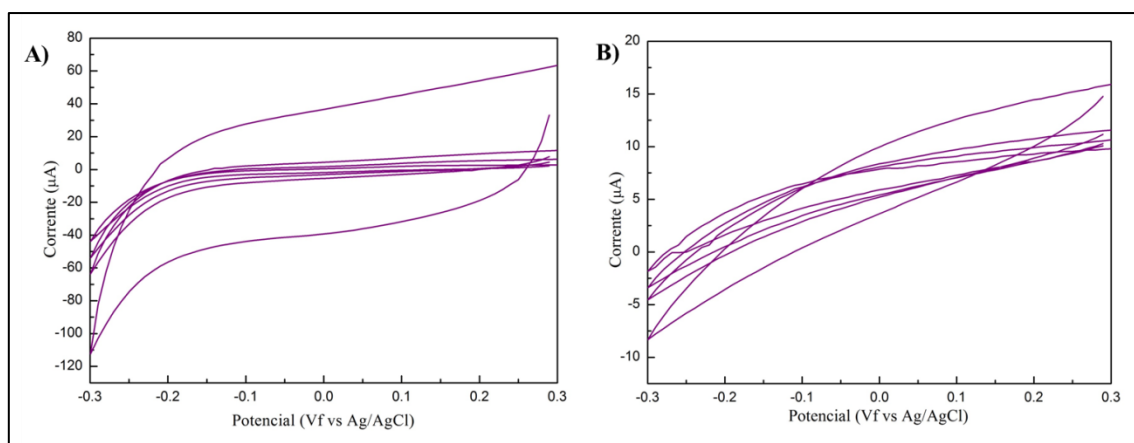


Figura 0.8. Voltamogramas cíclicos de 0,2 mM de citocromo *c* em tampão 0,05 M tris-HCl, pH 7,6, nos eléctrodos construídos com substratos flexíveis. Numa gama de velocidades de varrimento de 10-750 mV/s. A) Papel de *screen printing* com IZO. B) Papel de *screen printing* com ouro.