UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIA DE EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS

HANNA NÓBREGA ALMEIDA

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS FLUORESCENTES DE PANI/COBRE

Recife
2019

HANNA NÓBREGA ALMEIDA

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS FLUORESCENTES DE PANI/COBRE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Materiais.

Área de concentração: materiais não-metálicos

Orientador: Prof. Dr. Celso Pinto de Melo

Recife

2019

Catalogação na fonte
Bibliotecária Mariana de Souza Alves CRB4-2106

A447s Almeida, Hanna Nóbrega
Síntese e caracterização de compósitos fluorescentes de PANI/ COBRE – 2019.
116 f.: il., fig., tab.

Orientador: Celso Pinto de Melo
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Ciência de Materiais. Recife, 2019.
Inclui referências e anexos.

1. Materiais não-metálicos. 2. Fluorescência. 3. Nanocompósitos. 4. PANI/Cu. I. Melo, Celso Pinto de (orientador). II. Título.

540 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2019-73

HANNA NÓBREGA ALMEIDA

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO
DE COMPÓSITOS FLUORESCENTES DE PANI/COBRE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Materiais.

Aprovada em: 01/08/2019.

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. Celso Pinto de Melo (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Profª. Drª. Rosa Maria Souto Maior (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Prof. Dr. Antônio Azevedo da Costa (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Gostaria de primeiramente agradecer a minha mãe que sempre me apoia em todas as minhas aventuras e que confia em mim, me colocando em todos os seus pensamentos. Ao meu pai que sempre preza pelo meu sucesso e mesmo sem dizer muito está na minha torcida. A minha Tia Viviane que me acolheu em Recife e permitiu que meu sonho acontecesse. Obrigada por cuidar de mim e me apoiar em minhas decisões.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Celso P. de Melo, que com muita paciência conseguiu me compreender e sempre foi muito solícito desde minha chegada a Recife. Por sempre ajudar a solucionar os problemas e fazer enxergar novas perspectivas e ideias.

Aos meus melhores amigos Andrey, Vanessa e Elton que fazem minha vida mais leve e feliz, sempre me fazendo ser uma pessoa melhor. Aos novos amigos (Angelina, Renato, Aline, Maurício) que tornaram Recife um lugar próspero e um verdadeiro lar.

Ao meu namorado, Ruan, que sempre me encoraja, sendo meu ponto de apoio e parte da minha família aqui em Recife. Obrigada pelas broncas, pelas palavras de afeto e me ajudar a não desistir dos meus sonhos. Sempre me fazendo ver que preciso ser forte e confiante, acreditar no meu potencial e depender de ninguém além de mim.

Aos meus amigos do Laboratório (Gabriela, Elton e Maurício), por gastar o tempo deles para me ensinar, me apoiar e não deixar o “mundo cair”. Sem vocês não teria conseguido. Além de todos os outros colegas do Laboratório de Polímeros Não-Convencionais (PNC): Andressa, Bruna, Carol, Rubênia, Graciela, Filipe, Kamila, Hérica, Jéssica, Romário.

À FACEPE e ao CNPq pela concessão da bolsa e apoio financeiro que foram essenciais para esse trabalho.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, por compartilharem todo conhecimento e experiência para minha formação.

RESUMO

As propriedades de materiais fluorescentes são de grande interesse na biomedicina, principalmente para o desenvolvimento de marcadores e sensores biológicos. Para isso, os nanocompósitos de PANI/Cu se destacam por exibirem propriedades fluorescentes notáveis na região visível, com um rendimento quântico típico da ordem de 9%. Neste trabalho os compósitos de PANI/Cu são sintetizados em uma única etapa com o uso de um agente oxidante fraco ($CuSO_4$) e formação simultânea do polímero e de partículas metálicas. A combinação das propriedades do polímero e metal, por sinergia, criam propriedades únicas ao material, as quais podem ser controladas. Através da variação de alguns parâmetros de preparação (pH e concentração de reagentes), é possível controlar simultaneamente o comprimento de onda correspondente à intensidade máxima de fluorescência e as propriedades elétricas dos nanocompósitos. Para isso, foi realizado um planejamento fatorial objetivando a otimização da síntese do compósito híbrido e a obtenção de uma resposta ótima de fluorescência. A fluorescência foi investigada através da Espectroscopia de Fluorescência, do cálculo de rendimento quântico relativo (8,8 %) e do tempo de vida de fluorescência (2,62 ns). Para um melhor entendimento do compósito foram investigadas suas características elétricas, espectroscópicas e estruturais, através de técnicas de UV-Vis, FTIR, DLS, Espectroscopia Eletroquímica de Impedância, Potencial Zeta e MET. Finalmente, para avaliar a biocompatibilidade, foram realizados ensaios preliminares de citotoxicidade do compósito frente a diferentes tipos de células de mamíferos, sendo possível verificar que a partir de certa concentração de PANI/Cu existem diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) entre o grupo tratado e o grupo controle. Para as células de macrófagos a CC_{50} foi de 353,4 µg/mL, enquanto que para as células Vero obteve-se uma CC_{50} de 324,5 µg/mL, resultados que levam a uma aplicação biológica mais segura.

Palavras-chave: Fluorescência. Nanocompósitos. PANI/Cu. Citotoxicidade.

ABSTRACT

The properties of fluorescent materials are of great interest in biomedicine, mainly for the development of biomarkers and biological sensors. For this, PANI/Cu nanocomposites are notable for exhibiting remarkable fluorescence properties in the visible region, with a typical quantum yield of the order of 9%. In this work, PANI/Cu composites were synthesized in a single step with the use of a weak oxidizing agent ($CuSO_4$) and simultaneous formation of the polymer and metal particles. Synergy of polymer and metal properties can create properties that are unique to the material, which can be controlled. By varying some preparation parameters (pH and reagent concentration), it is possible to simultaneously control the wavelength corresponding to the maximum fluorescence intensity and the electrical properties of the nanocomposites. For this, we performed a factorial planning aiming the optimization of hybrid composite synthesis and obtaining an optimum fluorescence response. We investigated fluorescence using fluorescence spectroscopy, relative quantum yield (8.8%) and fluorescence life (2.62 ns). For a better understanding of the composite, its electrical, spectroscopic and structural characteristics were analyzed through UV-Vis, FTIR, DLS, Electrochemical Impedance Spectroscopy, Zeta Potential and MET. Finally, to evaluate the biocompatibility, we tested the cytotoxicity of the composite against different types of mammalian cells. It was possible to verify that starting from a given concentration of the composite there are statistically significant differences ($p < 0.05$) between the treated group and the control group. For the cells of macrophages the CC_{50} was 353.4 µg / mL, whereas for the Vero cells a CC_{50} of 324.5 µg / mL was obtained, results that lead to a safer biological application.

Keywords: Fluorescence. Nanocomposites. PANI/Cu. Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- REPRESENTAÇÃO DOS ESTADOS FUNDAMENTAL, EXCITADO SINGLETO E EXCITADO TRIPLETO. 20

FIGURA 2- DIAGRAMA DE JABLONSKI MODIFICADO. (1) ABSORÇÃO DE UM FÓTON, (S_0) ESTADO FUNDAMENTAL, (S_N) ESTADO EXCITADO SINGLETO, (S_1) PRIMEIRO ESTADO EXCITADO SINGLETO, (2) RELAXAMENTO VIBRACIONAL (RV), (3) CRUZAMENTO INTERNO (CI), (4) CRUZAMENTO INTERSISTEMAS (CIS), (T_N) ESTADO EXCITADO TRIPLETO, (5) TRANSIÇÃO RADIATIVA E (6) TRANSIÇÃO NÃO RADIATIVA. 21

FIGURA 3- ESTRUTURA DA PANI NA FORMA DE BASE NÃO DOPADA, ONDE $0 \leq y \leq 1$. 29

FIGURA 4- DIFERENTES ESTADOS REDOX DA POLIANILINA DE ACORDO COM DIFERENTES PH. 30

FIGURA 5- REPRESENTAÇÃO DA DOPAGEM COM ÁCIDO PROTÔNICO DA POLIANILINA NA FORMA DE BASE ESMERALDINA. EM (A) A CADEIA ANTES DA PROTONAÇÃO; DE (B) A (D) DEPOIS DE 50 % DE PROTONAÇÃO COM: (B) FORMAÇÃO DE BIPÓLARONS, (C) FORMAÇÃO DE PÓLARONS E (D) SEPARAÇÃO DOS PÓLARONS RESULTANDO NA REDE POLARÔNICA. 32

FIGURA 6 - ESQUEMA DA POLIMERIZAÇÃO OXIDATIVA DA POLIANILINA. 35

FIGURA 7- ESPECTROS DE UV-VIS DA PANI NA FORMA DE BASE ESMERALDINA À MEDIDA QUE PEQUENAS QUANTIDADES DE AGENTE REDUTOR SÃO ADICIONADAS. EB REPRESENTA A BASE ESMERALDINA PURA E $R_1 - R_4$ SÃO AS MUDANÇAS DE ABSORBÂNCIA DEVIDO A ADIÇÃO EM ETAPAS DE PEQUENAS QUANTIDADES DE REDUTOR. 37

FIGURA 8- ESPECTRO DE UV-VIS DOS DIFERENTES ESTADOS OXIDATIVOS DA PANI. 38

FIGURA 9- MECANISMO GERAL DE SÍNTESE DO COMPÓSITO PANI/CUNPS. 39

FIGURA 10- MECANISMO DE SÍNTESE DO COMPÓSITO PANI/CUNPS EM MEIO DE ALTA ACIDEZ. 39

FIGURA 11- MECANISMO DE SÍNTESE DO COMPÓSITO PANI/CUNPS EM MEIO DE MÉDIA E BAIXA ACIDEZ. 39

FIGURA 12 - ADIÇÃO DO AGENTE ESTABILIZANTE, MPTS, A SÍNTESE DA PANI/CUNPS. 40

FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO DE INTERPRETAÇÃO GEOMÉTRICA DOS EFEITOS PARA UM PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^2. 44
FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO DE INTERPRETAÇÃO GEOMÉTRICA DOS EFEITOS PARA UM PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^3. 45
FIGURA 15 - PLANEJAMENTO FATORIAL DE DOIS NÍVEIS COM PONTO CENTRAL. 45
FIGURA 16 - ESQUEMA DE PREPARAÇÃO DO COMPÓSITO PANI/CU. 52
FIGURA 17 - ESPECTRO DE UV-VIS DO COMPÓSITO DE PANI/CU EM PH NEUTRO DA AMOSTRA A1 (- - -). 59
FIGURA 18 - ESPECTRO DE UV-VIS DO COMPÓSITO DE PANI/CU DA AMOSTRA A1 (- - -) EM PH < 2. 60
FIGURA 19- ESPECTRO DO FTIR DO COMPÓSITO PANI/CU NA REGIÃO DE 500 A 4000 CM^{-1} DAS AMOSTRAS (A) A8 (+++) E (B) A1 (- - -). 62
FIGURA 20- INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DO COMPÓSITO PANI/CU NAS FAIXAS DE EXCITAÇÃO ENTRE 290 A 400 NM PARA (A) AMOSTRA A1 (- - -) E (C) AMOSTRA A8 (+++), E ENTRE 340 A 400 NM PARA (B) AMOSTRA A1 (- - -) E (D) AMOSTRA A8 (+++). 63
FIGURA 21- INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DO COMPÓSITO PANI/AU NAS FAIXAS DE EXCITAÇÃO DE 290 A 400 NM EM (A) AMOSTRA (---) E (C) AMOSTRA (+++) E DE 340 A 400 NM EM (B)AMOSTRA (---) E (D) AMOSTRA (+++). 64
FIGURA 22- GRÁFICOS DE PARETO PARA A INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DOS COMPÓSITOS DE PANI/CU (A) DO PICO COM $\Lambda_{EMI} \approx 342$ NM (PICO 1) E (B) $\Lambda_{EMI} \approx 666$ NM (PICO 2) PARA UMA EXCITAÇÃO EM $\Lambda_{EXC} = 300$ NM. 67
FIGURA 23- GRÁFICO CÚBICO DAS RESPOSTAS DE INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA. (A) RESPOSTAS DO PICO COM $\Lambda_{EMI} \approx 342$ NM (PICO 1) E (B) $\Lambda_{EMI} \approx 666$ NM (PICO 2), PARA UMA EXCITAÇÃO EM $\Lambda_{EXC} = 300$ NM. 68
FIGURA 24- REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA NO $\Lambda_{EXC} = 350$ NM. (A) GRÁFICO DE PARETO E (B) GRÁFICO CÚBICO DAS RESPOSTAS DE INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA. 69
FIGURA 25- REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA O DIÂMETRO MÉDIO DAS PARTÍCULAS DO COMPÓSITO DE PANI/CU. (A) GRÁFICO DE PARETO E (B) GRÁFICO CÚBICO. 71
FIGURA 26- GRÁFICO DE PARETO E CÚBICO DOS COMPÓSITO PANI/AU PARA AS EXCITAÇÕES (A) NO $\Lambda = 300$ NM, 1º PICO; (B) $\Lambda = 300$ NM, 2º PICO; E (C) $\Lambda = 350$ NM. 72

FIGURA 27- INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DO COMPÓSITO PANI/CU NAS CONDIÇÕES DA AMOSTRA A7 (- + +) (A) Λ_{EXC} DE 290 A 400 NM (B) Λ_{EXC} DE 340 A 400 NM. 73
FIGURA 28- FOTO DA FLUORESCÊNCIA QUALITATIVA DO COMPÓSITO DE PANI/CU (A) SEM USO DE FILTRO NA REGIÃO DO UV, (B) ESQUEMA DO FILTRO UV USADO E (C) FLUORESCÊNCIA DO COMPÓSITO APÓS O USO DO FILTRO. 74
FIGURA 29- RESULTADO DE UV-VIS (A) E FLUORESCÊNCIA (B) DA AMOSTRA A7 DO COMPÓSITO PANI/CU PARA DIFERENTES VALORES DO PH DO MEIO. 74
FIGURA 30- VARIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE TRANSPORTE DE CARGA DA AMOSTRA A7 EM FUNÇÃO DO PH. 79
FIGURA 31- VARIAÇÃO DO POTENCIAL ZETA DA AMOSTRA A7 EM FUNÇÃO DO PH DO MEIO. 80
FIGURA 32- IMAGEM OBTIDAS POR MET DO COMPÓSITO PANI/CU (+ + -) EM DIFERENTES MAGNIFICAÇÕES. 84
FIGURA 33 - EFEITO DA PANI/CU AMOSTRA A7 (+ + -) SOBRE CÉLULAS DE MAMÍFEROS. (A) MACRÓFAGOS E (B) CÉLULAS VERO. 86
FIGURA 34- DIAGRAMA DA ORDEM DE GRANDEZA DA CONDUTIVIDADE DOS MATERIAIS. 108
FIGURA 35- REPRESENTAÇÃO DOS POLÍMEROS CONDUTORES MAIS ESTUDADOS ATUALMENTE. 109
FIGURA 36- A SUPERPOSIÇÃO ENTRE OS ORBITAIS Π E A SUPERPOSIÇÃO ENTRE OS ORBITAIS Π* DOS ÁTOMOS DE CARBONO RESULTAM EM UMA DISTRIBUIÇÃO DE ESTADOS ELETRÔNICOS QUE SE ASSEMELHA A UMA ESTRUTURA DE BANDAS. FORMAÇÃO DO HOMO E LUMO. 110
FIGURA 37- TRANS-POLIACETILENO, ESTRUTURAS A E B. 111
FIGURA 38- REPRESENTAÇÃO DO SÓLITON NA ESTRUTURA DO TRANS-POLIACETILENO. 112
FIGURA 39 - ESTRUTURA AROMÁTICA A ESQUERDA E A QUINÓIDE A DIREITA. 113
FIGURA 40 - REPRESENTAÇÃO DA OXIDAÇÃO DO POLIPIRROL E A FORMAÇÃO DE UM PÓLARON MOSTRANDO EM (A) SUA FORMA REDUZIDA E EM (B) SUA FORMA QUINÓIDE NO ESTADO PÓLARON. "A-" REPRESENTA O CONTRA-ÍON QUE EQUILIBRA AS CARGAS DURANTE A DOPAGEM. 114

FIGURA 41- MODELO DAS BANDAS DO POLÍMERO CONDUTOR, MOSTRANDO O SURGIMENTO DE BANDAS DE ENERGIA NO BAND GAP PARA O (A) PÓLARON E (B) BIPÓLARON. 114
FIGURA 42- DOPAGEM DO POLIPIRROL (A) E SURGIMENTO DOS ESTADOS DE PÓLARON (B) E BIPÓLARON (C). 115
FIGURA 43- SURGIMENTO DE BANDAS DE ENERGIA COM O AUMENTO DO GRAU DE DOPAGEM MUDANDO DE (A) ISOLANTE PARA (B) POUCO DOPADO ATÉ O SURGIMENTO DE BANDAS DE BIPÓLARON EM (C) E (D). 116

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - TIPOS DE LUMINESCÊNCIA DE ACORDO COM O MODO DE EXCITAÇÃO. ---------- 18
TABELA 2 - MATRIZ DE COEFICIENTE DE CONTRASTE PARA UM PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3. ---------- 43
TABELA 3 - FATORES E NÍVEIS UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA A SÍNTESE DO COMPÓSITO DE PANI/CUNPS.---------- 51
TABELA 4 - MATRIZ DE PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 PARA A SÍNTESE DO COMPÓSITO DE PANI/CUNPS.---------- 51
TABELA 5 - PLANEJAMENTO FATORIAL E INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DOS COMPÓSITOS DE COMPÓSITO PANI/CU EM Λ_{EXC} = 300 NM E Λ_{EXC} = 350 NM.---------- 66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCs	Polímeros condutores
PPi	Polipirrol
Cu	Cobre
Ag	Prata
HeLa	Células de câncer cervical humano
PANI	Polianilina
AuNPs	Nanopartículas de ouro
CuNPs	Nanopartículas de cobre
MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina]

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO ---------- 15

2 OBJETIVOS ---------- 17

2.1 OBJETIVO GERAL ---------- 17

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ---------- 17

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA ---------- 18

3.1 LUMINESCÊNCIA ---------- 18

3.1.1 Fatores que influenciam a fluorescência ---------- 23

3.1.2 Espectroscopia de fluorescência ---------- 26

3.1.3 Rendimento quântico e tempo de vida de fluorescência ---------- 27

3.2 POLIANILINA (PANI) ---------- 29

3.3 COMPÓSITOS DE POLIANILINA E NANOPARTÍCULAS DE COBRE (COMPÓSITOS DE PANI/CuNPS) ---------- 32

3.4 MECANISMO DE SÍNTESE ---------- 35

3.5 PLANEJAMENTO FATORIAL ---------- 41

3.5.1 Estimativa do erro do experimento ---------- 46

3.6 CITOTOXICIDADE DA POLIANILINA, NANOPARTÍCULAS DE COBRE E MATERIAIS COMPÓSITOS ---------- 46

4 METODOLOGIA ---------- 50

4.1 PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 ---------- 50

4.2 MATERIAIS ---------- 52

4.3 SÍNTESE DO COMPÓSITO PANI/Cu ---------- 52

4.4 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO ---------- 53

4.4.1 Espectroscopia de absorção na região do uv-vis ---------- 53

4.4.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (FTIR) --- 53

4.4.3 Espectroscopia de fluorescência ---------- 53

4.4.4 Rendimento quântico relativo de fluorescência ---------- 54

4.4.5 Determinação do tamanho de partícula e do potencial zeta ---- 55
4.4.6 Espectroscopia eletroquímica de impedância ---- 55
4.4.7 Microscopia eletrônica de transmissão (met) ---- 56
4.4.8 Ensaio de citotoxicidade ---- 56
4.4.9 Análise estatística do ensaio de citotoxicidade ---- 57
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES ---- 58
5.1 UV-Vis ---- 58
5.2 FTIR ---- 60
5.3 PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 ---- 62
5.3.1 Fluorescência ---- 62
5.3.2 Planejamento fatorial para compósito PANI/Cu ---- 66
5.3.3 Diâmetro médio das partículas ---- 70
5.3.4 Planejamento fatorial para compósito pani/au ---- 71
5.4 EFEITO DA VARIAÇÃO DO pH DO MEIO – ESTUDO DA FLUORESCÊNCIA DO COMPÓSITO PANI/Cu NOS DIFERENTES ESTADOS DE OXIDAÇÃO DA PANI ---- 72
5.4.1 UV-Vis e fluorescência ---- 74
5.4.2 Impedância ---- 77
5.4.3 Potencial zeta (ζ) ---- 79
5.5 RENDIMENTO QUÂNTICO E TEMPO DE VIDA ---- 81
5.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) ---- 83
5.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE ---- 85
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS ---- 87
REFERÊNCIAS ---- 89
ANEXO A - POLÍMEROS CONDUTORES ---- 106

1 INTRODUÇÃO

Os polímeros condutores possuem propriedades elétricas exclusivas, que possibilitam a criação de materiais luminescentes, supercapacitores, eletrodos analíticos e biossensores (SEYMOUR & KIRSHENBAUM, 1986; KUCEKOVÁ, 2013). Esses polímeros possuem propriedades químicas e eletroquímicas controláveis, boa estabilidade ambiental, além da flexibilidade de processamento característica dos polímeros convencionais.

Dentre os polímeros condutores, a polianilina (PANI) tem recebido ampla atenção devido às suas convenientes propriedades, como facilidade de síntese, mecanismos estáveis de condução elétrica, alta estabilidade ambiental e, especialmente, por sua característica única de mudar suas propriedades de transporte de carga na protonação (SANTOS et al., 2013). De fato, diferentemente do que é observado, por exemplo, no caso de polipirrol (PPY) ou de derivados do politiofeno, a condutividade de cadeias de PANI dissolvidas podem ser controlada não apenas por processos padrão de redução de oxidação, mas também por uma simples variação de pH (NALWA, 1997; MACDIARMID, 2001; FRATODDI et al. 2015).

Sabendo da grande aplicabilidade dos polímeros condutores, vários trabalhos têm investigado as propriedades de compósitos híbridos metal/polímeros condutores em diversas aplicações (DE MELO et al., 2009; UYGUN & ASLAN, 2010; LIU et al., 2012;2 LIU et al., 2013). Entre esses materiais, nanocompósitos formado por nanopartículas (NPs) metálicas dispersas em um polímero condutor, tal como a polianilina ou o polipirrol, vêm se destacando, pois essa combinação cria uma sinergia que possibilita novas características, que não se fazem presentes em cada um dos componentes separadamente (NASCIMENTO et al., 2011; LIU et al., 2013). Essas características sinérgicas despertam o interesse de cientistas e engenheiros por potencializarem o uso desses materiais para o desenvolvimento de novas tecnologias em nanoescala e produtos na indústria química, física e ótica, como, por exemplo, aplicações na área de catálise (CHRISTINA et al., 2011) e sensores (LANG et al., 2012).

O uso da PANI na síntese desses nanocompósitos é de particular interesse, e trabalhos como o de Santos et al. (2013), Bogdanović (2015; 2018) e Sapurina & Shishov (2012), investigaram a interação da PANI com diferentes tipos metais.

Atualmente, as nanopartículas dos metais mais estudadas para a formação desses nanocompósitos são o cobre (LIU et al., 2013), prata (LIU et al., 2012) e o ouro (ALVES et al., 2011). De um modo geral, a preparação desses compósitos de polianilina e nanopartículas metálicas ocorre com a incorporação das nanopartículas em uma matriz de PANI, durante ou após o processo de polimerização (HUNG & WEI, 2010). Porém, como descrito em Santos et al. (2013) e Bogdanović (2015; 2018), é possível sintetizar esse material em uma única etapa, ao promover a formação simultânea de partículas metálicas do metal e do polímero correspondente.

Muitos trabalhos já investigaram a síntese e caracterização de compósitos de PANI/AuNPs e suas diversas aplicações, que incluem marcadores biológicos, sensores de ácido desoxirribonucléico (DNA), sistemas de reconhecimento molecular e eletrônica em nanoescala (ZHAI & MCCULLOUGH, 2004). Porém há poucos relatos sobre os compósitos de PANI/CuNPs e muitos trabalhos discutem apenas suas propriedades físico-químicas e atividades antimicróbicas (BOGDANOVIĆ et al., 2015; TAMAYO et al., 2016), sem explorar seu potencial para outras aplicações.

Neste trabalho, apresentamos detalhes de um procedimento de síntese em uma única etapa que leva à formação de compósitos de PANI/Cu que exibem propriedades fluorescentes notáveis na região visível, com um rendimento quântico típico da ordem de 9%. Esse valor é algumas ordens de magnitude maior do que aqueles associados as CuNPs isoladas ou a amostras de PANI pura encontradas na literatura (SANTOS et al., 2013; WANG et al., 2019). Também discutimos as características elétricas, espectroscópicas e estruturais desses materiais híbridos e mostramos que, através da variação de alguns parâmetros de preparação (pH e concentração de reagentes), é possível controlar simultaneamente o comprimento de onda correspondente à intensidade máxima de fluorescência e as propriedades elétricas dos nanocompósitos.

Por fim, investigamos possíveis aplicações para o compósito de PANI/Cu com base em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, que incluem testes de diagnóstico (SANTOS et al., 2013) e aplicações biológicas (LIMA, 2019). Para isso, um ensaio de citotoxicidade do material é explorado, pois para qualquer material que entre contato com um sistema biológico ou organismos vivos, sua biocompatibilidade deve ser avaliada para que seu uso possa ser considerado como adequado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Preparação e caracterização de nanocompósitos de PANI e cobre, e a avaliação dos parâmetros experimentais que contribuem para suas propriedades fluorescentes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a fluorescência do compósito de PANI/Cobre a partir da variação controlada das condições de síntese;
- Caracterizar o compósito híbrido mais promissor obtido a partir do planejamento experimental;
- Avaliar a citotoxicidade desse compósito sobre células Vero e macrófagos J774;
- Investigar o efeito do compósito sobre células de câncer cervical humano.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 LUMINESCÊNCIA

Luminescência é a emissão de luz por qualquer substância que esteja em um estado eletrônico excitado. Quando o material absorve energia, parte dela pode ser emitida na forma de luz (ou seja, uma onda eletromagnética). Ao ser absorvida pelo material, a energia recebida pode causar a excitação de elétrons de um nível de mais baixa energia ocupado para um outro, desocupado e de mais alta energia. Como, porém, átomos de um material tendem a permanecer em seu estado de menor energia, o elétron excitado termina por retornar ao nível original, menos energético, liberando assim um fóton de luz (SHINDE et al., 2013).

Existe uma variedade de tipos de luminescência, que são nomeados de acordo com a fonte de energia ou com o fator que desencadeia o processo. A Tabela 1 mostra alguns exemplos de luminescência.

Tabela 1 - Tipos de Luminescência de acordo com o modo de excitação.

Fenômeno	Modo de excitação
Fotoluminescência (fluorescência e fosforescência)	Radiação eletromagnética/fótons
Quimiluminescência	Reação química
Bioluminescência	Processo bioquímico
Triboluminescência	Energia mecânica (fricção, compressão)
Catodoluminescência	Feixe de elétrons
Eletroluminescência	Campo elétrico
Termoluminescência	Material aquecido após armazenar energia por irradiação
Radioluminescência	Radiação ionizante (Raios-X, α, β, γ)
Sonoluminescência	Campo sonoro

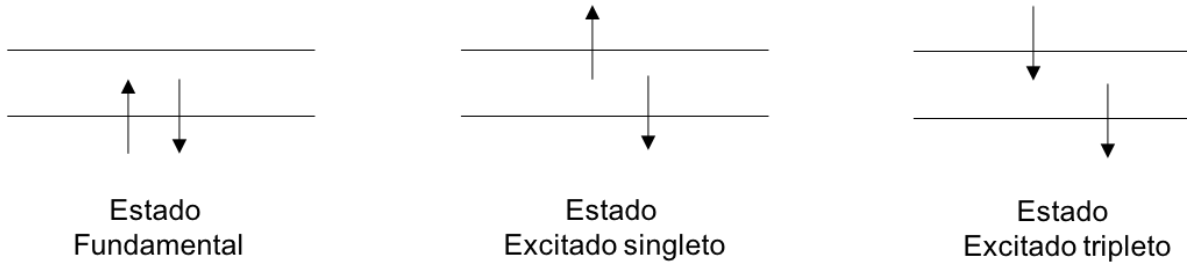
Fonte: MURTHY & VIRK (2014).

O tempo característico (τ_C) para que ocorra a emissão de luz após a absorção da radiação pode variar em uma faixa que vai de intervalos menores que 10^{-8} s até a ordem de dias (SHINDE et al., 2013; MURTHY & VIRK, 2014). Se o intervalo é curto ($\tau_C < 10^{-8}$ s), o processo é chamado de fluorescência, com intervalos mais longos ($\tau_C > 10^{-8}$ s) correspondendo aos casos de fosforescência. Em ambas as situações, os átomos ou moléculas dos materiais absorvem luz em um dado comprimento de onda e a emitem em um comprimento de onda maior (ou seja, de menor frequência) que o da luz incidente, por conta de processos de dissipação de energia que ocorrem por meio de fenômenos não radiativos (no que é chamado de lei de Stokes ou de deslocamento Stokes) (MURTHY & VIRK, 2014). De um modo geral, os fluoróforos (isto é, as moléculas fluorescentes) podem apresentar um deslocamento de Stokes que é afetado por fatores como a influência do solvente, reações envolvendo o estado excitado, formação de complexos e/ou transferência de energia, processos que serão discutidos a seguir (LAKOWICZ, 2006).

A fluorescência é um fenômeno que independe da temperatura, por ser o resultado de transições de um estado singleto excitado para o estado singleto fundamental (ver Fig. 1), processos que obedecem a regra da simetria de spin (ou seja, nesse caso o elétron no estado excitado mantém seu spin com a mesma orientação que a do estado fundamental). Assim, por envolver transições permitidas, o decaimento da fluorescência com a emissão de um fóton pode ocorrer rapidamente (ATKINS & JONES, 2012; MURTHY & VIRK, 2014).

Por sua vez, a fosforescência é um processo que depende da temperatura, com a emissão de luz ocorrendo a partir de um estado excitado tripleto, como mostra a Fig. 1. Isso porque, nesse caso, ao passar para o estado excitado o elétron muda sua orientação de spin, que se torna a mesma que a dos elétrons que permaneceram no estado fundamental. Como resultado, as transições para o estado fundamental são agora proibidas pela regra da multiplicidade de spin, o que faz as taxas de emissão correspondentes serem mais lentas que no caso da fluorescência (SHINDE et al., 2013).

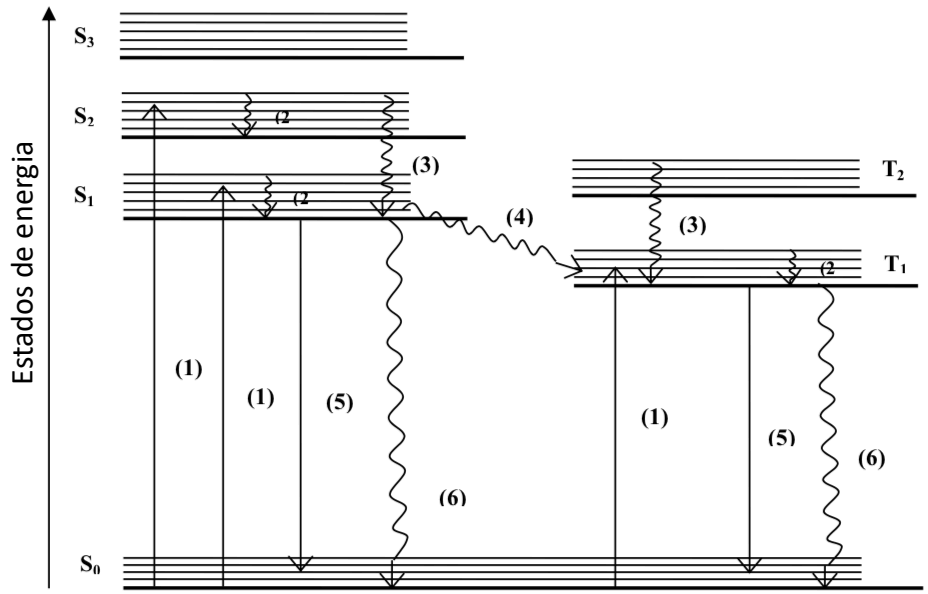
Figura 1 - Representação dos estados fundamental, excitado singleto e excitado tripleto.



Após a absorção de energia pelo material, e antes que ocorra a emissão de um fóton, outros processos de desativação podem competir com a emissão radiativa, tais como decaimentos não radiativos (isto é, sem envolver emissão de radiação) e processos de *quenching* (“extinção”), nos quais a intensidade de fluorescência é diminuída devido a interações do estado fundamental ou do estado excitado do fluoróforo com outras espécies em solução (DANUTA, 1988). Estes processos são melhor visualizados em um diagrama de Jablonski (Fig. 2).

Um diagrama de Jablonski ilustra os processos de absorção e emissão (SHINDE et al., 2013). Na Fig. 2 são mostrados tanto o estado fundamental, quanto o primeiro e o segundo estados eletrônicos, representados por S_0, S_1 e S_2, respectivamente. Para cada nível de energia eletrônica de um fluoróforo estão associados vários níveis de energia vibracional (designados por 0, 1, 2, etc.). A excitação corresponde a transições eletrônicas representadas como linhas verticais, para ilustrar a natureza instantânea da absorção de luz (DANUTA, 1988; LAKOWICZ, 2006; SHINDE et al., 2013).

Figura 2 - Diagrama de Jablonski modificado. (1) absorção de um fóton, (S_0) estado fundamental, (S_n) estado excitado singleto, (S_1) primeiro estado excitado singleto, (2) relaxamento vibracional (RV), (3) cruzamento interno (CI), (4) cruzamento intersistemas (CIS), (T_n) estado excitado tripleto, (5) transição radiativa e (6) transição não radiativa.



Fonte: adaptado de MURTHY & VIRK (2014).

Pelo uso de setas retas e curvas, esse diagrama mostra as transições possíveis entre autoestados após a exposição de uma molécula a luz de um determinado comprimento de onda. Setas retas representam transições radiativas, nas quais a transição entre dois estados de energia envolve a absorção ou emissão de um fóton de luz. Setas curvas ilustram transições não radiativas, em que não há absorção ou emissão de luz. Em um diagrama de Jablonski, várias vias diferentes retratam a maneira como um sistema pode absorver fótons de um determinado comprimento de onda e depois dissipar a energia recebida sob a forma de fótons de menor energia. Assim, a maioria dos diagramas começa com setas saindo do estado eletrônico fundamental e termina com as setas retornando para ele (DANUTA, 1988).

Com a absorção da radiação de uma frequência característica, os elétrons das moléculas ganham energia e passam a ocupar um estado excitado singleto S_n, onde, a depender da energia absorvida, n pode assumir valores 1, 2, 3, etc. De acordo com a regra de Kasha (HIEN et al., 2018), após a molécula ser excitada para níveis vibracionais mais elevados, o excedente de energia é primeiramente dissipado de

maneira não radiativa, ficando o fluoróforo em um nível vibracional de mais baixa energia S_n, em um processo chamado de relaxamento vibracional (RV). Esse relaxamento tem a duração típica de aproximadamente 10^{-12} s, sendo um processo relativamente rápido que independe do comprimento de onda de excitação (LAKOWICZ, 2006). Estando agora o fluoróforo no nível vibracional S_n, de energia mais baixa, ele pode em seguida passar para um nível S_{n-1}, em um processo chamado de cruzamento interno (CI), que não envolve a emissão de radiação.

Caso a multiplicidade do spin permaneça a mesma, dois fenômenos podem ocorrer a partir do estado eletrônico S_1. O primeiro tipo é o CI, que ocorre quando a diferença de energia entre S_1 e S_0 não é muito grande, de modo que seus níveis vibracionais se sobrepõem, fazendo com que os elétrons retornem ao estado fundamental através de um relaxamento vibracional, sem a emissão de radiação eletromagnética. Isso se faz possível durante colisões da molécula do fluoróforo em seu estado excitado com moléculas vizinhas do solvente (SHINDE et al., 2013). A segunda possibilidade é que ocorra a fluorescência (F), que ocorre quando a diferença de energia entre S_1 e S_0 é relativamente grande, de modo que a desativação para o nível fundamental envolve a emissão de radiação na forma de luz (LAKOWICZ, 2006).

Caso a multiplicidade do spin não permaneça a mesma, por conta da natureza da relaxação do estado excitado do fluoróforo, outro processo ocorre, a fosforescência. Nesse caso, temos o fenômeno chamado de cruzamento intersistema (CIS). Nesse tipo de processo, uma molécula excitada no nível vibracional mais baixo de S_1 pode se rearranjar em um nível vibracional de mesma energia, mas correspondente a um estado tripleto T_n, como mostrado na Fig. 2. Estando em um nível vibracional mais energético T_n, através de relaxações vibracionais a molécula pode então passar para o nível vibracional mais baixo, T_1. Os processos CIS podem ser rápidos o suficiente (10^{-7} – 10^{-9} s) para que venham a competir com os processos de dessexcitação a partir de S_1, como os processos de fluorescência e de conversão interna. Tecnicamente, muito embora o cruzamento entre estados de multiplicidade diferente seja proibido, a intensidade do acoplamento entre o momento magnético orbital e o momento magnético do spin pode ser grande o suficiente para permitir que esse processo venha a ocorrer (SHINDE et al., 2013).

A fluorescência retardada (“delayed fluorescence”) é um outro fenômeno que pode ocorrer, em situações em que a diferença de energia entre os níveis S_1 e T_1 é

pequena, com o tempo de vida T_1 sendo suficientemente longo para que o cruzamento inverso $T_1 \rightarrow S_1$ possa acontecer. A emissão resultante possui a mesma distribuição espectral da fluorescência normal, porém com uma constante de decaimento superior, pois antes de decair a molécula se encontra no estado tripleto (BERDEN-ZRIMEC et al., 2010).

Alguns desses processos são considerados proibidos por regras de seleção[1], em especial por multiplicidade de spin, levando a fenômenos com escala de tempo diferente. A multiplicidade de spin de um estado eletrônico está relacionada com o momento magnético resultante do spin S pela expressão 2S + 1. A multiplicidade é igual ao número de orientações possíveis para um mesmo valor de momento angular do spin total resultante. Se o elétron excitado está emparelhado com o elétron que permaneceu no estado fundamental, o momento de spin resultante é zero, a multiplicidade do spin é igual a 1 e dizemos que a molécula está em um estado excitado singleto (S_1). Por outro lado, se os elétrons nos estados fundamentais e excitados estão desemparelhados, então S = 1 e a multiplicidade do spin é 3, constituindo o chamado estado excitado tripleto (T_1) (DEICHMANN, 2005).

Segundo a regra de Hund (KATRIEL & PAUNCZ, 1977) para a multiplicidade de spin, temos que para estados gerados pela mesma configuração eletrônica, quanto maior a multiplicidade, menor será a energia. Assim, o estado tripleto é mais estável que o singleto e uma transição direta $T \rightarrow S$ é dita proibida. Quando mais permitida for a transição, menor o tempo de vida da molécula no estado eletrônico excitado. Por esse motivo, a emissão da fosforescência ocorre em tempos muito maiores que a fluorescência ($S \rightarrow S$) (ATKINS & DE PAULA, 2008).

3.1.1 Fatores que influenciam a fluorescência

Muito embora seja difícil prever teoricamente quais moléculas poderão exibir luminescência sem que se saiba ao certo a diferença de energia entre os estados singletos excitado e fundamental, alguns fatores na estrutura das moléculas podem ser decisivos para que ocorra o fenômeno. Moléculas aromáticas, por exemplo,

[1] Regras de seleção são um conjunto de restrições que governam a probabilidade de transição de um sistema físico de um estado para outro. Elas permitem distinguir entre “transições permitidas”, que ocorrem com maior probabilidade, e as “proibidas”, que têm uma menor probabilidade de ocorrer.

possuem uma estrutura relativamente rígida e rica em elétrons π, e isso faz com que elas sejam boas candidatas a serem fluoróforos. Uma molécula rígida possui liberdade vibracional restrita, o que diminui significativamente os processos de desativações não-radiativas por CI, com o consequente aumento da eficiência quântica fluorescente (SCHULMAN, 1977).

Por sua vez, como tanto a fluorescência quanto o CIS ocorrem a partir do primeiro estado excitado (S_1), a natureza desse estado é crítica para a determinação do comportamento luminescente de uma molécula. Em moléculas orgânicas, a fluorescência se origina das transições entre o orbital π antiligante e π ligante ($\pi* \rightarrow \pi$), e em menor proporção entre o π antiligante e o não ligante n ($\pi* \rightarrow n$). Assim, uma estrutura plana e a presença de muitas ligações π em uma molécula favorecem sua fluorescência, pois uma estrutura desse tipo permite maior conjugação entre os sistemas de elétrons π (INGLE & CROUCH, 1988).

A presença de grupos substituintes na molécula também afeta a fluorescência e o tipo de luminescência. Por exemplo, os grupos hidroxi (-OH), metoxi (-OR), amino (-NR_2), cianeto (-CN) e sulfônico (-SO_3H) têm tendência em amplificar a fluorescência. Por outro lado, grupos cetônicos (-C=O) carboxílicos (-COOH) e halogênios (-X) favorecem o CIS, trocando a multiplicidade da população excitada (S_1 para T_n) e, por consequência, diminuindo a fluorescência (INGLE & CROUCH, 1988).

Além dos fatores associados com a estrutura molecular, é preciso também que o meio no qual a molécula se encontra seja favorável para que a radiação radiativa $S_1 \rightarrow S_0$ aconteça, uma vez que fatores como a temperatura, pH, solvente e presença de outras espécies podem gerar efeitos nas características luminescentes da substância, afetando não apenas a velocidade com que os processos radiativos e não-radiativos ocorrem, mas também a natureza e a energia relativa do estado excitado de menor energia (SCHULMAN, 1977).

Por exemplo, a mudança na temperatura afeta a viscosidade do meio. O aumento da temperatura causa mais colisões das moléculas do fluoróforo com as moléculas do solvente, facilitando os processos de relaxamento vibracional (RV) na desativação do estado excitado. Como a fluorescência é um fenômeno relativamente rápido, o efeito da temperatura é menos crítico, de modo que ele pode ser observado à temperatura ambiente (NICHOLS, 1910; BOWEN & SAHU, 1959). Já a influência do pH dependerá da natureza dos grupos funcionais da molécula. A basicidade ou acidez

da molécula é determinada por sua estrutura eletrônica, a qual, durante a excitação a partir do nível fundamental, sofre mudanças especificas, o que provavelmente leva a mudanças no caráter ácido ou básico. Também, a mudança de basicidade e acidez da molécula entre seu estado fundamental e seu estado excitado influenciará na diferença entre a absorção e o espectro de fluorescência devido a mudança de pH: quanto maior a diferença na basicidade da molécula, maior é a natureza da mudança durante a ionização, sendo muito comum observar significante discrepância entre as propriedades luminescentes de moléculas protonadas e não-protonadas (SCHULMAN & WINEFORDNER, 1970).

Outro fator que influencia tanto o fenômeno de fluorescência quanto as propriedades do espectro de emissão dos fluoróforos é a natureza do solvente (ou seja, suas propriedades físicas e químicas) e do ambiente local (tais como, sua composição, temperatura, presença de impurezas, etc.) (LAKOWICZ, 2006). Enquanto a polaridade do solvente é uma das causas da origem dos deslocamentos Stokes, tanto sua viscosidade quanto seu caráter prótico podem afetar de maneira significativa a luminescência. O aumento da viscosidade pode reduzir a taxa de colisões entre as moléculas, diminuindo as desativações por *quenching*, uma vez que a difusão das espécies desativadoras é reduzida com a diminuição da fluidez do meio. Assim, por exemplo, a difusão do oxigênio aumenta as desativações do estado tripleto, afetando a fosforescência. Já a polaridade e o caráter prótico do solvente são importantes por afetarem a energia do estado excitado (INGLE & CROUCH, 1988; LAKOWICZ, 2006).

Em transições do tipo π - π^*, comuns na fluorescência, a molécula se torna mais polar em seu estado excitado, adquirindo um caráter mais básico em relação ao estado fundamental. Desta forma, o aumento da polaridade do solvente, ou do seu caráter prótico, acaba reduzindo a energia relativa do estado excitado da molécula, fazendo com que o espectro de emissão ocorra em comprimentos de onda maiores na direção do vermelho (no chamado deslocamento batocrômico). Além de provocar o deslocamento do espectro, essa diminuição de energia facilita outros processos, como o CI, o que reduz a fluorescência. Já para as transições n - π^*, ocorre uma redução da polaridade do estado excitado em relação ao fundamental, e o aumento da polaridade ou do caráter prótico do solvente desloca o espectro para comprimentos de onda menores na direção do azul (no deslocamento hipsocrômico). Há ainda

moléculas que mudam seu estado excitado a depender da polaridade do solvente ou de seu caráter prótico, podendo passar de seu estado singleto excitado n - π^* para π - π^*, o que explica por que algumas substâncias que não fluorescem em solventes apolares ou não-próticos podem apresentar intensa fluorescência em solventes polares ou próticos (INGLE & CROUCH, 1988; INGLE, 1998).

A presença de certas substâncias pode também desativar o estado excitado singleto através do chamado *quenching* dinâmico. Ao entrarem em contato com o fluoróforo de interesse, essas moléculas podem atuar como desativadoras, ao passarem para seu estado excitado, com o fluoróforo retornando a seu estado fundamental. Por sua vez, a magnitude da desativação dependerá da concentração dessas espécies desativadoras e de seu poder de difusão no meio (SCHULMAN, 1977; INGLE & CROUCH, 1988; ERA et al., 2003; LAKOWICZ, 2006).

3.1.2 Espectroscopia de fluorescência

A resposta de um experimento de espectroscopia de fluorescência é geralmente apresentada sob a forma de espectros de emissão, ou seja, gráficos da intensidade de fluorescência versus o comprimento de onda (nm) ou número de onda (cm^{-1}) correspondente.

De uma maneira geral, as medidas de fluorescência podem ser feitas em estado estacionário ou no modo resolvido no tempo. Medidas no estado estacionário são aquelas realizadas com uma iluminação e observação constantes. Nela, a amostra é excitada por um feixe continuado de luz, sendo a intensidade do espectro de emissão então registrada. Já as medidas resolvidas no tempo, que além de permitir determinar a intensidade da resposta, são úteis por possibilitar medir os tempos de decaimento de fluorescência e a existência de uma possível anisotropia da amostra, se baseiam em uma excitação pulsada e requerem um sistema de velocidade de detecção que permita registar dados na escala de tempo de nanosegundos. Nesse tipo de medida, o pulso de excitação deve ter uma duração tipicamente menor que o tempo esperado para o decaimento da amostra (LAKOWICZ, 2006).

3.1.3 Rendimento quântico e tempo de vida de fluorescência

O rendimento quântico e o tempo de vida são talvez as características mais importantes de um fluoróforo. O rendimento quântico, uma medida da eficiência de um processo de fluorescência, é definido como o número de fótons emitidos em relação ao número de fótons absorvidos, em uma dada unidade de tempo (LAKOWICZ, 2006), na forma

$$\varphi_f = \frac{n^\circ \, de \, fótons \, emitidos}{n^\circ \, de \, fótons \, absorvidos} \quad . \qquad (1)$$

Assim, o rendimento quântico pode ser relacionado com a taxa de emissão radiativa (k_r) e não-radiativa (k_{nr}) (LAKOWICZ, 2006), pois ambas são responsáveis pela diminuição da população do estado excitado. O rendimento quântico pode ser expresso como

$$\varphi_f = \frac{K_r}{K_r + K_m} \quad . \qquad (2)$$

Devido às perdas Stokes que ocorrem através das relaxações vibracionais para níveis vibracionais inferiores, o rendimento quântico é sempre menor que a unidade ($0 \leq \varphi_f \leq 1$), podendo chegar muito próximo de um quando a taxa radiativa é muito maior que a não radiativa ($k_{nr} << k_r$) (CHRISTOPOULOS & DIAMANDIS, 1996; LAKOWICZ, 2006).

Por sua vez, o tempo de vida (τ) é também importante, por estar associado com o tempo disponível para que o fluoróforo interaja ou se difunda por sua vizinhança. Ele é definido como o tempo médio que a molécula passa no estado excitado antes de retornar ao estado fundamental. O tempo de vida da fluorescência está na ordem de 10 ns (LAKOWICZ, 2006) e pode ser expresso em relação as taxas de decaimento radiativo e não radiativo de acordo com

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad . \qquad (3)$$

Como o decaimento é um processo aleatório, as moléculas não decaem todas elas exatamente em $t = \tau$, de modo que o tempo de vida é apenas uma média do tempo que a molécula passa no estado excitado.

Após um pulso de excitação instantâneo da molécula fluorescente, a curva de decaimento de fluorescência segue uma cinética de primeira ordem, na forma

$$F_t = F_0\, e^{-Kt}\ , \qquad (4)$$

onde F_t e F_0 são as intensidades de fluorescência no tempo t e 0, respectivamente, e K é a taxa constante de dessexcitação, que corresponde à soma das taxas de todos os possíveis caminhos de dessexcitação, ou seja,

$$k = k_f + k_i + k_x + k_{ET} + \ldots = k_f + k_{nr}\,, \qquad (5)$$

onde k_f é a taxa de fluorescência, k_i a taxa da CI e RV, k_x é a taxa de CIS, k_{ET} a taxa da transferência intermolecular e k_{nr} é a soma das taxas de caminhos não radiativos. O tempo de vida radiativo, τ , é então definido como o tempo requerido para que a emissão de fluorescência decaia por um fator 1/*e* de sua intensidade inicial após a excitação. Substituindo F_t na Eq. 5 por F_o/e (intensidade de fluorescência após tempo τ), obtemos a relação

$$\tau = k^{-1}\ , \qquad (6)$$

a qual indica que o tempo de vida é igual ao inverso da constante de taxa. Ao combinarmos as Eqs. 5 e 7, encontramos

$$F_t = F_0\, e^{-t/\tau}\ , \qquad (7)$$

ou seja,

$$lnF_t = lnF_0 - \frac{t}{\tau}\ . \qquad (8)$$

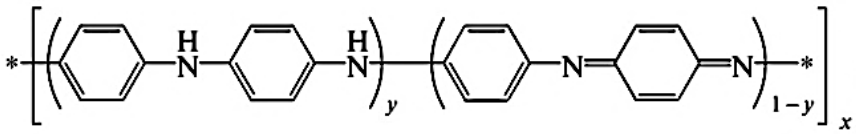
Ao plotar um gráfico $\ln F_t$ versus t, obtemos uma linha reta com coeficiente angular igual a $-1/\tau$. Caso se tenha apenas uma espécie emissora, o tempo de vida pode ser calculado a partir desse gráfico linear, uma vez que se admita ser o pulso de excitação consideravelmente menor que o tempo de vida (CHRISTOPOULOS & DIAMANDIS, 1996).

3.2 POLIANILINA (PANI)

A polianilina (PANI) é um dos polímeros condutores (Anexo A) que mais vem se destacando ao longo dos anos devido à facilidade de sua síntese e processamento, boa estabilidade química em condições ambientes, além de suas propriedades elétricas, o que abre a possibilidade de seu uso em diferentes aplicações tecnológicas (MATTOSO, 1996). Em 1985, MacDiarmid verificou que quando em solução ácida aquosa o monômero de anilina podia ser quimicamente oxidado pelo peroxidissulfato de amônio (APS), do que resulta um pó verde de PANI com uma condutividade de 3 S/cm (WAN, 2005).

A polianilina, o único polímero condutor que existe em três formas estáveis de oxidação, consiste de unidades monoméricas agrupadas em blocos reduzidos (y) e oxidados (1-y) (MATTOSO, 1996; BOEVA & SERGEYEV, 2014), onde y pode variar entre zero e um, como pode ser observado na Fig. 3.

Figura 3 - Estrutura da PANI na forma de base não dopada, onde $0 \leq y \leq 1$.

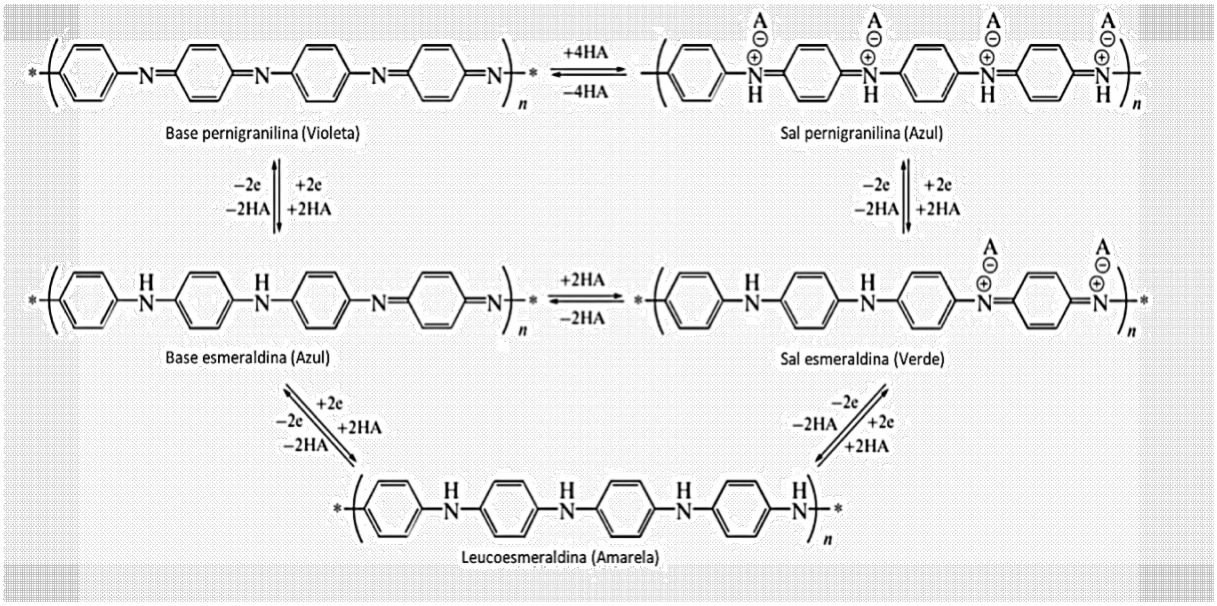


Fonte: adaptado de BOEVA & SERGEYEV (2014).

O estado redox da polianilina depende do valor de y. Caso y = 0, temos a forma totalmente oxidada, que é chamada de pernigranilina, a variedade isolante do polímero. Quando y = 0,5 a polianilina é chamada de esmeraldina, o que corresponde à forma condutora da PANI. Finalmente, se y = 1 tem-se a forma totalmente reduzida da PANI, chamada de leucoemeraldina, a qual é também isolante (BOEVA & SERGEYEV, 2014). Tanto a pernigranilina quanto a esmeraldina podem ocorrer como sais ou bases (CHIANG & MACDIARMID, 1986; MACDIARMID & EPSTEIN, 1989) e esses estados de oxidação são afetados pelo pH do meio. As cinco formas comuns podem facilmente se transformar umas nas outras por reações de oxidação-redução ou ácido-base, como visto na Fig. 4. Assim, a PANI no seu estado isolante pode ser convertida a um material com características metálicas, e vice-versa, simplesmente

pela adição de determinadas espécies químicas que podem interagir com a cadeia principal, caracterizando a dopagem do polímero (MATTOSO, 1996).

Figura 4 - Diferentes estados redox da polianilina de acordo com diferentes pH.



Fonte: Adaptado de BOEVA & SERGEYEV (2014).

As propriedades de transporte dos sistemas conjugados, com um comportamento que pode ser tanto metálico quanto não metálico, são altamente influenciadas pelo nível de dopagem e de desordem estrutural. Durante o processo de dopagem, a criação de defeitos locais dentro da estrutura polimérica leva à formação de sólitons, pólarons e bipólarons. No caso da polianilina, que possui um estado fundamental não degenerado, a dopagem protônica está associada com a formação de pólarons e bipólarons (BREDAS et al., 1984).

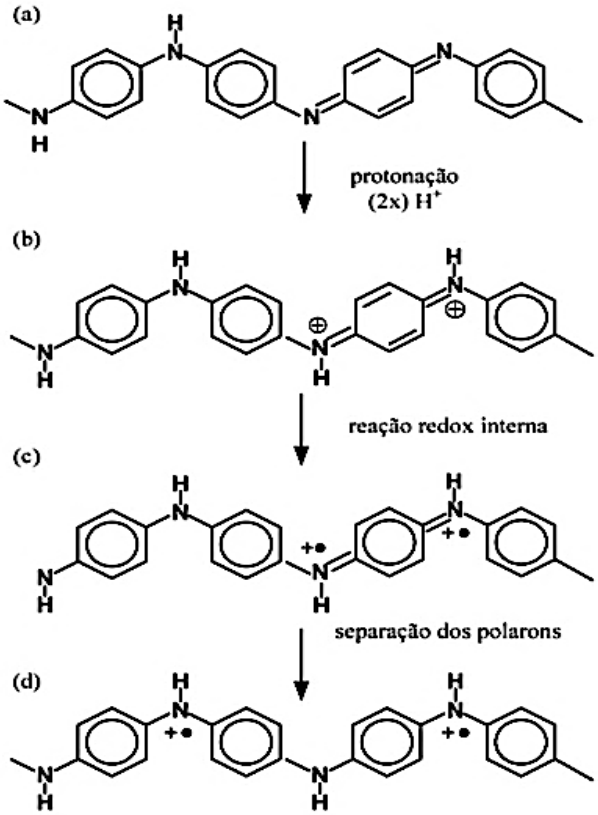
Como mostrado na Fig. 4, a dopagem da PANI ocorre em meio ácido, com a protonação dos átomos de nitrogênio nos sítios básicos (aminas [−*NH* −] e iminas [=*N*−]) através do par isolado dos átomos de nitrogênio (BOEVA & SERGEYEV, 2014; VARGAS et al., 2018). O par isolado é o sítio preferencial mais ativo para a adição de prótons nos nitrogênios da imina. A protonação provoca uma despopulação parcial do sistema de elétrons π, devido à oxidação parcial, no processo de dopagem do tipo p. Nessa etapa, começam a surgir estados eletrônicos no meio do gap devido a distorções na cadeia polimérica em torno das cargas geradas quando da protonação, resultando no aparecimento dos pólaron (um íon-radical). Devido à protonação, a

cadeia adquire carga positiva, sendo sua eletroneutralidade garantida pelos contra-íons (ânions) provindos do próprio ácido HA usado (VARGAS et al., 2018). A polianilina não dopada é um isolante com um gap da ordem de 3,8 eV. Após a dopagem, a condutividade é aumentada por 10 – 12 ordens de magnitude (BOEVA & SERGEYEV, 2014).

O comportamento metálico da esmeraldina protonada pode ser explicado mediante o modelo da “rede polarônica” (Fig. 5), que se baseia em uma transição que ocorre em duas etapas dos bipólarons isolados, que são inicialmente formados no processo de tratamento ácido pela protonação dos nitrogênios iminas vizinhos aos anéis quinona e se dissociam espontaneamente para formar um par de pólarons. Numa segunda etapa, os pólaron se separam para formar uma rede polarônica que se assemelha à forma totalmente reduzida da polianilina, a leucoesmeraldina (y=1), dando origem a uma banda de valência semipreenchida (ENGERT et al., 1994; MATTOSO, 1996; MACDIARMID, 2001; PADILLA, 2011).

Caso a polianilina seja dopada com ácidos que contenham ânions volumosos e solventes que interajam com estes ânions, as cadeias poliméricas passam a assumir uma conformação estendida. Esta conformação permite maior interação entre os estados polarônicos, promovendo deslocalização e maior extensão da conjugação π e, consequentemente, provoca o aumento da condutividade. Outro fator importante relacionado ao aumento da condutividade da PANI está associado com a total protonação dos grupos iminas, por isso, o grau de dopagem deste polímero depende do pH da solução ácida em que está inserido (VARGAS et al., 2018).

Figura 5 - Representação da dopagem com ácido protônico da polianilina na forma de base esmeraldina. Em (a) a cadeia antes da protonação; de (b) a (d) depois de 50 % de protonação com: (b) formação de bipólarons, (c) formação de pólarons e (d) separação dos pólarons resultando na rede polarônica.



Fonte: (PADILLA, 2011).

3.3 COMPÓSITOS DE POLIANILINA E NANOPARTÍCULAS DE COBRE (COMPÓSITOS DE PANI/CuNPS)

Ao longo dos últimos anos, compósitos de polímeros e metais têm atraído muita atenção pelo fato de suas propriedades permitirem muitas aplicações práticas (DE MELO et al., 2009; UYGUN & ASLAN, 2010; LIU et al., 2012;2; LIU et al., 2013). Entre esses materiais, nanocompósitos formado por nanopartículas (NPs) metálicas dispersas em um polímero condutor, tal como a polianilina ou o polipirrol, têm se destacado, pois essa combinação cria uma sinergia que possibilita novas características, que não se fazem presentes em cada um dos componentes separadamente (NASCIMENTO et al., 2011; LIU et al., 2013). Essas características

sinérgicas despertam o interesse de cientistas e engenheiros por potencializarem o uso desses materiais para o desenvolvimento de novas tecnologias em nanoescala e produtos na indústria química, física e ótica, como, por exemplo, aplicações na área de catálise (CHRISTINA et al., 2011), sensores (LANG et al., 2012), dispositivos de memória (DIVYA & SANGARANARAYANAN, 2011) e imagem biológica (UYGUN & ASLAN, 2010; LIU et al., 2012; SANTOS et al., 2013).

O uso da polianilina (PANI) na formação desses compósitos é de particular interesse devido à sua alta estabilidade ambiental, baixo custo de monômero, grande faixa de condutividade e sua grande variação cromática resultante dos diferentes estados de oxidação da PANI por conta da dopagem ou desdopagem. Isso faz com que a PANI seja comumente usada como componente ativo em vários campos, principalmente na construção de dispositivos eletrônicos (LIU et al., 2012). Por outro lado, as nanopartículas dos metais atualmente mais estudadas para a formação desses nanocompósitos são o cobre (UYGUN & ASLAN, 2010; LIU et al., 2012; LIU et al., 2013), prata (LIU et al., 2012) e o ouro (DE MELO et al., 2009; HUNG & WEI, 2010; ALVES et al., 2011).

De um modo geral, a preparação desses compósitos de polianilina e nanopartículas metálicas ocorre com a incorporação das nanopartículas em uma matriz de PANI, durante ou após o processo de polimerização (HUNG & WEI, 2010). Assim, por exemplo, no trabalho de Uygun e Aslan (2010) o cobre metálico (Cu^0) é primeiramente sintetizado em uma solução aquosa pela redução de Cu^+ por $NaBH_4$ e só então, após a acidificação do meio, que ocorre a incorporação da anilina, resultando em polianilina com metais de cobre dispersos em sua cadeia. Já no trabalho de Liu et al. (2013), um nanocolóide de cobre foi fabricado por explosão elétrica de fio (EEW) em solução de ácido poliacrílico (PAA) e etanol. Nessa síntese, um fio de Cu foi instalado entre dois eletrodos e imerso na solução de PAA passando por ele uma corrente de alta densidade. Devido à alta taxa de injeção de energia, um plasma de cobre é formado, em seguida resfriado e condensado em nanopartículas de cobre que se dispersaram na solução de PAA. Por fim, a polimerização *in situ* de anilina na suspensão de cobre é realizada em meio acidificado com auxílio do peroxidissulfato de amônio.

Por outro lado, outros trabalhos relatam metodologias mais simples de síntese, onde compósitos de PANI e nanopartículas de ouro (AuNPs) são preparados pela

polimerização da anilina usando ácido tetracloroáurico ($HAuCl_4^-$) (DE MELO et al., 2009; BERZINA et al., 2011). Nessa metodologia, a redução do $HAuCl4^-$ ocorre ao mesmo tempo que a oxidação da anilina, com a formação simultânea das nanopartículas de ouro e da matriz polimérica. Porém, para evitar a aglomeração das AuNPs devido a interações iônicas (DE MELO et al., 2009), é necessário introduzir na síntese de um agente de proteção para separá-los (DE MELO et al., 2009; LIU et al., 2013; SANTOS et al., 2013). Como reportado em Selvakanna et al. (2004 a; 2004 b) e por Berzina et al. (2011), $AuCl_4^-$ pode ser reduzido por moléculas contendo amina, o que resulta na formação simultânea de partículas metálicas de ouro e do polímero correspondente. Por sua vez, no trabalho de Kinyanjui e Hatchett (2004) a oxidação da anilina pelo $AuCl_4^-$ ocorre com a formação simultânea de quantidades em massa de um composto PANI/AuNPs, o que permite uma boa dispersão das nanopartículas de ouro na matriz de polianilina.

O mesmo método (DE MELO et. al. (2009) e SANTOS. et. al. (2013)) foi usado no presente trabalho para possibilitar a síntese dos compósitos de polianilina com nanopartículas de cobre (PANI/CuNPs). Em geral, os trabalhos de síntese de compósitos de PANI e cobre reportados na literatura envolvem a formação de nanopartículas de óxido de cobre ou de outros compostos, como Cu_2Se (SANGAMESHA et al., 2014; NADAF & VENKATESH, 2015; SHUBHA et al., 2015), ou correspondem à síntese das nanopartículas de cobre separadamente da matriz polimérica, com o uso de um agente oxidante como o persulfato de amônia para permitir a polimerização (UYGUN &ASLAN, 2010; LIU et al., 2012; LIU et al., 2013; SHUBHA et al., 2015).

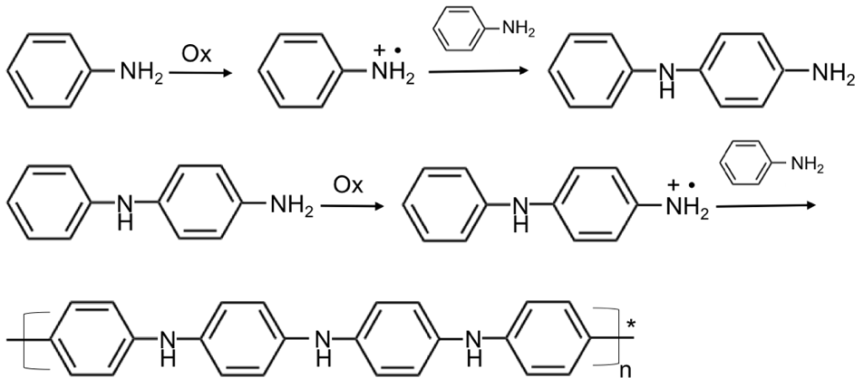
Algumas aplicações dos compósitos de PANI/CuNPs reportadas na literatura exploram suas propriedades físico-químicas em atividades antimicrobianas (TAMAYO et al., 2016). Como mostrado por Bogdanović (2015; 2018), os compósitos de PANI/CuNPs se mostraram eficientes quando aplicados em atividades bactericidas e fungicidas, exibindo concentrações inibitórias e bactericidas menores que as relatadas para outros nanocompósitos. Além disso, há também o relato do uso desses nanocompósitos em sensores do gás clorofórmio, como reportado por Sharma et. al. (2002), com base no fenômeno de adsorção-dessorção da molécula-alvo na superfície de aglomerados de Cu. Não foram encontrados, porém, relatos na literatura de trabalhos discutindo a fluorescência dos compósitos de PANI/CuNPs. Pelos trabalhos

de de Melo (2009), Alves et al. (2011), Alves et al. (2013) e Santos et al. (2013), sabe-se que a intensidade da fluorescência dos compósitos de PANI/AuNPs é significativa, permitindo sua aplicação em testes de diagnóstico molecular.

3.4 MECANISMO DE SÍNTESE

A polimerização da anilina e síntese da polianilina em qualquer uma de suas formas pode ser feita por métodos eletroquímicos ou químicos. De acordo com Wei et al. (1989), ambos os tipos de sínteses envolvem duas etapas, com a primeira sendo a oxidação do monômero de anilina, pela remoção de um elétron do par isolado do nitrogênio, para formar um cátion-radical que é estabilizado por ressonância. Em uma segunda etapa, a depender do pH do meio este cátion-radical pode reagir com um outro cátion-radical para formar as espécies diméricas. Estas espécies, uma vez formadas são mais facilmente oxidadas fazendo com que acoplamentos sucessivos as moléculas do monômero promovam o crescimento da cadeia. O passo de propagação subsequente é similar a um processo de substituição eletrofílica, onde o terminal oxidado do grupo amino do oligômero ataca a posição “para” do monômero, o que é ilustrado na Fig. 6 (SAPURINA & SHISHOV, 2012).

Figura 6 - Esquema da polimerização oxidativa da polianilina.



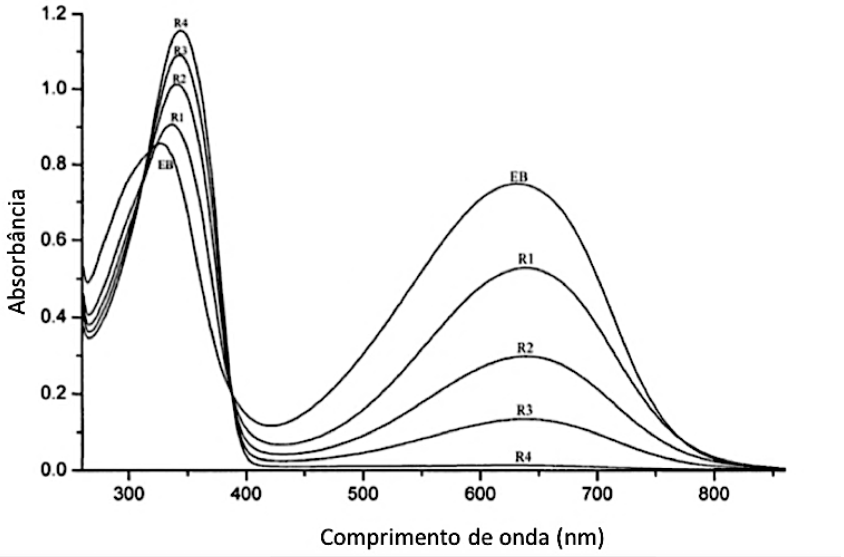
Fonte: adaptado de SAPURINA & SHISHOV (2012).

É surpreendente que a síntese desse polímero altamente regular possa ser iniciada por uma ampla gama de agentes oxidantes (como persulfatos, que possuem alto potencial de oxidação de +2,01 V a ferro (III) com um potencial de + 0,7 V), principalmente em meio ácido, onde a barreira de energia que precisa ser superada para a propagação da cadeia polimérica corresponde a um potencial oxidativo de +1,05 V, maior que a do meio básico e neutro (SAPURINA & SHISHOV, 2012). Sapurina e Stejskal (2012) mostraram que a anilina pode ser oxidada por agentes oxidantes fracos, com um potencial próximo a +1 V, ou até mais baixo. Entretanto, o uso de agentes oxidantes fracos não necessariamente leva à formação de polímeros condutores.

A polimerização da anilina pode ocorrer em condições de diferentes níveis de acidez, com a formação de produtos com propriedades distintas, do que resultam cadeias de polianilina em diferentes estados oxidativos. Por exemplo, quando a polimerização acontece em um meio com baixa acidez (neutro ou básico), é formado um pó marrom com baixa condutividade. Já a síntese em meios altamente ácidos produz uma polianilina altamente condutora, uma vez que nessas condições a cadeia pode ser dopada, como mostrado na Fig. 5, com a formação de bipólarons, do que resulta da polianilina na forma de base emeraldina, com coloração verde escura (PADILLA, 2011; SAPURINA & SHISHOV, 2012; BOEVA & SERGEYEV, 2013; VARGAS et al., 2018).

De acordo com os estudos de De Albuquerque et al. (2004), à medida que a cadeia da polianilina é reduzida ocorre a transição de seus estados oxidativos, com a mudança da forma base esmeraldina para a base leucoesmeraldina, ou de base esmeraldina para a pernigranilina. A Fig. 7 mostra um dos resultados para o espectro de absorção UV-Vis obtido pelo grupo (De Albuquerque et al., 2004), onde pode ser visto que à medida que a redução ocorre, vai diminuindo a intensidade da banda em 634 nm, atribuída à transferência de carga dos anéis benzênicos para os quinoidais, o que indica a transição entre os estados. O contrário acontece caso uma oxidação ocorra, como, por exemplo, na dopagem da PANI por um ácido, levando ao aparecimento de sua forma condutora, a base esmeraldina, levando a um aumento de intensidade da banda UV-Vis em 634 nm.

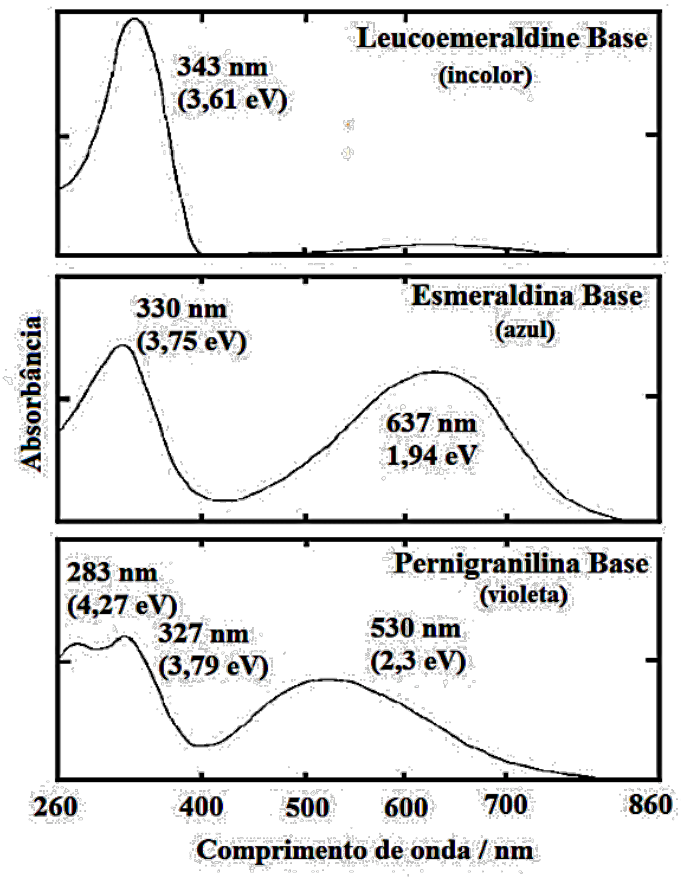
Figura 7 - Espectros de UV-Vis da PANI na forma de base esmeraldina à medida que pequenas quantidades de agente redutor são adicionadas. EB representa a base esmeraldina pura e R_1 – R_4 são as mudanças de absorbância devido a adição em etapas de pequenas quantidades de redutor.



Fonte: adaptado de DE ALBUQUERQUE et al. (2004).

De fato, ao investigar os diferentes estados oxidativos da PANI, Kang et al. (1998) observaram também a mudança da banda em torno de 630 nm, como mostrado na Fig. 8. Essa mudança se refere ou ao desaparecimento dessa banda ou um deslocamento da mesma para comprimentos de onda próximo de 530 nm, no caso da base prenigranilina, como mostrado na Fig. 8.

Figura 8 - Espectro de UV-Vis dos diferentes estados oxidativos da PANI.



Fonte: KANG et al. (1998).

A polimerização da anilina na presença de agente oxidantes fracos, como o nitrato de prata ($AgNO_3$), que tem potencial oxidativo de +0,80 V, foi investigado por Sapurina & Stejskal (2012). Nesse estudo, a polimerização é feita em diferentes valores de pH (2,5, 6 e 11). Nessas três faixas de pH, tanto o monômero quanto as cadeias em crescimento são desprotonados, possuindo baixo potencial de oxidação, ou estão presentes em estado protonado com alto potencial de oxidação (STEJSKAL, 2013). No curso da oxidação, o cátion de prata é reduzido para a prata metálica, que pode vir a formar compósitos com produtos poliméricos. É possível deduzir o mecanismo de síntese do compósitos de polianilina e nanopartículas de cobre com base nos resultados desse estudo e de outros em que diferentes agentes oxidantes fracos foram adotados, como Nascimento et al. (2011) e Santos et al. (2013) – que usaram o $HAuCl_4$ (ácido tetracloroáurico) – e de Bogdanovic et al. (2015) – que utilizaram um sal de cobre para a oxidação do monômero e formação da cadeia da PANI. Nesse último caso, a ideia geral da síntese é que o Cu^{+2} aja como agente

oxidante e provoque a oxidação da anilina, gerando a PANI e cobre metálico (Cu^0), como mostrado na Fig. 9. Nesses mecanismos, a redução do Cu^{+2} e a oxidação da anilina ocorrem ao mesmo tempo, o que leva à formação simultânea das nanopartículas de cobre e da polianilina. Sabendo que os diferentes estados oxidativos da PANI se formam de acordo com o valor do pH do meio, dois mecanismos podem ser propostos, um para o caso de meios de alta acidez (NASCIMENTO et al., 2011; SAPURINA & STEJSKAL, 2012; BOGDANOVIC et al., 2015) e outro para o caso de acidez média/baixa (SAPURINA & SHISHOV, 2012), como mostrado nas Figs. 10 e 11, respectivamente.

Figura 9 - Mecanismo geral de síntese do Compósito PAni/CuNPs.

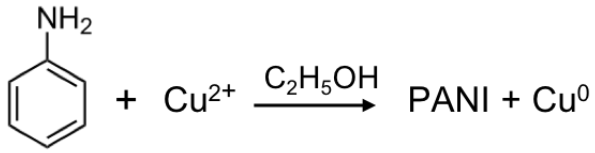
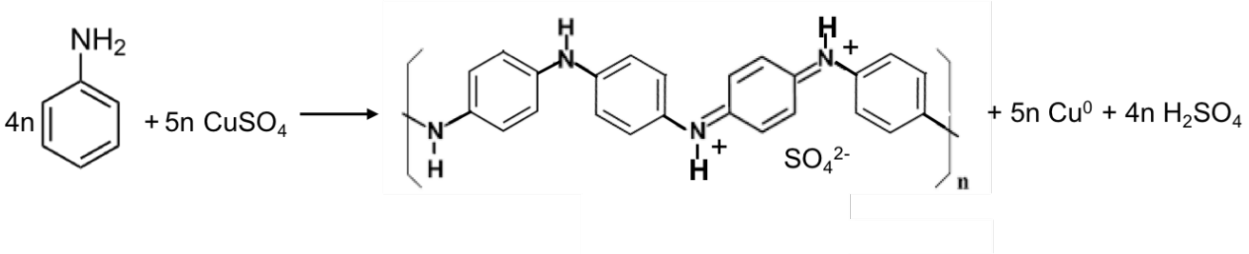
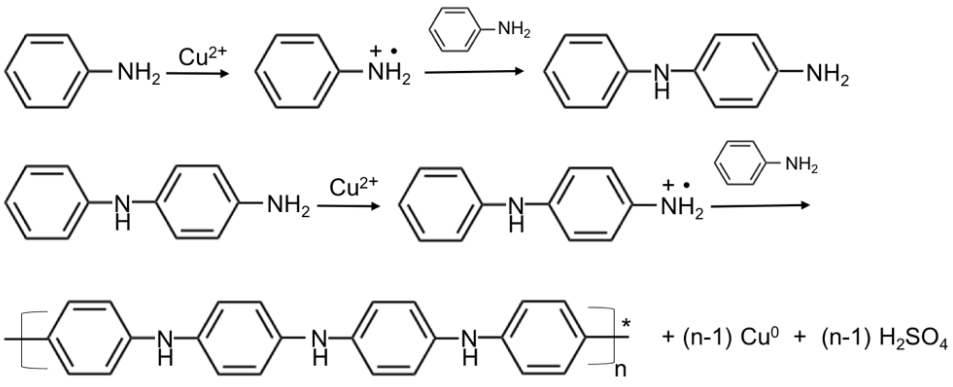


Figura 10 - Mecanismo de síntese do compósito PAni/CuNPs em meio de alta acidez.



Fonte: adaptado de NASCIMENTO et al. (2011) e BOGDANOVIC et al. (2015).

Figura 11 - Mecanismo de síntese do compósito PAni/CuNPs em meio de média e baixa acidez.

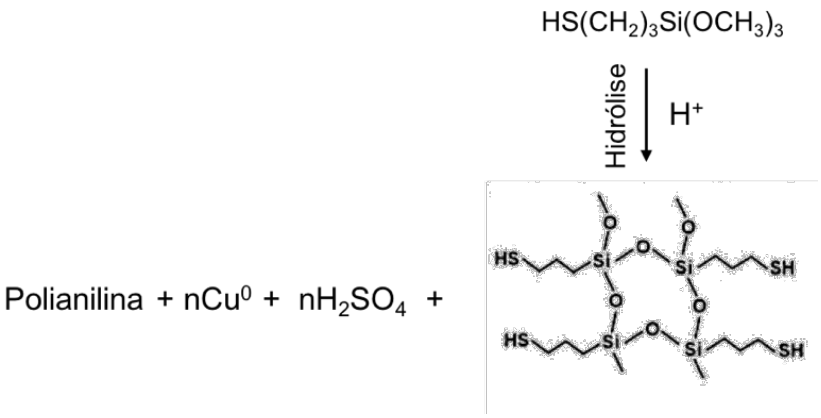


Fonte: SAPURINA & SHISHOV (2012).

Ao serem formadas, as nanopartículas de cobre se agregam devido a interações eletroestáticas (SANTOS, 2013). Desse modo, é preciso introduzir na síntese um agente de proteção para mantê-las separadas na forma de nanopartículas. Como discutido em DE MELO et al. (2009), Nascimento et al. (2011) e Santos et al. (2013), a presença de um agente estabilizante se faz necessária para que as nanopartículas metálicas sejam efetivamente dispersas dentro da matriz polimérica, pois os íons metálicos interagem fortemente com os grupos amina e são reduzidos no ponto de contato.

Compostos contendo grupos com terminal -SH, conhecido como tiol, são usados frequentemente como agentes estabilizantes de nanopartículas metálicas, por apresentarem forte coordenação com metais como o ouro (BERZINA, 2011; NASCIMENTO et al., 2011), prata (BATTOCCHIO et al., 2012) e o cobre (SHI et al., 2012; SABBAH et al., 2018). Na síntese usada neste trabalho, o 3-mercaptopropil-trimetoxisilane (MPTS, $HS(CH_2)_3Si(OCH_3)_3$) foi usado como agente protetor e para a estabilização das CuNPs formadas. Para isso, no entanto, é preciso antes promover a hidrólise do MPTS para obter os grupos tiol com cargas positivas livres na superfície, o que é feito pela presença de íons H^+ do meio, como mostrado na Fig. 12 (NASCIMENTO et al., 2011).

Figura 12 – Adição do agente estabilizante, MPTS, a síntese da PAni/CuNPs.



Fonte: adaptado de NASCIMENTO et al. (2011).

3.5 PLANEJAMENTO FATORIAL

Um dos problemas experimentais mais comuns é o de como determinar a maneira como uma ou mais variáveis (usualmente chamadas de fatores) influenciam sobre uma outra variável de interesse (a resposta). Os fatores são as variáveis controláveis, enquanto que as respostas, nas quais estamos interessados, representam a saída do sistema, são modificadas por alterações nos valores adotados para os fatores (BUTTON, 2005; VIANA & MEOLA, 2007). Ao saber como essa influência se dá, é possível otimizar a síntese de um componente pela obtenção da melhor variável resposta possível.

O planejamento dos experimentos, ou seja, a especificação detalhada de todas as operações experimentais que devem ser realizadas, vai depender do objetivo particular que o investigador quiser atingir. Através desse planejamento, é possível avaliar a influência de todas as variáveis experimentais de interesse e como essas interações influenciam na resposta, possibilitando assim obter de maneira mais rápida e eficiente a otimização máxima do sistema (TEOFILO & FERREIRA, 2006).

De acordo com Viana & Meola (2007), o uso de um planejamento experimental na realização de experimentos traz vantagens como:

- a redução do número de ensaios, sem prejuízo da qualidade da informação;
- o estudo simultâneo de diversas variáveis, separando seus efeitos;
- a determinação da confiabilidade dos resultados;
- a realização da pesquisa em etapas, num processo iterativo de acréscimo de novos ensaios;
- a seleção das variáveis que influem num processo por meio de um número reduzido de ensaios;
- a representação do processo estudado através de expressões matemáticas;
- a elaboração de conclusões a partir de resultados qualitativos.

Para estudar o efeito de qualquer fator sobre uma dada resposta é necessário fazer com que este varie de nível (isto é, de valor), sempre observando o resultado que essa variação produz sobre a resposta desejada. Para isso, é preciso que o fator esteja em ao menos dois níveis diferentes, de modo que o planejamento mais simples de todos é aquele em que todos os fatores são estudados em apenas dois níveis (NETO et al., 2001). Havendo k fatores sendo controlados, o planejamento de dois

níveis irá requerer a realização de 2x2x....x2 = 2^k ensaios diferentes, no chamado planejamento fatorial 2^k (NETO et al., 2001; TEOFILO & FERREIRA, 2006).

Normalmente, os níveis dos fatores quantitativos são nomeados respectivamente pelos sinais (–) e (+), para o nível mais baixo e para o nível mais alto, sendo que o realmente importante é a relação inicial entre o sinal dado e o efeito obtido, não existindo um critério definido para a nomeação dos sinais. A adoção desses sinais também permite esquematizar as variáveis na forma de matrizes de planejamento, as quais organizam as informações ligadas ao desenvolvimento de um planejamento fatorial por relacionar todas as combinações possíveis entre os níveis (EIRAS et al., 2000).

Quando o valor dos fatores é alterado para o nível baixo (-) ou para o nível alto (+), podem ser obtidos dois tipos de resposta: os efeitos principais e os efeitos de interação. O efeito principal, que é calculado como a média dos efeitos individuais, permite definir qual o efeito médio da variável examinada sobre as condições das demais variáveis. Já o efeito de interação é aquele causado no sistema devido a possíveis interações entre as variáveis, podendo ser de segunda, terceira ou ordem superior, a depender do número de fatores que estão sendo considerados (EIRAS et al., 2000). A partir da Tabela 2, onde se representa uma matriz de coeficiente de contraste para um planejamento fatorial 2^3, é possível observar os sinais dos efeitos de interação. Esses sinais, sejam de segunda ordem (X_{12}, $X_{13,}$ X_{23}) ou de ordem superior entre todas as variáveis, são obtidos através do produto dos sinais dos fatores (X_1, $X_{2,}$ X_3) para todas as combinações possíveis. A coluna da média na Tabela 2 representa o cálculo da média de todas as respostas observadas.

Tabela 2 - Matriz de coeficiente de contraste para um planejamento fatorial 2^3.

Variáveis				Interações			
Média	X_1	X_2	X_3	X_{12}	X_{13}	X_{23}	X_{123}*
+	-	-	-	+	+	+	-
+	+	-	-	-	-	+	+
+	-	+	-	-	+	-	+
+	+	+	-	+	-	-	-
+	-	-	+	+	-	-	+
+	+	-	+	-	+	-	-
+	-	+	+	-	-	+	-
+	+	+	+	+	+	+	+

* X_{123} é um efeito de 3ª ordem.

Fonte: Adaptado de TEOFILO & FERREIRA, 2006.

Para calcular os efeitos das colunas da matriz de coeficientes de contraste, podem ser utilizadas as equações

$$ef_{médio} = \frac{\sum_{i=0}^{n} y_i}{n} \quad , \qquad (9)$$

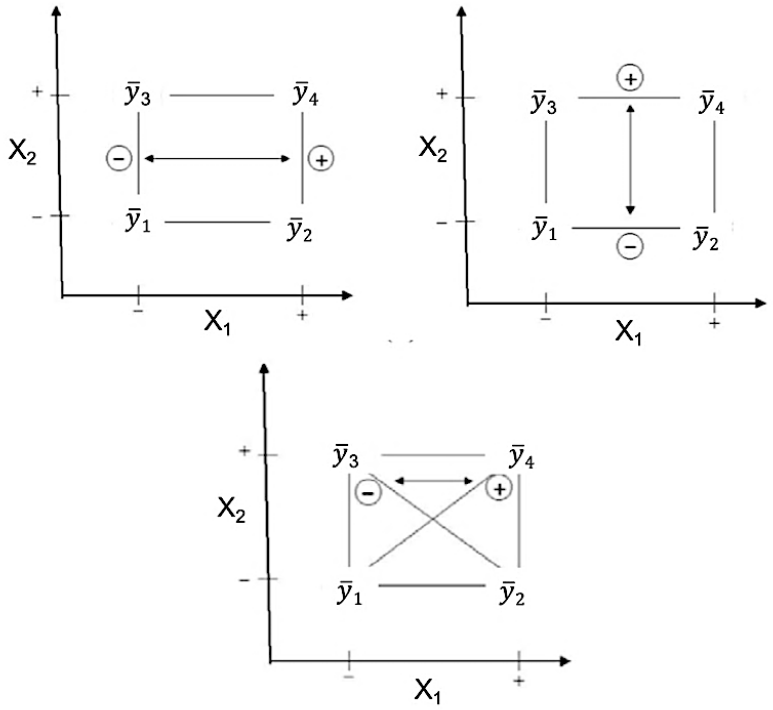
$$ef = \frac{\sum_{i=1}^{n/2} y_i^- - \sum_{i=1}^{n/2} y_i^+}{\frac{n}{2}} \quad , \quad (10)$$

onde n é o número de ensaios, y_i representa as observações individuais, usando $\bar{y}$, média das respostas, quando houver replicatas. Pela Eq. 9, pode ser calculado o efeito médio para a média de todas as observações, enquanto que a Eq. 10 permite determinar os efeitos para as variáveis e interações usando a diferença entre as médias das observações no nível mais, (yi(+)), e as médias das observações no nível menos, (yi(-)) (TEOFILO & FERREIRA, 2006).

Da mesma forma que os efeitos podem ser calculados, os mesmos podem ser interpretados geometricamente, permitindo uma representação do planejamento fatorial na forma de um sistema cartesiano, onde cada eixo corresponde a um fator. Para um planejamento fatorial simples 2^2, a interpretação geométrica dos efeitos é mostrada na Fig. 13. Como nesse caso se está lidando com apenas dois fatores, o

espaço definido por eles é um plano, com cada um dos quatro ensaios ocupando um vértice de um quadrado (VIANA & MEOLA, 2007).

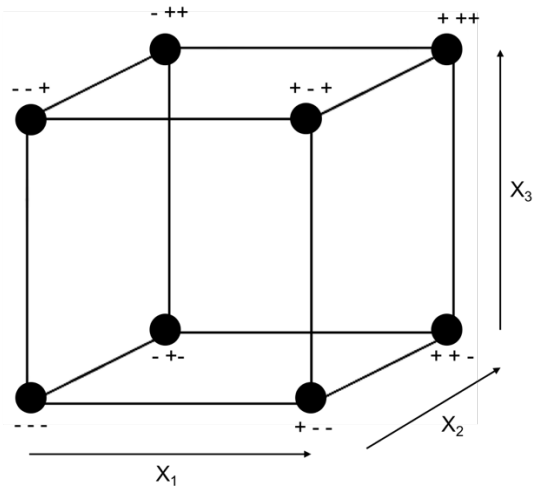
Figura 13 - Representação de interpretação geométrica dos efeitos para um planejamento experimental 2^2.



Fonte: adaptado de VIANA E MEOLA (2007).

A partir dessa representação, os efeitos principais podem ser obtidos como as diferenças médias entre os valores situados em arestas opostas e perpendiculares ao eixo do fator em questão. Já o efeito de interação é a diferença média entre valores situados nas duas arestas diagonais do quadrado, sendo considerada positiva a diagonal que liga o ensaio (- -) ao ensaio (+ +) (NETO et al., 2001). A Fig. 14, por sua vez, representa a interpretação geométrica dos efeitos para um planejamento fatorial 2^3, onde cada ensaio (são oito, ao todo) está associado a um vértice do cubo.

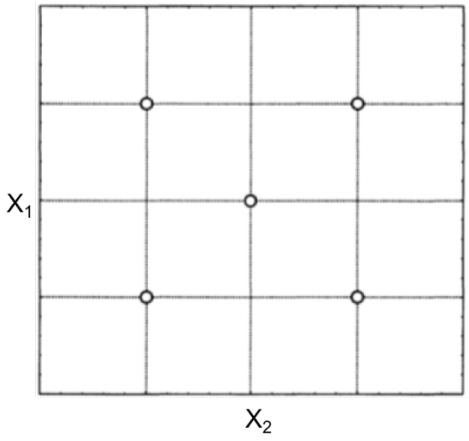
Figura 14 - Representação de interpretação geométrica dos efeitos para um planejamento experimental 2^3.



Fonte: VIANA E MEOLA (2007).

Outra análise importante, que permite aperfeiçoar o planejamento fatorial, é a investigação da superfície de resposta em torno das condições usuais de funcionamento do processo, de acordo com o mostrado na Fig. 15. Tal planejamento contém um ponto central, e por isso varre três níveis de cada fator, e não apenas dois. Assim, é possível verificar se há ou não falta de ajuste para um modelo linear, o que seria impossível caso apenas dois níveis tivessem sido usados. Em uma matriz de planejamento 2^2 com ponto central, por exemplo, são realizados sete ensaios, sendo três deles repetições no ponto central (NETO et. al., 2001).

Figura 15 - Planejamento fatorial de dois níveis com ponto central.



Fonte: (NETO et. al. 2001).

3.5.1 Estimativa do erro do experimento

Para se obter uma resposta confiável é necessário ter uma estimativa da incerteza associada aos valores obtidos pelos resultados de um experimento, porque cada uma das operações envolvidas no processo é sempre sujeita a erros, e todos esses erros irão se acumular, influenciando o resultado final. Assim, um resultado insatisfatório pode não ser culpa da amostra, e sim das variações inerentes ao procedimento analítico. O mesmo se pode dizer de um resultado aparentemente bom (BARLOW, 1989).

O erro experimental ocorre de forma aleatória e não pode ser controlado. Uma maneira de estimar esses erros e avaliar a significância estatística dos efeitos correspondentes é realizar os experimentos com repetições autênticas, chamadas de replicatas. Estas replicatas precisam refletir a variabilidade total do processo, para que os erros não pareçam menores do que realmente são. É importante que todas estas repetições sejam realizadas seguindo uma ordem totalmente aleatória, evitando assim distorções estatísticas que comprometam a qualidade dos resultados obtidos e dos efeitos calculados (NETO et. al. 2001).

Para estimar o conjunto da variância experimental de m ensaios diferentes repetidos n_i vezes, pode ser usada a relação

$$s^2 = \frac{v_1 s_1^2 + v_2 s_2^2 + v_m s_m^2}{v_1 + v_2 + \cdots + v_m} \quad , \qquad (11)$$

onde $v_i = n_i - 1$ é o número de graus de liberdade de s_i^2, o qual é a estimativa da variância do i-ésimo ensaio (NETO et. al. 2001).

3.6 CITOTOXICIDADE DA POLIANILINA, NANOPARTÍCULAS DE COBRE E MATERIAIS COMPÓSITOS

Devido a suas propriedades eletroquímicas favoráveis, alta condutividade e estabilidade ambiental e térmica, a polianilina (PANI) tem sido estudada em diversas aplicações, como na proteção contra corrosão, em supercapacitores, eletrodos analíticos ou biossensores (KUCEKOVÁ, 2013). Atualmente, tem crescido o interesse

de seu uso na biomedicina, incluindo áreas como engenharia de tecidos, estimulação celular e administração de fármacos (WANG et al., 2010; SNOOK, KAO & BEST, 2011). Entretanto, deve-se avaliar a biocompatibilidade de qualquer material que entre contato com um sistema biológico e organismos vivos para que seu uso possa ser considerado como adequado.

A citotoxicidade da PANI e seus derivados tem sido reportada em alguns estudos. Humpolíček et al. (2012), por exemplo, ao estudarem a biocompatibilidade da PANI, tanto em sua forma condutora como em sua forma de base esmeraldina, em termos de irritação dérmica, mostraram que a PANI em sua forma de base apresenta menor citotoxicidade. Já no trabalho de Li et al. (2014), a citotoxicidade de nanopartículas de PANI, preparada por polimerização rápida da superfície, foi estudada em macrófagos celíacos de camundongos, quando se concluiu que a PANI tem efeitos citotóxicos dependentes do tempo e da dose.

É geralmente descrito na literatura que o polipirrol apresenta melhor compatibilidade com sistemas biológicos do que a polianilina, o que refletido na prevalência de publicações relacionadas a aquele polímero. No entanto, há poucos estudos descrevendo as propriedades biológicas da PANI pura (HUMPOLÍČEK et al., 2012; KUCEKOVÁ et al., 2014; HUMPOLÍČEK et al., 2015), e essa escassez de estudos sugere ser importante investigar com mais detalhes essas propriedades para que aplicações biologicamente orientadas sejam consideradas. De fato, através de estudos comparativos de biocompatibilidade entre o polipirrol e polianilina, Humpolíček et al. (2018) demonstraram recentemente que, ao ser usada a mesma metodologia e ao ser levada em consideração a citotoxicidade básica usando fibroblastos e embriotoxicidade, a forma do polímero (sal versus base) é mais importante do que seu tipo (polipirrol versus polianilina). Esses resultados mostraram que a PANI na forma de base apresenta maior biocompatibilidade em relação a esses parâmetros.

Em relação as nanopartículas metálicas, vários estudos têm sido feitos sobre sua aplicação principalmente como biocidas (YOON et al., 2007; ANYAOGU et al., 2008; SCHRAND et al., 2010). A atividade antimicrobiana dessas nanopartículas se deve ao seu menor tamanho e à alta razão entre superfície e volume, ou seja, a grande área de superfície da nanopartícula aumenta sua interação com os micróbios melhorando o espectro de atividade biocida (INGLE et al. 2008). No trabalho de Ingle,

Duran & Rai (2013), por exemplo, nanopartículas de cobre demonstraram sua eficácia contra a vasta gama de bactérias patogénicas, fungos, algas e vírus. Entretanto, os autores concluem que o uso dessas nanopartículas em altas concentrações leva a uma citotoxicidade elevada e preocupante nos tecidos humanos.

O cobre pode ser considerado como um elemento destacado para o desenvolvimento de novos biomateriais. Durante séculos, uma de suas primeiras aplicações biológicas foi baseada em sua reconhecida capacidade antimicrobiana contra uma ampla gama de microrganismos (BORKOW & GABBAY, 2005; MUÑOZ-BONILLA & FERNÁNDEZ-GARCÍA, 2012).O cobre tem sido usado como purificador de água, algicida, fungicida, nematocida, moluscicida e agente antibacteriano e anti-incrustante (BORKOW & GABBAY, 2005). A vantagem do uso de partículas de cobre não se relaciona apenas com a sua eficácia antimicrobiana, mas também com a sua baixa toxicidade para os seres humanos, em comparação com outros metais biocidas, tais como o alumínio e o mercúrio (JAISHANKAR et al., 2014; PALZA et al., 2017).

Essa baixa toxicidade em relação a outros metais impulsionou o estudo de novos biomateriais baseados em cobre, sendo a aplicação mais estudada para suas nanopartículas a atividade antimicrobiana (RUPARELIA et al., 2008; REN et al., 2009). Além disso, as propriedades dessas nanopartículas podem ser processadas para diferentes matrizes poliméricas, permitindo o desenvolvimento de nanocompósitos polímero/cobre com uma ampla gama de bioaplicações (CIOFFI et al., 2005; PALZA, BIKIARIS & TRIANTAFYLLIDIS, 2013; QUIJADA & DELGADO, 2015).

No entanto, apesar do grande potencial dos biomateriais à base de polímero com nanopartículas de cobre, a toxicidade para as células de mamíferos desses compósitos foi pouco estudada. Isso é ainda mais importante ao ser considerada a toxicidade do cobre e de suas nanopartículas para as células, conforme relatado recentemente (GAETKE, 2003; CHEN et al., 2006; KARLSSON et al., 2013). É sabido que se a ingestão de nanopartículas de cobre exceder o limite máximo no corpo humano através de qualquer meio, seja por via oral ou nasal, surgem efeitos tóxicos no trato respiratório, no trato gastrointestinal e também em outros tecidos (Chen et al. 2006).

Neste contexto, os nanocompósitos poliméricos/metálicos emergem ainda mais como uma solução para a toxicidade de nanopartículas metálicas semelhante a metodologias baseadas em revestimentos orgânicos (MARTINEZ-GUITIERREZ et al.,

2013), uma vez que nestes compósitos a nanopartícula é incorporada na matriz. A exemplo disso, os estudos de Shiravand & Azarbani (2017) mostram que o uso das nanopartículas de cobre revestidas de fitoquímicos não levaria a uma diminuição da viabilidade celular de linfócitos humanos, quando tratados com uma concentração CuNPs de até 25 µg / mL. Esses estudos indicam que embora as CuNPs sejam tóxicas, sua citotoxicidade é reduzida ao serem revestidas por um material biocompatível, passando a ser viável seu uso em processos biológicos (PALZA et al., 2017).

4 METODOLOGIA

A síntese do compósito híbrido foi otimizada através da realização de um planejamento fatorial no qual estudou-se a influência dos reagentes na resposta da fluorescência, visando controlar sua intensidade. Após a obtenção de uma resposta ótima, várias técnicas foram usadas para caracterizar o material e comprovar sua composição. A fluorescência foi estudada através da espectroscopia de fluorescência, do cálculo de rendimento quântico relativo e do tempo de vida de fluorescência. Técnicas de espectroscopia no Ultravioleta e Visível (UV-Vis), espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), determinação do tamanho da partícula por espalhamento dinâmico de luz (DLS), Potencial Zeta, Espectroscopia Eletroquímica de Impedância e Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) foram usadas para investigar química e fisicamente o compósito. Finalmente, foram realizados os ensaios de citotoxicidade do compósito frente a diferentes tipos de células de mamíferos.

4.1 PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3

A otimização da fluorescência foi feita utilizando um planejamento fatorial 2^3 de acordo com o proposto por Neto et al. (1995). Estudou-se o efeito de três variáveis (fatores) sendo elas a concentração do sal de cobre – $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (sulfato de cobre penta-hidratado), da anilina (ANI), e do agente estabilizante, o 3-mecaptopropil trimetoxisilano (MPTS). Para cada fator, dois níveis foram atribuídos, sendo o menor representando a menor concentração (-) e um maior a maior concentração (+), como pode ser visto na Tabela 3. Volumes definidos de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, mostrados na Tabela 3, foram adicionados ao sistema a partir de uma solução mãe de concentração de 0,15 mol/L.

Tabela 3 - Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial para a síntese do compósito de PANI/CuNPs.

Fatores	Volume adicionado (µL) Nível (-)/(+)	Concentração Nível (-)/(+)
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	18,0 – 36,0	0,26 – 0,53 (mmol/L)
Anilina	14,0 – 28,0	0,0153 – 0,031 (mol/L)
MPTS	50,0 – 100,0	0,027 – 0,054 (mol/L)

No planejamento fatorial, todas as possíveis combinações desses dois níveis foram realizadas de acordo com o mostrado na Tabela 4, onde é possível analisar como o resultado da fluorescência é afetado por cada fator, totalizando 8 experimentos, os quais foram feitos em triplicata. Os valores dos níveis dos fatores foram escolhidos de acordo com trabalhos realizados anteriormente por este grupo de pesquisa e utilizados nos trabalhos de Santos et al. (2013) e Alves et al. (2013), com diferenças no tipo de sistema obtido, que nos casos mencionados foram compósitos de PANI/Au.

Tabela 4 - Matriz de planejamento fatorial 2^3 para a síntese do compósito de PANI/CuNPs.

Experimento	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Anilina	MPTS
1	-	-	-
2	-	-	+
3	-	+	-
4	-	+	+
5	+	-	-
6	+	-	+
7	+	+	-
8	+	+	+

Utilizou-se o software Statistica 6.0 (Statsoft, EUA) para a análise estatística dos dados, o que permitiu obter a matriz de planejamento, matriz de coeficiente de contraste, cálculos para estimativa dos efeitos, cálculos para estimativa do erro e construção dos gráficos.

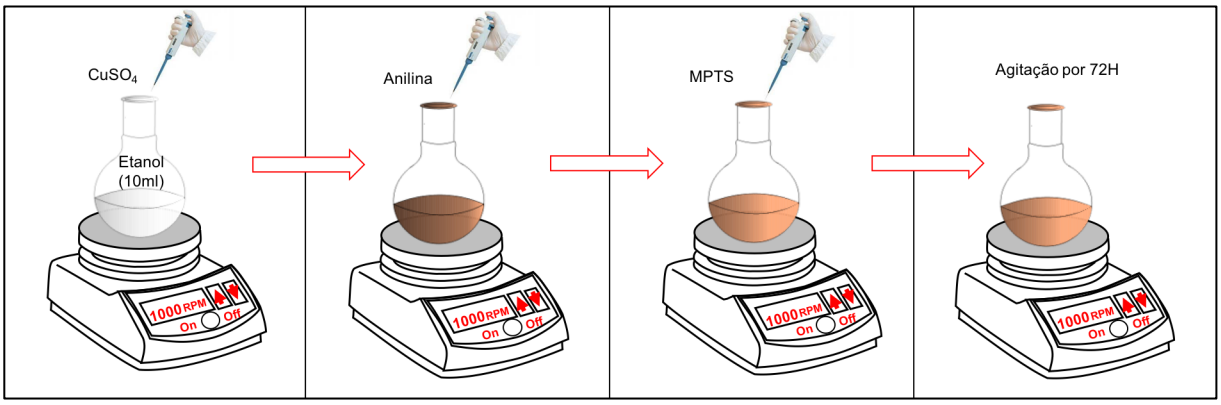
4.2 MATERIAIS

O sulfato de cobre ($CuSO_4$•$5H_2O$), MPTS ($C_6H_{16}O_3SSi$) e o ácido tetracloroáurico ($HAuCl_4$•H_2O) foram adquiridos da Sigma Aldrich (EUA). A anilina P.A. (C_6H_7N) foi fornecido pela empresa brasileiras Nuclear e o etanol (C_2H_6O) pela Química Moderna (Brasil). Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico, não havendo a necessidade de purificação adicional, com exceção da anilina, que foi destilada sob pressão reduzida antes do uso e armazenada em cerca de 4°C. Em todos os experimentos utilizou-se água deionizada obtida a partir de um sistema de purificação Synergy (Millipore, EUA). Quando necessário, o pH das soluções do compósito PANI/Cu foi ajustado pela adição de quantidades apropriadas de hidróxido de sódio (NaOH – Reagen, Brasil) e ácido clorídrico (HCl – Quimex, Brasil).

4.3 SÍNTESE DO COMPÓSITO PANI/Cu

Para a síntese do compósito usou-se três reagentes, sulfato de cobre, anilina e MPTS que foram misturados em 10 mL de etanol em um balão de fundo redondo de 20 mL em todas as proporções prescritas nas Tabelas 3 e 4. Os reagentes foram adicionados ao álcool em sequência, com auxílio de uma pipeta automática, iniciando-se com o sulfato de cobre, seguido da anilina e finalizando-se com a adição de MPTS. Essa mistura foi mantida sob agitação com uma barra magnética a temperatura ambiente durante 72h. A Fig. 16 ilustra as etapas de preparação do compósito PANI/Cu.

Figura 16 - Esquema de preparação do compósito PANI/Cu.



Sabendo que a PANI possui diferentes estados oxidativos que dependem do pH do meio, a síntese do compósito também foi feita em faixas de pH's mais ácidos (pH de 4 a 3), usando-se o mesmo planejamento fatorial mostrado anteriormente. Nesta síntese, todos os procedimentos descritos anteriormente foram seguidos, porém antes da adição da anilina e MPTS foram adicionados cerca de 200 µL de HCl a 1 molar no meio reacional etanol + $CuSO_4$. A síntese sem adição de ácidos, representada na Fig. 16, ocorre em pH neutro, de aproximadamente 6,5. Ao fim da síntese os compósitos permanecem em solução em etanol. Além disso, a ordem de adição dos reagentes é importante e deve ser respeitada, uma vez que, a mudança dela gera produtos distintos do desejado.

4.4 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

4.4.1 Espectroscopia de absorção na região do uv-vis

Os espectros de absorção na região do UV-Vis das soluções diluídas (2:1000 v/v) foram obtidos no intervalo de 185 nm a 800 nm, com a utilização de uma cubeta de quartzo com percurso ótico de 1,0 cm, em um espectrofotômetro UV-2600 (Shimadzu, Japão).

4.4.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (FTIR)

Para as análises de FTIR usou-se o espectrofotômetro 4600 (Jasco Corporation, Japão), com resolução de 4 cm^{-1}, em um intervalo de frequência de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} e equipado com acessório Pro One de Reflexão Atenuada (ATR), usando um cristal de ZnSe, com ângulo de incidência central de 45° e uma área de contato circular de 4,9 mm^2. As amostras foram analisadas em solução em etanol com a concentração que foram sintetizadas.

4.4.3 Espectroscopia de fluorescência

As medidas de Fluorescência de emissão foram realizadas em um espectrofotômetro de fluorescência, FluoroLog-3 (Horiba, EUA), sendo obtidas em uma faixa de emissão de 300 nm – 800 nm. As varreduras de excitação foram feitas na faixa de comprimentos de onda entre 290 nm – 400 nm, com a abertura das fendas

de excitação e emissão de 3 mm e o passo de 1 nm para as varreduras. Para isso, foram utilizadas cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, com as medidas sendo coletadas à temperatura ambiente (24°C). Os resultados do tempo de vida também foram obtidos como o FluoroLog-3 (Horiba, EUA) e calculadas através dos programas DAS6 Analysis e DataStation, usando como referência o Ludox (Solução coloidal de sílica (SiO_2) - Sigma Aldrich) diluído a 0,02%.

4.4.4 Rendimento quântico relativo de fluorescência

O Rendimento Quântico relativo foi obtido utilizando-se o método comparativo proposto por Willians et al. (1983), que envolve um corante de rendimento quântico conhecido como padrão de cálculo. O corante usado foi o sulfato de quinina ($C_{20}H_{24}N_2O_2 \cdot 0.5H_2O_4S \cdot H_2O$ – Sigma Aldrich), que apresenta um φ_f de 52 ± 2 % em água (BROUWER, 2011). O procedimento do método consiste em registrar os espectros de fluorescência e absorção no mesmo comprimento de onda que foi utilizado para fazer as excitações nas medidas de fotoluminescência, em todos os casos foi utilizado 300 nm e 350 nm. Foram medidas no mínimo cinco valores de absorbâncias diferentes na faixa de $0,01 \leq x \leq 0,1$. Como é uma relação linear, plotou-se um gráfico da área integrada de fotoluminescência versus absorbância e com os pontos obtidos foi feito um ajuste linear dos dados.

Em todos os experimentos o quadrado do coeficiente de correlação (r^2) foi maior do que 0,95. Para calcular o rendimento quântico utilizou-se a relação

$$\varphi_f = \varphi_{ref}\left(\frac{Grad_x}{Grad_{ref}}\right)\left(\frac{\eta_x^2}{\eta_{ref}^2}\right) \quad , \quad (12)$$

onde os sobrescritos *x* e *ref* representam amostra e padrão de referência, O termo Grad se refere ao coeficiente de angular obtido das curvas, η é o índice de refração do meio, e φ é o rendimento quântico.

Como as soluções utilizadas são muito diluídas pode-se afirmar que o índice de refração da mesma é praticamente igual ao do solvente puro. Uma vez que o solvente foi o mesmo em todas as determinações, o termo do segundo parêntese pode ser simplificado para facilitar os cálculos.

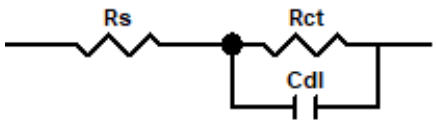
4.4.5 Determinação do tamanho de partícula e do potencial zeta

O tamanho médio das partículas do compósito PANI/Cu foram determinados no equipamento Zetasizer NANO-2590 (Malvern Instruments, Reino Unido), onde foram feitas medidas de espalhamento de luz dinâmico, com um laser (λ = 633 nm) sob ângulo de espalhamento de 90° e temperatura de 25°C. Já o potencial zeta (ζ) foi determinado variando o pH do compósito em uma faixa de 2 – 11 usando o equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Co., EUA) através de medidas da mobilidade eletroforética.

4.4.6 Espectroscopia eletroquímica de impedância

As medidas de Espectroscopia Eletroquímica de Impedância foram feitas seguindo procedimento experimental realizado anteriormente por de Lima, de Oliveira e de Melo (2016). Nele, 1 mL de dispersões de PANI/Cu (Amostra 7 (+ + -)) sob diferentes pHs, foram colocados no porta amostra 12962ª (DE LIMA, DE OLIVEIRA & DE MELO, 2016), com disposição de eletrodo na forma de placas paralelas e cujo eletrodo inferior foi substituído para receber líquidos. As medidas foram realizadas sob a tensão de 100mV e varrendo a frequência de 10^6 até 0,1 Hz.

Os resultados inicialmente foram plotados no gráfico de Nyquist (Impedância Real x Impedância Imaginária) (LVOVICH, 2012). Conforme pode ser observado inicialmente, o resultado de quase todas as medidas possuía o comportamento de um semicírculo, sendo os gráficos que possuem este comportamento bem modelados pelo circuito de Randles (BARSOUKOV & MACDONALD, 2005) mostrado a seguir:



Cada um dos elementos deste circuito possui significado físico, os quais são:

- Rs – resistência de contato;
- Rct – resistência de transporte de carga
- Cdl – capacitância de dupla camada

Entretanto, ao tentar encontrar os melhores parâmetros, percebeu-se a necessidade de trocar o capacitor por um elemento de fase constante. Este elemento nada mais é que um capacitor real, com “defeitos”. A impedância deste elemento é dada na forma

$$Z = \frac{1}{Q(jw)^{\alpha}} \quad . \quad (13)$$

Assim, utilizando o software ZView2, foi realizado o ajuste de cada curva, isto é, foram procurados os melhores valores de cada elemento para se adequar aos resultados de impedância de cada gráfico. No software, não é apresentado apenas o gráfico de Nyquist, também são apresentados o gráfico de Bode (LVOVICH, 2012) (Frequência x Impedância total e Frequência x Ângulo de Fase). Apesar da curva obtida em alguns gráficos não sobreporem os pontos 100% no gráfico de Nyquist, os valores como todo foram otimizados a fim de atender todos os possíveis gráficos (as medidas são como um todo).

4.4.7 Microscopia eletrônica de transmissão (met)

As micrografias de transmissão para visualização das nanoestruturas do compósito PANI/Cu foram obtidas pelo uso de um microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai Spirit 120 kV (FEI, EUA). Para isso, as amostras foram antes depositadas sobre uma grade de cobre 400 mesh, revestida com carbono.

4.4.8 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade do compósito PANI/Cu foi determinada conforme a metodologia descrita na literatura (ARANDA-SOUZA et al., 2018), com exceção a algumas modificações relativas ao tipo de macrófagos e às soluções usadas para a solubilização. Para a análise da citotoxicidade dois modelos celulares foram usados: o macrófago[2] J774 (ATCC® TIB-67TM), células Vero[3] (ATCC® CCL-81TM).

[2] Os macrófagos, células do sistema de defesa, são responsáveis pela fagocitose de antígenos que não sejam próprios do organismo, atuando em nível sistêmico (LIMA, 2019).
[3] As células VERO são células epiteliais renais que se localizam nos rins, órgãos responsáveis pela excreção de metabólitos passíveis de toxicidade (LIMA, 2019).

As células Vero e J774 foram plaqueadas (na concentração de 5 x 10^5 células por poço) em uma placa de 96 poços contendo 100 µL de meio de cultura RPMI – sistema tampão contendo aminoácidos e vitaminas que nutrem as células (MOORE & WOODS, 1977) – suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF), e foram incubadas por 3 horas a 37ºC em uma atmosfera de 5% de CO_2, para que ocorresse a adesão no poço.

Após o término do período de adesão, as células foram lavadas com o meio de cultura, sendo em seguida realizado o tratamento com diferentes concentrações do compósito PANI/Cu (500 a 31,2 µg/mL) por 24 horas. Concluído o período de incubação, o meio de cultura foi substituído por uma solução de MTT a 0,5 mg/mL com 100 µL por poço. O ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é usado para avaliação da viabilidade celular. Quando incubados com células vivas, o MTT reage com enzimas mitocondriais transformando-se de um composto amarelo em um outro de cor púrpura (Formazan). Uma vez solubilizados, esses cristais resultantes serão então o indicativo da viabilidade celular.

A placa foi incubada por 3 horas, a 37ºC com atmosfera de 5% de CO_2, para a formação dos cristais de Formazan. Uma vez verificada a ocorrência da reação, os cristais de Formazan foram solubilizados através de uma solução de isopropanol com 1% de HCl. O produto colorimétrico foi então submetido a uma análise espectrofotométrica no comprimento de onda de 570 nm (Bio-Rad®, Califórnia, EUA). Foram realizados dois experimentos independentes desse tipo, em quadruplicata.

4.4.9 Análise estatística do ensaio de citotoxicidade

Os valores das absorbâncias coletadas do ensaio de citotoxicidade foram analisados pelo uso do programa SPSS 18.0 (IBM, EUA), pela avaliação da regressão linear e determinação da concentração citotóxica de 50 % (CC_{50}), aquela para a qual a viabilidade celular é reduzida em 50%. A significância foi definida a partir de valores de $p < 0,05$, no qual foram considerados o teste de ANOVA e o Pós-teste de Dunnett no GraphPadPrism 5.0 (Graphpad, Califórnia, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As amostras do compósito PANI/Cu foram sintetizadas de acordo com a metodologia descrita na Seção 4.3, baseando-se nas composições estabelecidas no planejamento fatorial mostrado na Tabela 4. Oito produtos diferentes foram obtidos pela variação controlada das concentrações dos reagentes $CuSO_4$, Anilina e MPTS. As oito amostras possuem coloração amarelada com intensidades distintas a depender da concentração dos reagentes. Todos os 8 sistemas que não tiveram seus pHs ajustados durante a síntese possuem pH de aproximadamente 6,5 (neutro). Os compósitos foram mantidos na solução de Etanol da síntese e foram submetidos a análises iniciais para definir o melhor sistema em termos de fluorescência.

5.1 UV-Vis

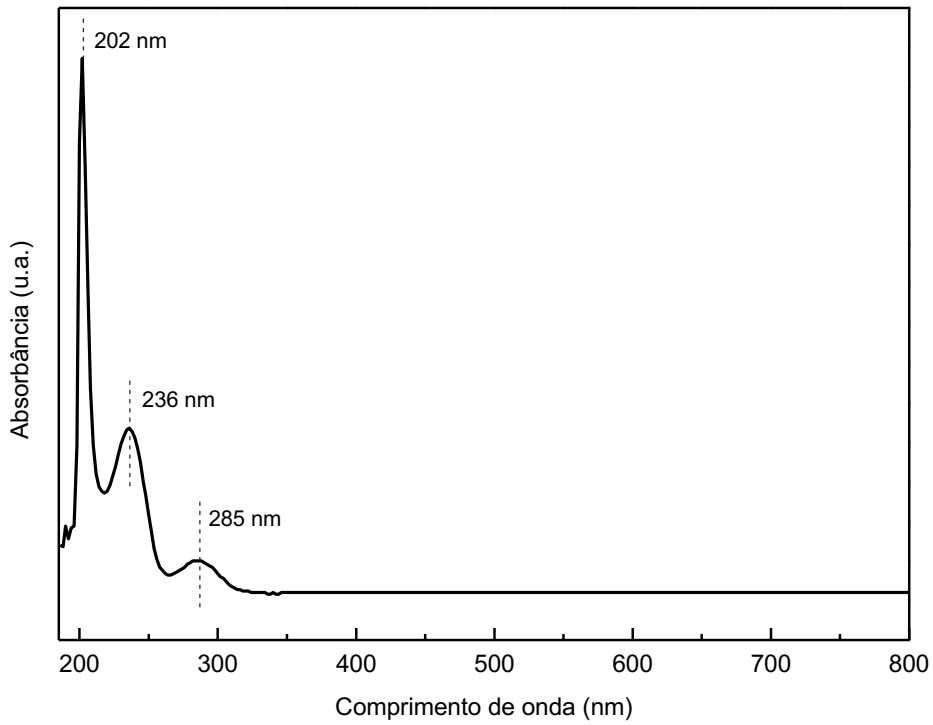
Medidas de UV-Vis foram feitas para avaliar se, para cada um dos diferentes produtos, teria de fato ocorrido a formação da polianilina, e em qual estado oxidativo ela se encontraria. Os resultados de UV-Vis dos oito produtos foram muito semelhantes, apresentando apenas mudanças de intensidade, sendo representados pela Fig. 17 através da Amostra A1 (- - -).

A presença do compósito PANI/Cu pode ser confirmada pelo surgimento das bandas características da polianilina no UV-Vis, em especial aquelas referentes às bandas de transição π-π* dos anéis benzenóicos (~300 - 360 nm), pólaron-π* (~366 - 440 nm) e π-pólaron (éxciton molecular) (~700nm – 800nm) (Neoh et al., 1993; KINYANJUI & HATCHETT, 2004; IOLE et al., 2013), relacionadas com a presença do polímero em seus diferentes estados de oxidação (NEOH et al., 1993; STEJSKAL & KRATOCHVFL, 1993; IOLE et al., 2013), assim como a banda característica dos plásmons de superfície (PS) das CuNPs que, segundo Bogdanovic et al. (2015), ocorre em aproximadamente entre 560 – 570 nm.

O espectro UV-Vis do compósito PANI/Cu da Amostra A1 (- - -) obtido neste trabalho pode ser visto na Fig. 17. Nele, é possível observar o aparecimento de três bandas principais, situadas em 202 nm, 236 nm e 288 nm. Sabe-se (KINYANJUI & HATCHETT (2004) e ABDULLA et al. (2015)) que a formação do compósito, devido

às interações entre a PANI e as nanopartículas do metal, ocasiona um deslocamento dos picos característicos do polímero. Assim, podemos associar o pico 288 nm às transições π- π*, que seria na região do azul, deslocado em comparação com a PANI encontrada na literatura (ABDULLA et al., 2015), o que sugere a interação entre PANI e Cu. No entanto, nos espectros de UV-Vis, referente aos 8 produtos, não foi possível observar a banda característica das CuNPs referente ao plásmons de superfície, o que pode ser devido à redução da intensidade de absorção pela presença da PANI circundante e pela baixa concentração do metal no meio. Este resultado sugere ainda que as CuNPs foram eficientemente adsorvidas na estrutura da PANI (XIAOMIAO et al., 2006).

Figura 17 - Espectro de UV-Vis do compósito de PANI/Cu em pH neutro da amostra A1 (- - -).

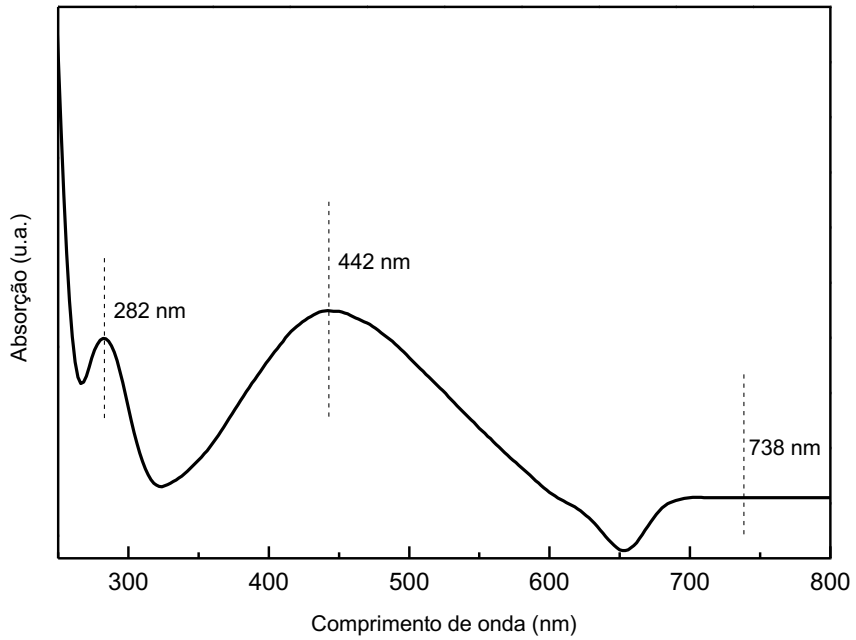


Percebe-se que na Fig. 17 não está presente a banda característica da PANI condutora, em sua forma de sal esmeraldina, que deveria ocorrer na região ~ (700 – 800) nm. Isso sugere que a síntese realizada em pH neutro não gerou a PANI condutora, tendo possivelmente resultado no polímero em sua forma de base leucoesmeraldina, de acordo com os mecanismos apresentados em SAPURINA &

SHISHOV (2012). Kobayashi et al. (1984) relatam que a transição π - π* da leucoesmeraldina ocorre em cerca 305 nm e Huang e MacDiarmid (1993) mostram que pode ocorrer um deslocamento para o azul, em cerca de 298 nm devido a mudança do pH, o que confere com o pico em 288 nm da Fig. 17. Ambos os trabalhos revelam espectros da leucoesmeraldina que se assemelha muito com o mostrado na Fig. 17. Outra explicação para esse resultado seria que a quantidade de PANI formada foi muito pequena e sua absorção na faixa ~700 – 800 nm não pode ser detectada pelo equipamento.

A mesma síntese foi feita ainda em um pH < 2, que foi ajustado no início da síntese, antes da adição da anilina. No espectro UV-Vis mostrado na Fig. 18 é possível observar as bandas características do polímero em sua forma condutora.

Figura 18 - Espectro de UV-Vis do compósito de PANI/Cu da amostra A1 (- - -) em pH < 2.



5.2 FTIR

Os espectros de infravermelho por transformada de Fourier dos compósitos de PANI/Cu são mostrados na Fig. 19 para as amostras com as menores (- - -) e as maiores (+++) concentrações dos fatores. Ambos os espectros apresentam os picos mais característicos da polianilina, situados em 3320, 2970, 1650, 1454, 1384, 1250,

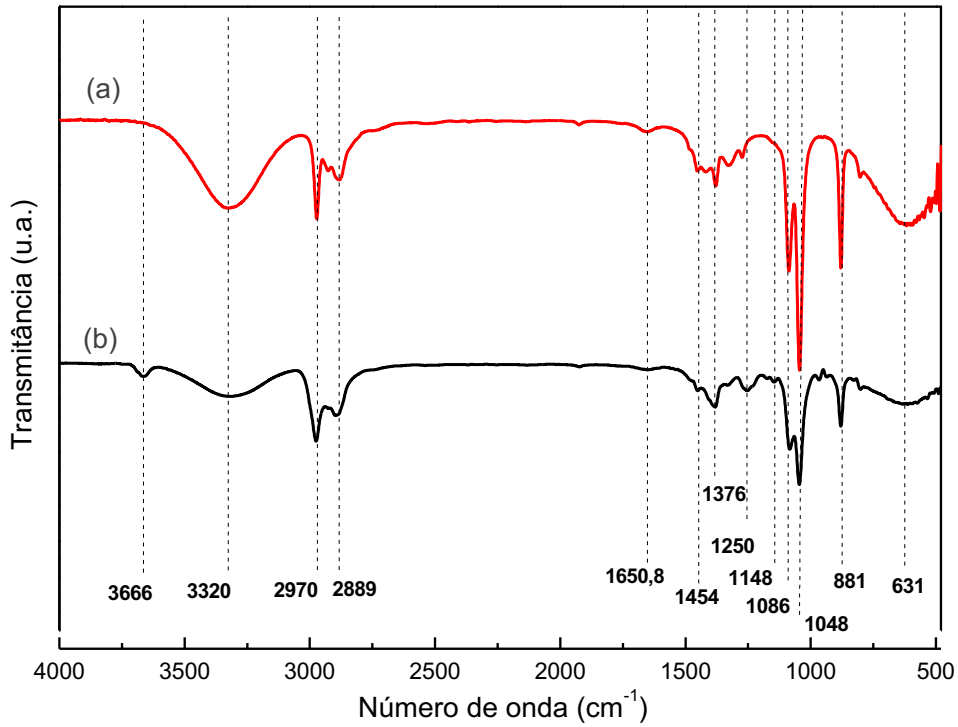
1148 e 881 cm^{-1}, que são semelhantes ao PANI padrão relatado na literatura (STEJSKAL & TRCHOVÁ, 2012; IBRAHIM, 2013). A banda que pode ser observada próxima a 1650 cm^{-1} corresponde mais provavelmente a vibrações N-H em amostras aromáticas (STEJSKAL & TRCHOVÁ, 2012).

O espectro da PANI em sua forma de base esmeraldina exibe uma banda típica próxima a 1376 cm^{-1}, atribuída a vibrações de estiramento C-N na vizinhança de um anel quinóide. Deve ser notado, porém, que a banda em torno de 1590 cm^{-1}, relativa à deformação quinoidal, não está presente, e apenas uma banda em 1454 cm^{-1}, referente à deformação benzenóica, é observada, o que reforça a ideia de que durante a síntese a PANI não teria sido obtida em sua forma condutora, de modo que apenas a estrutura benzenóide reduzida estaria presente. A banda de absorção em 1250 cm^{-1} corresponde à vibração de alongamento C-N em um agrupamento B-NH-B-NH-B (onde B é o anel benzênico), enquanto que a banda em 1148 cm^{-1}, que é melhor visualizada na amostra (+++), pode estar associada tanto ao modo N=Q=N (onde Q é o anel quinóide) quanto à deformação aromática C-H no plano (STEJSKAL & TRCHOVÁ, 2012; IBRAHIM, 2013;).

Por sua vez, as bandas de absorção mais intensas observadas em 1086 e 1048 cm^{-1} podem ser atribuídas tanto à deformação no plano da ligação C-H dos anéis aromáticos (SANTOS et al., 2013) como ao alongamento assimétrico de Si-O-C e Si-O-Si, respectivamente, referente à presença do MPTS (ZHENG et al., 2016). A proeminente banda em 881 cm^{-1} é associada às vibrações de flexão fora do plano C-H dos dois átomos de hidrogênio adjacentes a um anel benzeno 1,4-dissubstituído, como reportado por SANGAMESHA, PUSHPALATHA & SHEKAR (2014), e pode-se atribuir a banda de absorção em 631 cm^{-1} à vibração dos anéis de benzeno monosubstituído (NEOH, KANG & TAN, 1993).

A região de absorção acima de 2500 cm^{-1} também traz informações importantes sobre as ligações do hidrogênio na polianilina. Um único pico em 3320 cm^{-1} pode ser associado à ligação do hidrogênio relacionada ao estiramento N-H, associado, em aminas secundárias (NEOH, KANG & TAN, 1993), enquanto o pico em 2970 cm^{-1} diz respeito ao estiramento simétrico e assimétrico de C-H de carbono terciário.

Figura 19 - Espectro do FTIR do compósito PANI/Cu na região de 500 a 4000 cm^{-1} das amostras (a) A8 (+++) e (b) A1 (- - -).



5.3 PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3

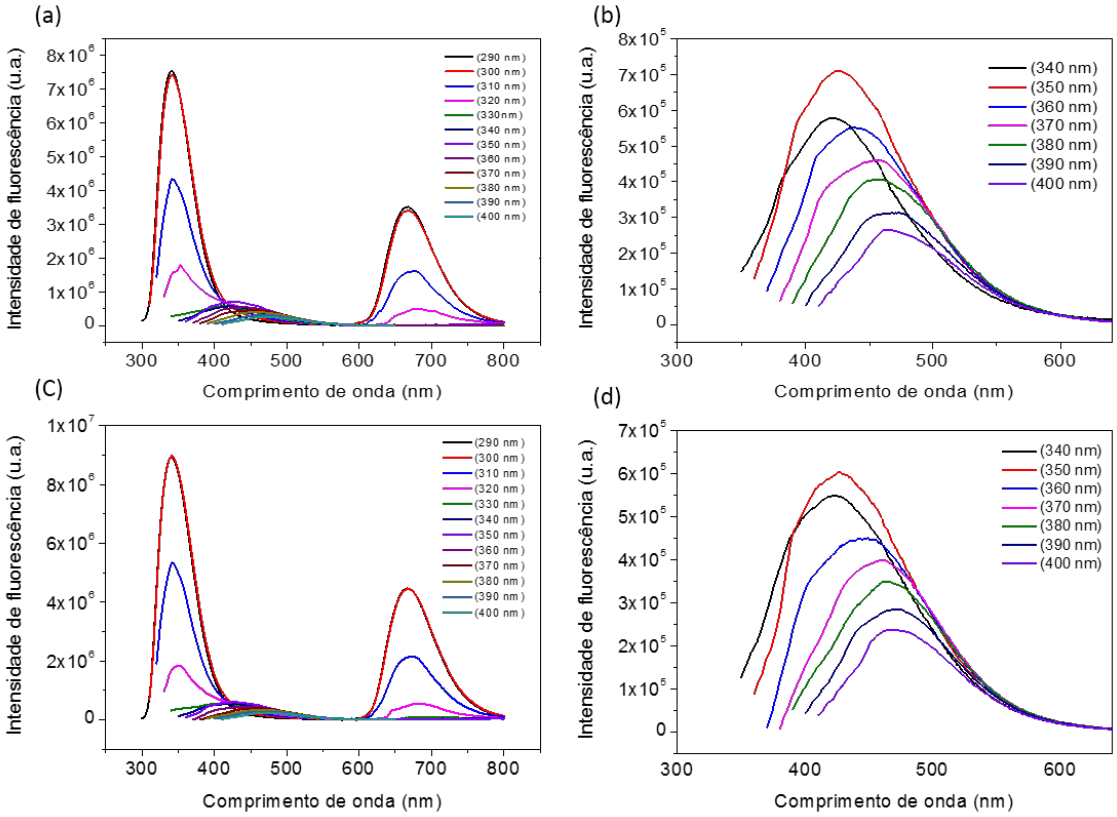
5.3.1 Fluorescência

A fluorescência também foi medida para os oito produtos listados na Tabela 4, e com o auxílio do software Statistica 10 (Statsoft, EUA) avaliamos quais seriam os fatores mais importantes para uma maior intensidade de fluorescência do compósito, e em quais proporções eles contribuiriam para isso. O compósito PANI/Au (SANTOS et al., 2013) também foi sintetizado e analisado estatisticamente para fins comparativos, a fim de estudar como diferentes metais contribuem para a fluorescência do compósito dadas as mesmas condições de síntese.

A fluorescência foi estudada nas faixas de comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) de 290 a 400 nm, com incrementos de 10 nm. Os resultados foram obtidos na faixa de comprimento de onda de emissão (λ_{emi}) entre 300 a 800 nm. Os espectros emissão de fluorescência correspondentes as amostras A1(---) e A8(+++), tanto para o compósito PANI/Cu, quanto para o PANI/Au, podem ser vistos nas Figs. 20 e 21,

respectivamente. A partir da análise dos espectros obtidos das amostras A1 e A8, é possível identificar a existência de um padrão na fluorescência dos compósitos PANI/Cu e PANI/Au. Em ambos os casos, para excitações com comprimento de onda de 290, 300, 310 e 320 nm dois picos de fluorescência, com máximos em aproximadamente 342nm e em 666 nm, podem ser observados, enquanto que esses picos desaparecem para uma excitação em comprimentos de onda maiores que 330 nm, dando lugar a uma resposta de emissão com um único pico, com máximos que variam entre λ_{emi} = 425 – 485 nm.

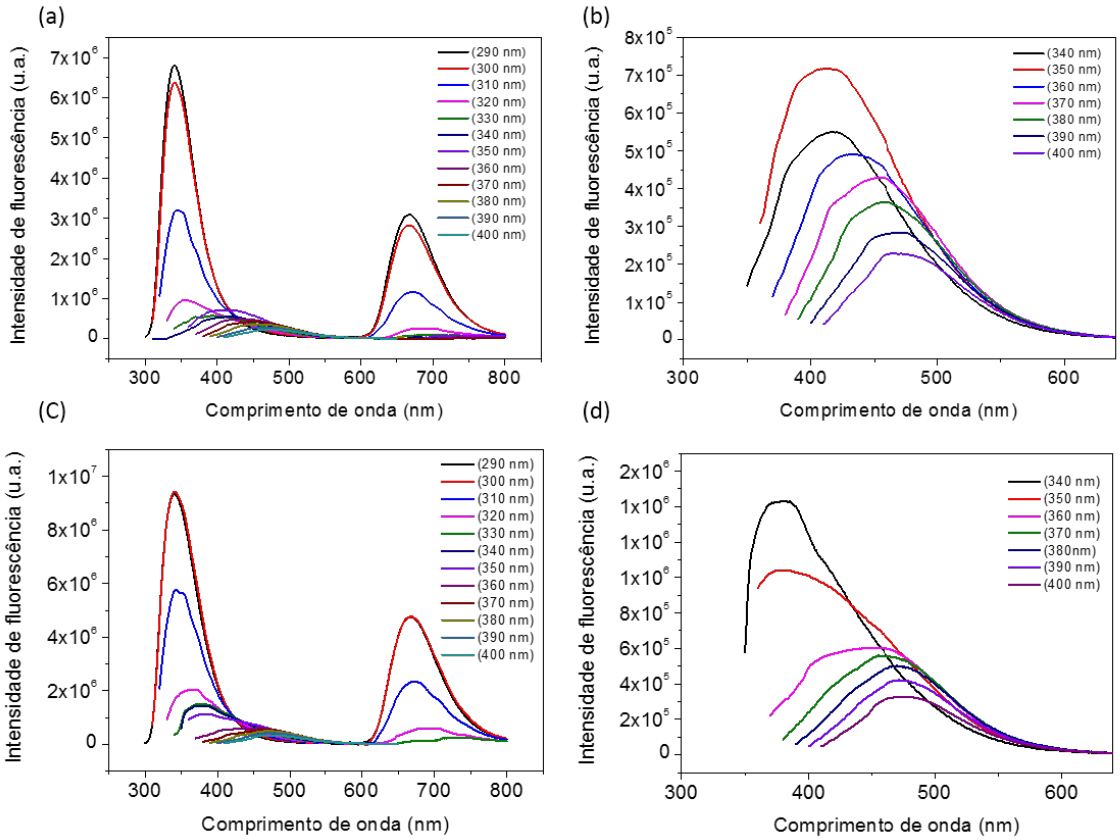
Figura 20 - Intensidade de fluorescência do compósito PANI/Cu nas faixas de excitação entre 290 a 400 nm para (a) amostra A1 (- - -) e (c) amostra A8 (+++), e entre 340 a 400 nm para (b) amostra A1 (- - -) e (d) amostra A8 (+++).



Pela análise dos resultados mostrados das Fig. 20 e 21, é possível perceber visualmente que a maior resposta de fluorescência é obtida quando o compósito é excitado entre 290 e 300 nm. Isso foi testado pelo uso de um recurso do equipamento FluoroLog-3, juntamente com o software FluorEssence V3.8, o que nos permitiu determinar que o melhor comprimento de onda para excitação corresponde a λ_{exc} = 298 nm. Por essa razão, no presente trabalho passamos a analisar a fluorescência do material para uma excitação com λ_{exc} = 300 nm. No entanto, para avaliar uma maior

aplicabilidade das propriedades fluorescente do compósito PANI/Cu, a resposta para uma excitação em λ_{exc} = 350 nm foi também estudada, uma vez que nesse caso a fluorescência resultante é da ordem de 10^5 (u. a.) (na faixa do azul) e não possui boa parte de sua intensidade de fluorescência situada no ultravioleta, como ocorre quando λ_{exc} = 300 nm.

Figura 21 - Intensidade de fluorescência do compósito PANI/Au nas faixas de excitação de 290 a 400 nm em (a) amostra (---) e (c) amostra (+++) e de 340 a 400 nm em (b)amostra (---) e (d) amostra (+++).



É importante examinar a relação entre os dois picos de fluorescência que resultam da excitação em λ = 300 nm. Sabe-se da literatura (ANDREWS, 1999; WU & YU, 2015) que, para uma mesma excitação, é possível se obter mais de um pico de emissão como resposta, por conta de fatores como espalhamento Rayleigh, efeito Raman e progressão vibracional (ANDREWS, 1999; WU & YU, 2015;). A dispersão de Rayleigh, um fenômeno comum que explica o brilho azul do céu, e o efeito Raman – processo dissipativo no qual a energia inicial incidente é maior do que a espalhada – são processos em que a luz é espalhada por átomos ou moléculas. Já a progressão

vibracional ocorre quando há um acoplamento dos modos vibracionais de energia que resulta da interação de níveis eletrônicos com um modo vibracional de simetria particular (SCHMIDTKE, 1994).

No espectro de fluorescência, o comprimento de onda em que aparece o espalhamento Rayleigh é próximo e sempre menor do que aquele da emissão da molécula estudada (KELLS, O'NEIL & HOFMANN, 1984), enquanto o efeito Raman aparece em comprimentos de onda maiores que o da emissão (KASZOWSKA et al., 2016). Em concordância com o discutido por Clarke & Oprysa (2004), vemos que ambos os efeitos não podem ser associados ao padrão dos picos duplos observados nos resultados de fluorescência das Figs. 20 e 21. Para verificar se um pico é parte do espectro de fluorescência ou resultado de um artefato Raman basta variar o comprimento de onda de excitação. No efeito Raman o comprimento de onda do fóton espalhado é proporcional ao comprimento de onda do fóton de excitação. A relação entre o comprimento de onda do espalhamento Raman e o comprimento de onda de excitação é dado pela relação

$$\frac{1}{\lambda_{Raman}} = \frac{1}{\lambda_{exc}} - \bar{\nu} \,,$$

onde $\bar{\nu}$ é o deslocamento Raman. À medida que o comprimento de onda da luz de excitação aumenta, o comprimento de onda da dispersão Raman também aumenta e isso pode ser usado para distinguir entre Raman e fluorescência.

É também preciso verificar se os dois máximos correspondem a bandas de emissão distintas ou a dois máximos de uma mesma banda de emissão (consistindo naquilo que é conhecido como uma progressão vibracional (SCHMIDTKE, 1994)). De modo a poder verificar se o segundo pico no $\lambda_{emi} \approx 666$ nm corresponderia a uma progressão vibracional, deve-se variar a frequência de excitação: caso a distância entre os dois máximos permaneça sempre a mesma, então muito provavelmente eles correspondem a uma banda com estruturação (progressão) vibracional. No caso contrário, em que temos duas bandas de emissão diferentes, os dois máximos irão variar em energia e intensidade (SCHMIDTKE, 1994; MÜLLER, 2004). Em nosso caso, de acordo com as Fig. 20 e 21 é possível verificar que com a mudança da frequência de excitação os máximos dos dois picos variaram em energia e intensidade, o que nos leva a concluir que existem duas bandas distintas caracterizando a emissão do compósito.

5.3.2 Planejamento fatorial para compósito PANI/Cu

Na Tabela 5 é possível visualizar as intensidades máximas de fluorescência de todas as amostras do compósito PANI/Cu preparadas de acordo com o planejamento fatorial adotado, para um λ_{exc} de 300 e 350 nm. Os resultados, que correspondem à média de amostras sintetizadas em triplicatas, mostram a intensidade máxima dos picos de fluorescência obtidos ao excitar as amostras nesses λ_{exc}, como visto na Fig. 20. A partir desses resultados e utilizando o programa Statistica, foram obtidos os efeitos de cada variável (concentrações de $CuSO_4$, Anilina e MPTS) e suas interações sobre a intensidade de fluorescência. Usando esse software, pudemos construir os gráficos de Pareto correspondentes, de modo a identificar quais variáveis apresentam influência estatística significativa, para um intervalo de confiança de 95% na distribuição t de Student.

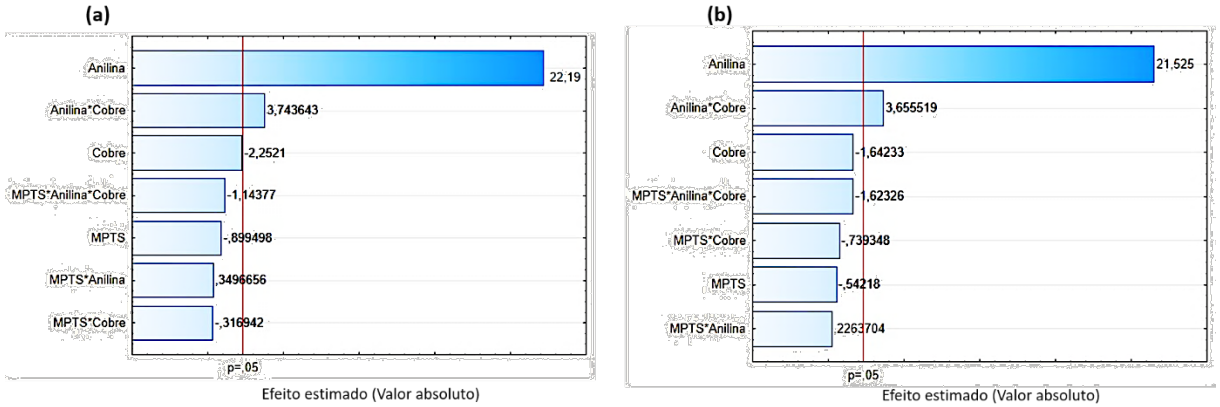
Tabela 5 - Planejamento fatorial e intensidade de fluorescência dos compósitos de compósito PANI/Cu em λ_{exc} = 300 nm e λ_{exc} = 350 nm.

Amostras	$CuSO_4$	Anilina	MPTS	λ_{exc} = 300 nm		λ_{exc} = 350 nm
				Média 1º pico ($\lambda_{emi} \approx$ 342 nm)	Média 2º pico ($\lambda_{emi} \approx$ 666 nm)	$\lambda_{emi} \approx$ 470 nm
A1	-	-	-	$7{,}01 \times 10^6$	$3{,}17 \times 10^6$	$6{,}2 \times 10^5$
A2	-	-	+	$6{,}76 \times 10^6$	$3{,}04 \times 10^6$	$5{,}8 \times 10^5$
A3	-	+	-	$9{,}03 \times 10^6$	$4{,}44 \times 10^6$	$6{,}1 \times 10^5$
A4	-	+	+	$9{,}14 \times 10^6$	$4{,}60 \times 10^6$	$5{,}3 \times 10^5$
A5	+	-	-	$6{,}20 \times 10^6$	$2{,}68 \times 10^6$	$6{,}2 \times 10^5$
A6	+	-	+	$6{,}15 \times 10^6$	$2{,}69 \times 10^6$	$6{,}1 \times 10^5$
A7	+	+	-	$9{,}38 \times 10^6$	$4{,}79 \times 10^6$	$5{,}9 \times 10^5$
A8	+	+	+	$9{,}14 \times 10^6$	$4{,}57 \times 10^6$	$6{,}1 \times 10^5$

A linha vertical de cor vermelha no gráfico de Pareto para o λ_{exc} = 300 nm (Fig. 22) indica o limite de p = 0,05 (que corresponde ao valor de t de Student tabelado), o qual estabelece o valor mínimo dos efeitos estatisticamente significativos. Assim, todos os efeitos que se localizam à direita da linha vermelha são expressivos. Na Fig. 22 temos os valores dos efeitos de cada variável e das interações entre as variáveis sendo apresentados à direita de cada barra vertical. Um efeito de valor positivo demonstra que o uso da variável no nível " + " causa um ganho positivo no valor da

resposta. Já um valor negativo para um dado efeito significa que para uma melhor resposta do sistema a variável correspondente deve ser usada no seu nível " - ". Quanto maior o valor dos efeitos, mais significativa será a variável, tanto para seu nível negativo quanto para o positivo.

Figura 22 - Gráficos de Pareto para a intensidade de fluorescência dos compósitos de PANI/Cu (a) do pico com $\lambda_{emi} \approx 342$ nm (pico 1) e (b) $\lambda_{emi} \approx 666$ nm (pico 2) para uma excitação em $\lambda_{exc} = 300$ nm.

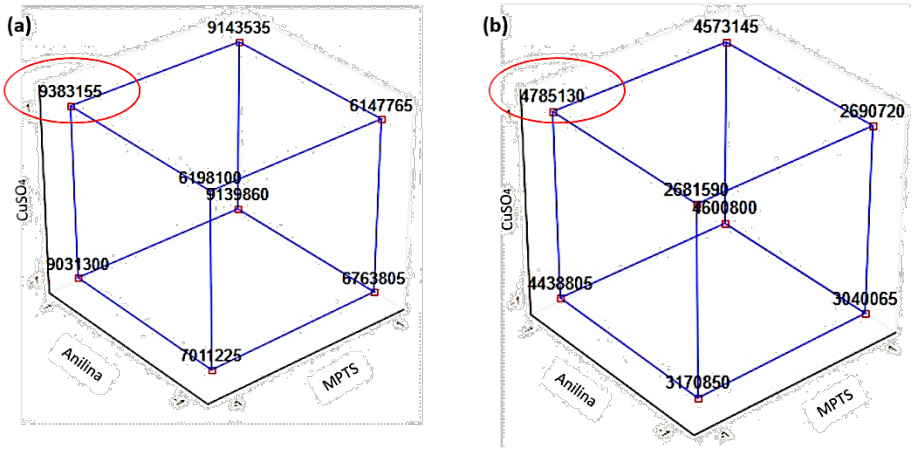


A partir da Fig. 22 pode-se constatar que para um $\lambda_{exc} = 300$ nm a anilina é a variável mais influente na resposta de fluorescência do compósito de PANI/Cu, apresentando um valor de significância alto em relação aos demais fatores, sendo acima do valor mínimo p = 0,05. Por ser este valor positivo, temos que a adição da anilina em seu nível superior (+) favorece o aumento da intensidade da fluorescência. Outra variável também expressiva é a interação da anilina com o $CuSO_4$ (Anilina*Cobre), a qual apresenta um valor positivo de significância. Isso confirma a importância do metal nos resultados de fluorescência, comprovando a ocorrência de uma sinergia entre o polímero e o metal, como reportado por Nascimento et al. (2011), Liu et al. (2013) e Santos et al. (2013).

Uma outra forma de visualizar esses resultados é através da representação geométrica, como pode ser visto na Fig. 23. Nesse gráfico, cada vértice do cubo representa a resposta de intensidade de fluorescência para cada um dos oito ensaios realizados (de A1 a A8). Nota-se que as maiores intensidades de fluorescência são obtidas quando a Anilina está em seu nível superior (+), principalmente quando o nível de cobre é também superior, +1. Desse modo, é possível observar que a região onde a intensidade de fluorescência é maximizada (valor circulado em vermelho) se refere

ao vértice com níveis de anilina, cobre e MPTS de (+ + -), respectivamente, o que representa o experimento A7. Nesse ensaio, as concentrações dos fatores são 0,031 mol/L de anilina, 0,53 mmol/L de $CuSO_4$ e 0,027 mol/L de MPTS.

Figura 23 - Gráfico cúbico das respostas de intensidade de fluorescência. (a) respostas do pico com $\lambda_{emi} \approx 342$ nm (pico 1) e (b) $\lambda_{emi} \approx 666$ nm (pico 2), para uma excitação em $\lambda_{exc} = 300$ nm.



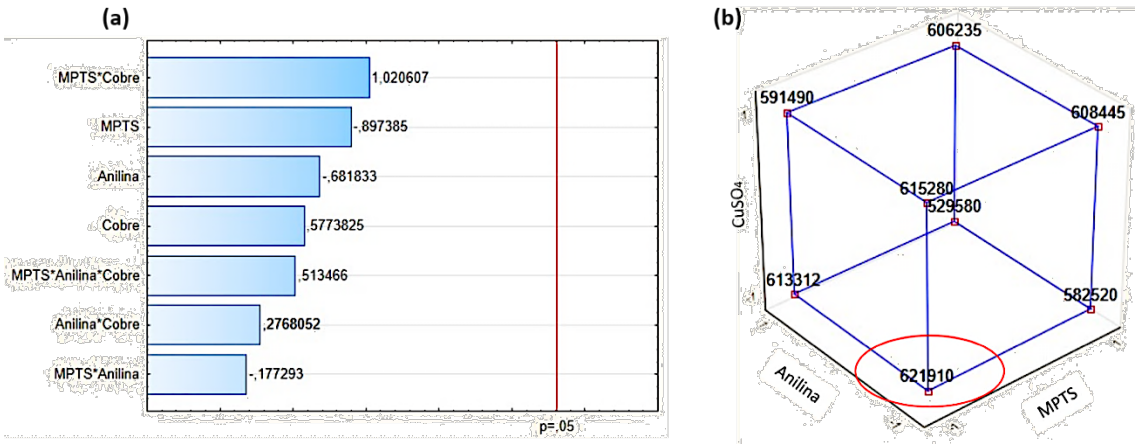
A importância da anilina no resultado da fluorescência pode ser atribuída ao fato de que, quanto maior a concentração do monômero, maiores deverão ser as cadeias poliméricas obtidas (SANNIGRAHI et al., 2008), o que deve levar a um aumento da conjugação da cadeia. Como reportado em Santos (2013), à medida que a cadeia da polianilina era degradada pela adição de NaClO, a intensidade da fluorescência diminuía, até ser totalmente suprimida, confirmando assim que (como poderia ser esperado) a PANI contribui de maneira essencial para a fluorescência do compósito.

A partir dos resultados mostrados nas Figs. 22 e 23, acredita-se que a fluorescência dos compósitos (polímero condutor)/(nanopartícula metálica) resulta de uma interação sinérgica entre as nanopartículas metálicas e as cadeias poliméricas vizinhas que as envolvem por completo (Santos et al., 2013). Sabe-se que as propriedades das nanopartículas metálicas são bastante sensíveis a seu ambiente imediato (SUBRAMANIAM et al., 2005), de modo que as características da emissão de um fluoróforo podem mudar extensivamente quando nas proximidades imediatas de uma nanopartícula metálica, cujo forte campo plasmônico pode interferir com o campo do dipolo molecular emissor (GEDDES & LAKOWICZ, 2002; KANG et al., 2011; ANTONEL et al., 2009).

A seguir, são apresentados resultados do planejamento fatorial no λ_{exc} de 350 nm. Esse comprimento de onda foi também investigado pelo fato de sua fluorescência ser alta e apresentar-se em um único pico na região do azul ($\lambda_{emi} \approx 470$ nm), o que permite uma identificação visual da fluorescência que a dos dois picos obtidos na excitação de 300 nm (para a qual a cor violeta – e menos intensa – da fluorescência resultante corresponde à combinação da emissão em dois comprimentos de onda).

Pelos dados mostrados na Fig. 24 é possível constatar que o planejamento fatorial para a excitação em 350 nm não nos dá muitas informações, uma vez que para esse comprimento de onda as fluorescências das amostras A1 a A8 não apresentam muitas diferenças em termos de magnitude. Isso resulta em um gráfico de Pareto (Fig. 24 (a)) em que nenhum fator apresenta valor acima do valor mínimo p = 0,05, ou seja, nenhum deles apresenta significância para a fluorescência nesse λ_{exc}. Analisando o gráfico cúbico da resposta (Fig. 24 (b)), vemos que a amostra de maior fluorescência seria aquela referente ao vértice circulado em vermelho na figura, onde os níveis de Cobre, Anilina e MPTS são, respectivamente, (- - -); porém pela proximidade entre os valores, e baseados no gráfico de Pareto, nada podemos afirmar sobre a influência dos fatores sobre a resposta de fluorescência para o caso em que o λ_{exc} = 350 nm.

Figura 24 - Representações gráficas da análise estatística no λ_{exc} = 350 nm. (a) Gráfico de Pareto e (b) gráfico cúbico das respostas de intensidade de fluorescência.



5.3.3 Diâmetro médio das partículas

Os resultados obtidos para a medida do diâmetro médio das partículas são apresentados na Tabela 6. O diâmetro médio obtido pela técnica de espalhamento de luz (DLS) corresponde ao diâmetro hidrodinâmico da partícula, o que inclui o conjunto estabilizante (MPTS), polímero (PANI) e as partículas de cobre. Os resultados mostrados na Tabela 6 foram avaliados estatisticamente por meio de um gráfico de Pareto (Fig. 25), a fim de determinar quais seriam os fatores mais influentes a determinar o tamanho do compósito.

Tabela 6 – Diâmetro médio (nm) das partículas dos compósitos de PANI/Cu.

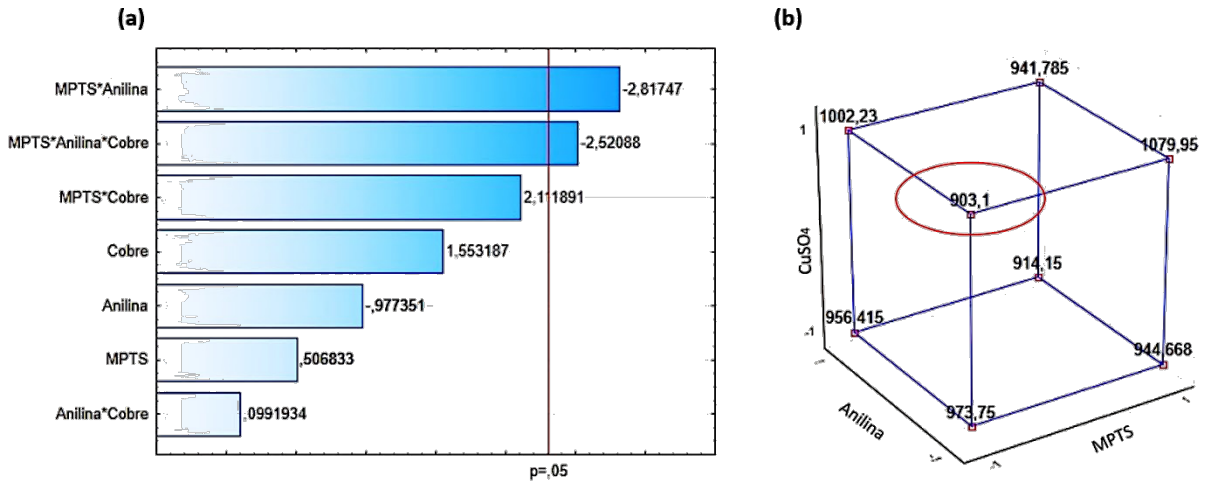
Amostras	$CuSO_4$	Anilina	MPTS	Replicatas		Média
A1	-	-	-	915,6	1031,9	973,8
A2	-	-	+	957,9	931,5	944,7
A3	-	+	-	951,2	961,6	956,4
A4	-	+	+	946,8	881,5	914,2
A5	+	-	-	861,3	944,9	903,1
A6	+	-	+	1103,9	1056	1080,0
A7	+	+	-	980,2	1024,3	1002,2
A8	+	+	+	963,0	920,6	941,8

Através do gráfico de Pareto, observa-se que as interações MPTS*Anilina e MPTS*Anilina*Cobre apresentam influência estatística significativa, ao nível de confiança de 95%. O valor negativo de ambos os efeitos indica que o diâmetro médio das partículas aumenta quando essas interações são menores. Isso revela o quão importante são as interações entre os reagentes para a estrutura do compósito, de modo que quanto maior a interação, menores os diâmetros dessas partículas.

O gráfico cúbico das respostas de diâmetro médio (nm), que é mostrado na Fig. 25 (b), nos permite visualizar melhor em que níveis os fatores devem estar para que sejam obtidos compósitos de diâmetro menor. Percebe-se que o menor diâmetro é obtido quando o MPTS e a anilina estão em seus níveis inferiores, enquanto o cobre se encontra em seu nível superior. Esse resultado está de acordo com a ideia de que, ao serem formadas, as nanopartículas de cobre de formato esférico atuam como

núcleo para o crescimento de um envoltório de polianilina. Desse modo, são as partículas metálicas esféricas que terminam por definir o tamanho do compósito, já que existindo um maior número delas presentes no meio, menores serão as aglomerações do polímero (NASCIMENTO et al., 2011).

Figura 25 - Representações gráficas da análise estatística para o diâmetro médio das partículas do compósito de PANI/Cu. (a) Gráfico de Pareto e (b) gráfico cúbico.



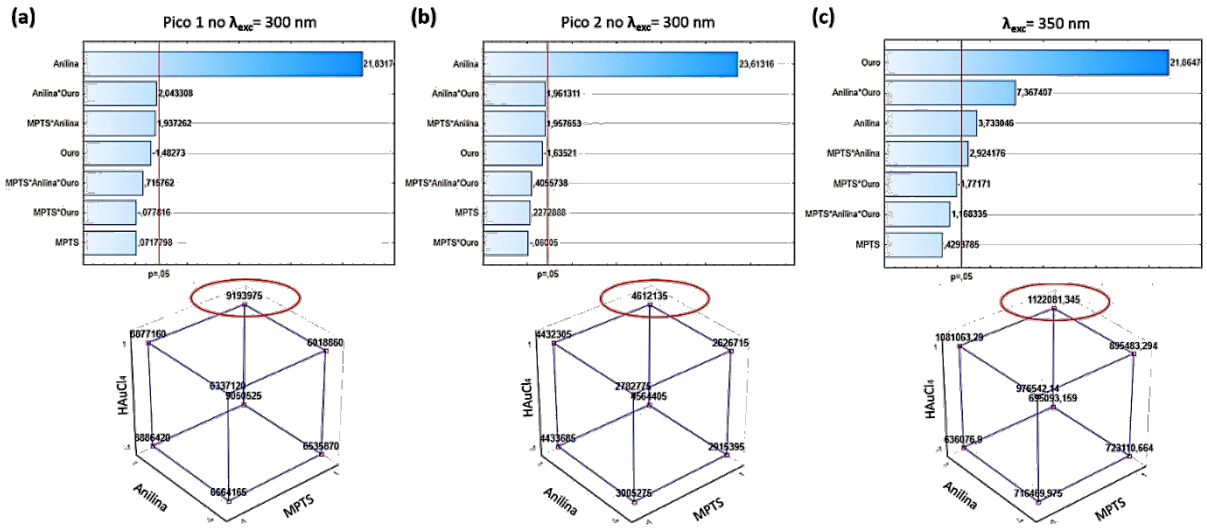
5.3.4 Planejamento fatorial para compósito pani/au

Para fins comparativos, o compósito de PANI/Au, estudado anteriormente no trabalho de Santos et al. (2013) com as mesmas concentrações usadas no planejamento fatorial apresentado nesse trabalho, foi aqui também analisado. Os resultados obtidos são mostrados na Fig. 26, onde é exibida uma representação gráfica da análise estatística para os comprimentos de onda de excitação em 300 nm e 350 nm. Através do gráfico de Pareto para λ_{exc} = 300 nm (Fig. 26, (a) e (b)), é possível ver que, para ambos os picos de fluorescência característicos dessa excitação, o comportamento do pico 1 (Fig. 26 (a)) é semelhante ao pico 2 (Fig. 26 (b)), de modo que apenas a anilina influencia estatisticamente a intensidade da fluorescência. Além disso, o valor positivo mostrado para a anilina implica em que maiores quantidades desta contribuem para o aumento da intensidade da fluorescência. A análise dos dados de um gráfico cúbico nos permite fazer a comparação das características da emissão fluorescente de cada amostra, e as Fig. 26 (a) e 26 (b) nos revela que a amostra (+ + +), com níveis mais altos de MPTS,

anilina e cobre, e que ocupa o vértice destacado com um círculo vermelho, tem a fluorescência maximizada.

Por sua vez, para o comprimento de onda de excitação de 350 nm, o gráfico de Pareto (Fig. 26 (c)) aponta que não apenas a anilina é um fator expressivo para a fluorescência, mas também que o ouro é o principal fator contribuinte para a intensidade da resposta fluorescente. Ao mesmo tempo, como outro fator importante é a interação Anilina*Ouro, fica reforçada a ideia de uma sinergia entre a cadeia polimérica e as partículas metálicas, que intensificaria a fluorescência do material. Verifica-se no gráfico cúbico mostrado na Fig. 26 (c), que, tal como para o caso em que o λ_{exc} = 300 nm, a melhor amostra é a A8 (+ + +).

Figura 26 - Gráfico de Pareto e Cúbico dos compósito PANI/Au para as excitações (a) no λ = 300 nm, 1º pico; (b) λ = 300 nm, 2º pico; e (c) λ = 350 nm.



5.4 EFEITO DA VARIAÇÃO DO pH DO MEIO – ESTUDO DA FLUORESCÊNCIA DO COMPÓSITO PANI/Cu NOS DIFERENTES ESTADOS DE OXIDAÇÃO DA PANI

Com base nos resultados da fluorescência do compósito de PANI/Cu para os comprimentos de onda de excitação em 300 nm e 350 nm, podemos avaliar qual entre as 8 amostras obtidas através do planejamento fatorial apresentaria o melhor resultado de fluorescência e em qual comprimento de onda de excitação essas amostras apresentam melhor potencial de aplicação como marcadores fluorescentes. Considerando que não podemos tirar muitas informações do planejamento fatorial no

λ_{exc} de 350 nm, dado que nesse caso as variáveis não possuem efeitos principais ou de interações estatisticamente significativas, e tendo em vista que o resultado da fluorescência para a excitação do compósito em 300 nm tem grande intensidade e pode ser visualizada a olho nu (mesmo que boa parte dela ocorra no ultravioleta), optamos estudar nosso compósito para o caso em que λ_{exc} = 300 nm. Desse modo, como mostrado na Fig. 23 e de acordo com o discutido anteriormente, a amostra obtida pelo planejamento fatorial de melhor resposta nesse comprimento de onda é a nomeada como A7 (Tabela 5).

Considerando isso, realizamos uma caracterização extensiva da amostra A7 do compósito PANI/Cu, avaliando os efeitos do pH sobre a fluorescência e o papel que a PANI desempenharia nesse fenômeno. Na Fig. 27 é apresentada a fluorescência dessa amostra para diferentes comprimentos de onda de excitação, enquanto que a Fig. 28 apresenta o resultado qualitativo da fluorescência. A Fig. 28 (a) mostra a coloração resultante da contribuição dos dois picos obtidos no λ_{exc} = 300 nm, e a Fig. 28 (c) a coloração resultante da mesma excitação com o uso de um filtro UV, exibindo apenas o λ_{emi} da região do visível. Como esperado, o uso do filtro bloqueia boa parte do comprimento de onda do primeiro pico da λ_{exc} = 300 nm (que ocorre no UV) e nos permite ver na região do vermelho, onde ocorre o máximo de emissão do segundo pico, como visto na Fig. 27 (a).

Figura 27 - Intensidade de fluorescência do compósito PANI/Cu nas condições da amostra A7 (- + +) (a) λ_{exc} de 290 a 400 nm (b) λ_{exc} de 340 a 400 nm.

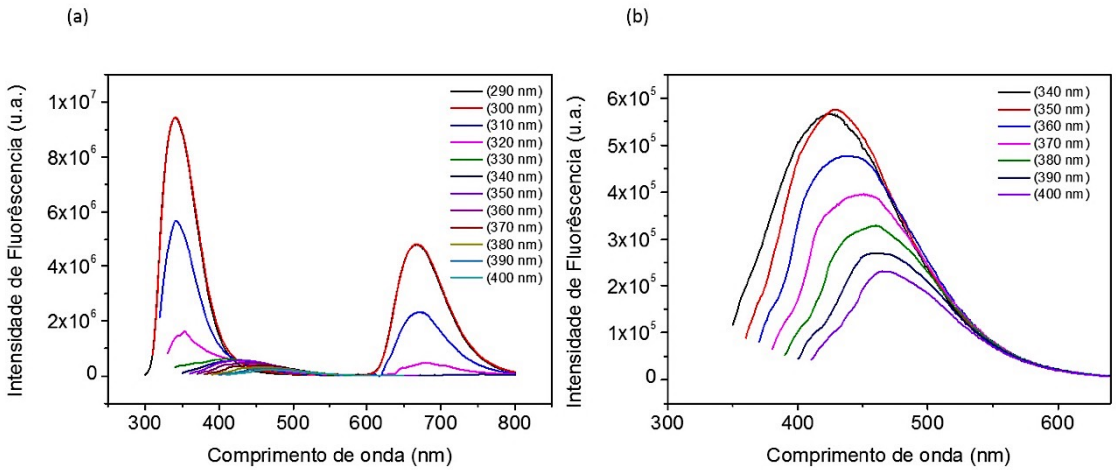
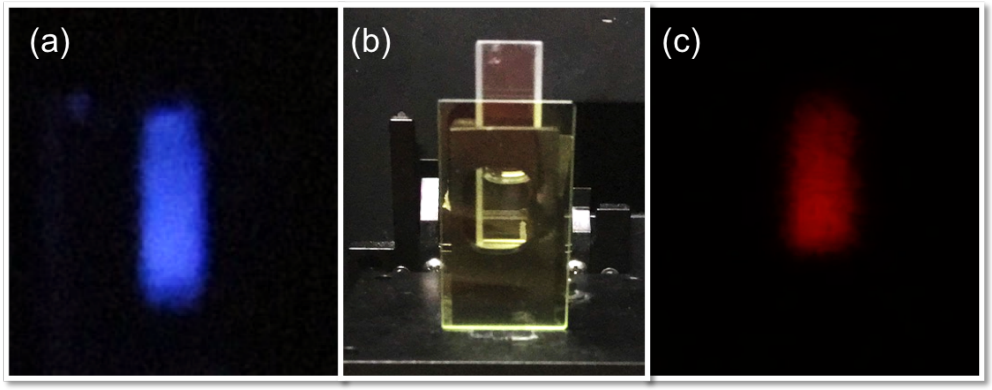


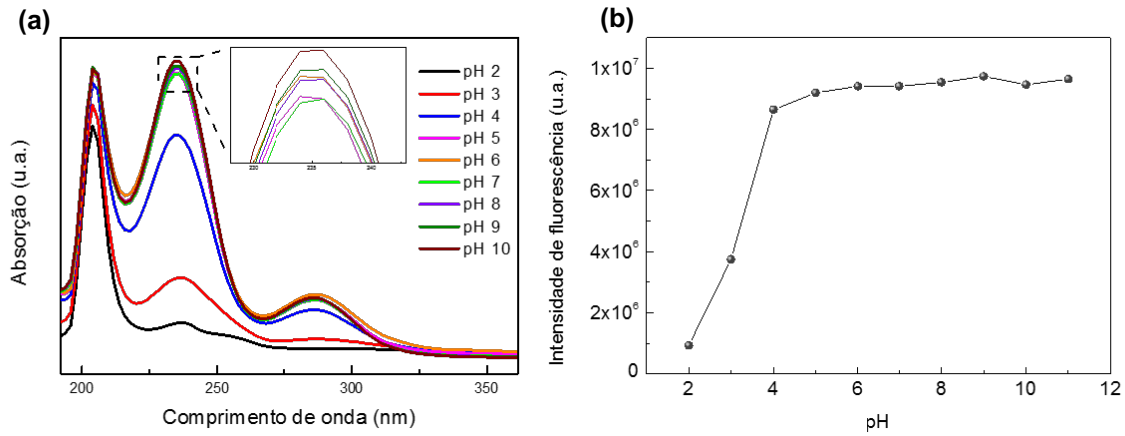
Figura 28 – Foto da fluorescência qualitativa do compósito de PANI/Cu (a) sem uso de filtro na região do UV, (b) esquema do filtro UV usado e (c) fluorescência do compósito após o uso do filtro.



5.4.1 UV-Vis e fluorescência

As intensidades medidas para os espectros de UV-Vis e de fluorescência da amostra A7 para valores de pH do meio variando entre 2 e 11 são apresentadas na Fig. 29. Tanto no caso da intensidade de absorção no UV-Vis, quanto no da emissão de fluorescência, pode ser observado uma certa invariância para valores de pH > 6, com uma diminuição progressiva ocorrendo para valores menores de pH, e uma queda apreciável o caso em que o pH < 4.

Figura 29 - Resultado de UV-Vis (a) e fluorescência (b) da amostra A7 do compósito PANI/Cu para diferentes valores do pH do meio.



Como discutido na Seção 3.2, sabe-se que a polianilina muda seu estado oxidativo à medida em que varia o pH do meio. Com a redução do pH do meio, a cadeia polimérica vai se tornando cada vez mais protonada, o que aumenta a

condutividade do polímero. Como pode ser visto na Fig. 29(b), a esse aumento da condutividade corresponde uma diminuição da intensidade da fluorescência. Isso ocorre uma vez que a estrutura da PANI na forma de base (não dopada) consiste de y unidades repetidas reduzidas (benzenóides), e (1-y) unidades oxidadas (quinóides) (Fig. 3), e à medida que vai sendo oxidada (pH mais baixos) a proporção de unidades benzenóicas diminui, levando a uma mudança nas propriedades óticas da molécula. isso se deve a que a protonação da base causa uma distorção da estrutura da polianilina para formar uma estrutura de rede polarônica e a protonação do sal de esmeraldina causa a quebra da rede polarônica em uma rede de bipólarons confinados. Como visto na Seção 3.2, esses defeitos surgem na estrutura da PANI e criam níveis de energia no meio do *band gap* que alteram as absorções óticas do polímero (HUANG & MACDIARMID, 1993).

No caso da polianilina, é sabido que enquanto as unidades benzenóides apresentam fluorescência, isso não é observado para os grupos quinoides, que chegam a mesmo a agir como supressores da fluorescência das unidades benzenóides adjacentes (SHIMANO & MACDIARMID, 2001). Assim, para valores menores do pH do meio, a PANI é protonada (o que a torna mais condutora), levando a um maior número de unidades quinoides (que funcionam como supressoras da fluorescência) na sua estrutura.

Muitos estudos têm provado que os sistemas fluorescentes não são costumam apresentar alto grau de condutividade (ANTONEL et al., 2007). Como reportado por Chen et al. (1996), a PANI é um emissor de luz branca mais eficaz quando se encontra em sua forma de base leucoesmeraldina do que na forma base esmeraldina (que contém uma maior fração de unidades quinoides, inibidoras da luminescência). Em seu trabalho, ANTONEL et al. (2007) investigaram como a fluorescência de filmes de polianilina varia em função de seus diferentes estados de oxidação. Ao observarem que o rendimento quântico de fluorescência (RQF) diminui quando a PANI está no estado esmeraldina, eles concluíram que a presença de domínios condutores causa forte supressão da fluorescência dos éxcitons localizados dentro ou próximos a esses domínios.

Em trabalho anterior de nosso grupo (SANTOS et al. (2013)), ficou estabelecido que o RQF do compósito de PANI/AuNPs se torna menor com a diminuição do pH do meio, o que nos leva a crer que, uma vez tendo ocorrido a polimerização do polímero,

a redução do pH cria um número maior de domínios condutores através da introdução de níveis de energia dentro da região do *band gap*, o que pode ocasionar uma extinção mais eficiente dos estados excitados transitórios necessários para os processos de fluorescência (ANTONEL et al. 2007). Da mesma forma, em seu conjunto os resultados da Fig. 29 representam uma evidência do papel ativo que o polímero condutor desempenha na fluorescência observada do PANI/Cu.

Outra informação importante do resultado de UV-Vis da Fig. 29 é que mesmo com a protonação da PANI, resultando na redução do pH, a banda característica do polímero em seu estado condutor (~700 – 800 nm) não pode ser visualizada, o que nos leva a acreditar que a PANI está presente em sua forma de base leucoesmeraldina. É reportado que o UV-Vis da leucoesmeraldina tem espectros semelhantes na faixa de pH entre 2-13, sem que ocorra o aparecimento de novas bandas com a mudança de pH. A variação do pH provoca apenas mudanças de intensidade das bandas de absorção da transição π- π*, que ocorre entre 315 nm e 260 nm (HUANG E MACDIARMID, 1993), o que está de acordo com o obtido na Fig. 29.

Além disso, Huang e MacDiarmid (1993) mostraram que a PANI reduzida na forma de leucoesmeraldina é muito difícil de ser protonada, com apenas uma pequena protonação sendo esperada para valores de pH menores que 3 (HUANG et al., 1986), de modo que sua transição para outros estados oxidativos se faz difícil. É sabido que o estado de pernigranilina da PANI é mais reativo que a esmeraldina, enquanto a leucoesmeraldina é muito pouco reativa. Isso porque as unidades quinoides (quinonimina) são capazes de reagir muito mais facilmente do que as unidades benzenóicas, de modo que a leucoesmeraldina, que possui 0% de unidades quinoides, não apresenta uma reatividade significativa (ACEVEDO et al., 2005).

Observando os resultados de UV-Vis e fluorescência da Fig. 29, bem como os relativos às medidas de impedância da Fig. 30, vemos que as mudanças mais consideráveis de comportamento do gráfico ocorrem para pH < 3, sugerindo que a forma da PANI presente nos nanocompósitos por nós obtidos corresponde à leucoesmeraldina. Segundo Libert, Bredas & Epstein (1995), a dopagem da leucoesmeraldina com cargas positivas leva ao relaxamento significativo da rede local, enquanto que o aparecimento de cargas negativas, em pH maiores, resulta em deformações conformacionais menos intensas. Todos esses fatores contribuem para

explicar os comportamentos mostrados na Fig. 29 e 30, em que para altos valores de pH não ocorrem mudanças significativas nos espectros de UV-Vis e de fluorescência e no valor da impedância, enquanto que para um pH' abaixo de três uma evidente alteração é observada nos resultados correspondentes.

Deste modo, o fato de termos obtido a polianilina em sua forma de base leucoesmeraldina favorece a fluorescência do compósito, pois a PANI reduzida é formada por unidades benzenóides que contribuem para esse fenômeno. Além disso, a ocorrência de uma redução na absorção no UV-Vis e de uma mudança de intensidade de fluorescência das amostras quando o pH do meio é alterado comprova a existência de uma cadeia polimérica, que ao ser oxidada muda sua condutividade, um fato confirmado pelos resultados de impedância elétrica a serem mostrados na próxima seção.

5.4.2 Impedância

A mudança da intensidade de fluorescência como uma função do pH do meio pode ser associada com a correspondente variação do nível de condutividade, que pode ser mensurada através de medidas de espectroscopia de impedância elétrica. A impedância elétrica (Z), que é definida como a oposição que um dispositivo ou circuito oferece ao fluxo de uma corrente alternada (CA) a uma dada frequência (BEKRI-ABBES & SRASRA, 2015), consiste de uma parte real (resistência, R) e de uma parte imaginária (reatância, X). Ela é uma medida inversamente proporcional à condutância do material (BARSOUKOV & MACDONALD, 2005).

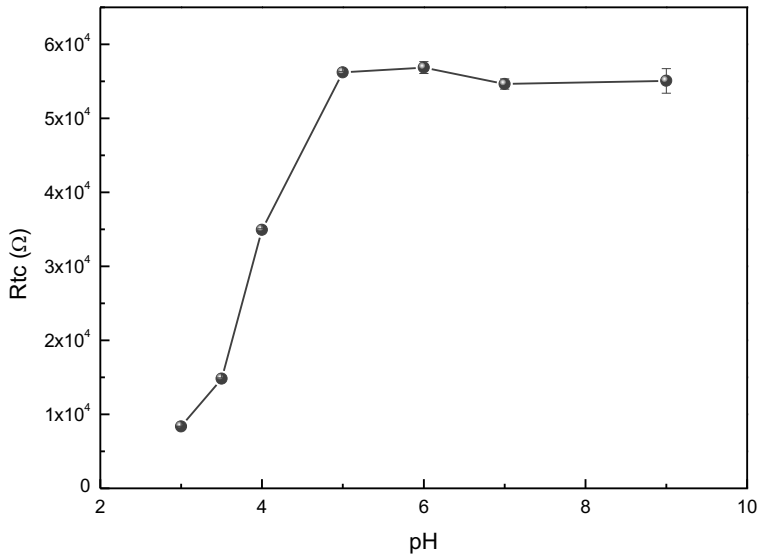
Em geral, a técnica de medida consiste em colocar a amostra do material investigado entre dois eletrodos, e em seguida aplicar um estímulo elétrico. Vários tipos de estímulo podem ser considerados, sendo mais comum o uso de uma tensão alternada tipo senoidal. Após o estímulo, é possível medir as partes reais e imaginárias da impedância complexa em função da frequência, gerando um espectro de impedância. Os resultados obtidos a partir desse espectro são modelados e associados a circuitos equivalentes ou a modelos matemáticos, de modo a que se tenha uma resposta no ponto de vista macroscópico (LVOVICH, 2012).

Geralmente é desejável um modelo que tenha solução analítica, podendo eles serem expressos em termos de análogos a um circuito elétrico; nesse caso, para uma

dada frequência, um circuito equivalente fornece uma representação total da distribuição de potencial elétrico no sistema. Assim, através da adoção de um modelo para o sistema, podemos obter propriedades relacionadas ao material, como condutividade, mobilidade de cargas e constante dielétrica, ou propriedades relacionadas a interface eletrodo-material, como a capacitância desta região e coeficiente de difusão (BARSOUKOV & MACDONALD, 2005). A resistência de transporte de carga (R_{ct}) de um material está relacionada com a mobilidade de elétrons entre o eletrodo e o líquido. Dessa forma, a partir desta resistência é possível calcular a condutividade do material (BARSOUKOV & MACDONALD, 2005; LVOVICH, 2012).

A Fig. 30 mostra como o valor da resistência de transporte de carga do compósito de PANI/Cu varia em função do valor do pH do meio. Para valores menores de pH (meio ácido), mais condutora será a PANI, já para meios básicos, com pH acima de 6, menos cargas livres estão presentes (SANTOS, 2012). Pode-se observar na Fig. 30 que a resistência cresce significativamente na região com pH entre 2,5 a 5, ocorrendo consequentemente uma redução da condutividade do compósito até um determinado valor em que ele satura e permanece constante (pH próximo de 6). Desse modo, é possível comprovar a existência da cadeia polimérica, cuja condutividade varia ao ser oxidada. Além disso, esse resultado está de acordo com aqueles apresentados na Fig. 29, reafirmando a relação de oposição entre a fluorescência e a condutividade da PANI.

Figura 30 - Variação da resistência de transporte de carga da amostra A7 em função do pH.



5.4.3 Potencial zeta (ζ)

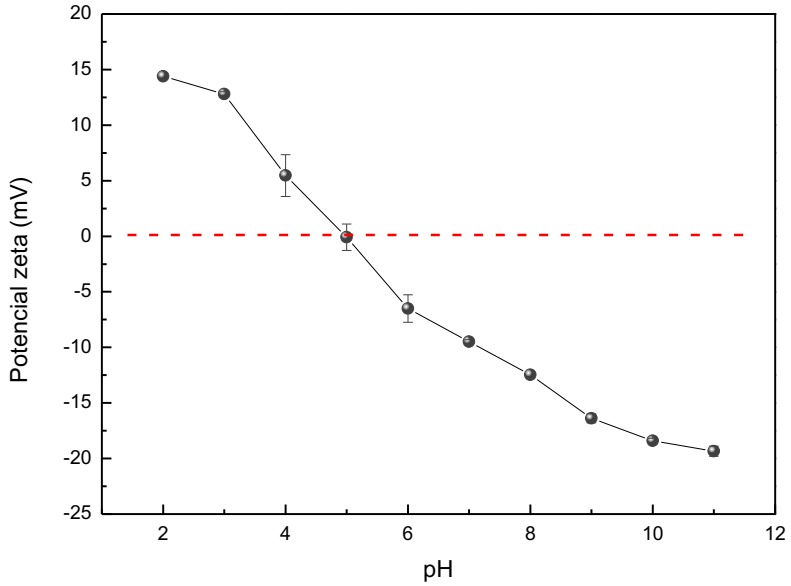
Quando em contato com um líquido, a maioria dos materiais particulados apresenta carga elétrica em sua superfície, ocasionando uma redistribuição dos íons em sua vizinhança, com a formação de uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido. É dado o nome de potencial zeta ao potencial elétrico (ou potencial eletrocinético) resultante da presença dessas cargas em sistemas coloidais. Mais rigorosamente, o potencial zeta é o potencial elétrico na dupla camada interfacial de uma partícula ou gota dispersa versus um ponto na fase contínua longe da interface. Em outras palavras, ele representa a diferença de potencial entre o meio de dispersão móvel e a camada estacionária do meio de dispersão ligado à partícula dispersa (LU & GAO, 2010).

As interações entre as partículas no meio coloidal ocorrem de acordo com a magnitude do potencial zeta, ou seja, quanto maior o valor absoluto de ζ (positivo ou negativo), maior será a estabilidade eletrostática da dispersão, como decorrência do fato de que a repulsão entre partículas carregadas termina por impedir sua agregação, evitando assim a separação de fases (SANTOS et al. 2013).

Na Fig. 31 são mostrados os valores das medidas do potencial zeta para uma solução do compósito de PANI/Cu em função da variação do pH do meio. É possível

verificar que os valores de ζ se tornam mais positivos para um meio cada vez mais ácido (pH < 5), enquanto que para um meio cada vez mais básico (pH > 5) os valores de ζ são crescentemente negativos.

Figura 31 - Variação do potencial zeta da amostra A7 em função do pH do meio.



Em um ambiente ácido, as cadeias da polianilina estão em sua forma dopada, carregadas positivamente, resultando em valores positivos para o potencial zeta. Ao ser desdopada, sob condições básicas, a PANI exibe valores negativos de potencial zeta. Ao estudar a variação do potencial zeta da polianilina em função do pH, De Medeiros et al. (2003) encontraram resultados similares aos mostrados na Fig. 31, o que foi por eles explicado como devido ao fato de que em valores menores do pH do meio, mais íons de H^+ estariam presentes na fase dispersa, e com isso mais cadeias de PANI estariam dopadas, o que implicaria em um aumento da carga na superfície das partículas.

A desdopagem da polianilina ocorre em torno do pH 6, e em meios crescentemente alcalinos os valores do potencial zeta passam a cair de maneira mais significativa, com uma mudança de sinal (WANG et al., 2013). Quando o ponto isoelétrico (PIE) é atingido, para um pH de aproximadamente 5, o potencial zeta se torna nulo e a polianilina tem carga neutra. Com isso as repulsões eletrostáticas entre as partículas passam a ser desprezíveis, aumentando assim a tendência à agregação

em partículas maiores. À medida que o pH é aumentado, o valor do potencial zeta continua a diminuir até atingir um valor negativo máximo de 19,34 mV a pH = 11.

Uma repulsão eletrostática mais forte é indicada por um valor absoluto mais alto do potencial zeta, correspondendo a um sistema coloidal mais estável, ou seja, mais resiliente à agregação e à precipitação de partículas. Podemos assim concluir que os sistemas coloidais do compósito PANI/Cu mais estáveis ocorrem em valores mais extremos de pHs, sejam ácidos ou básicos, o que está em acordo com os resultados mostrados anteriormente nas Figs. 29 e 30. Quando a PANI é protonada e está na forma condutora, sua carga superficial é positiva, facilitando o aparecimento dos defeitos móveis tipo bipólaron. Porém, quanto mais desprotonada for a cadeia, mais negativa será a carga na superfície, e menos condutor será o polímero, o que favorece a ocorrência da fluorescência (SANTOS et al., 2013).

5.5 RENDIMENTO QUÂNTICO E TEMPO DE VIDA

O rendimento quântico relativo das amostras foi obtido com base no método comparativo proposto por Willians et al. (1983), que toma como padrão de cálculo o rendimento quântico do sulfato de quinina (φ_f de 52 ± 2 % em água), como descrito anteriormente (Seção 4.4.4).

De acordo com o trabalho de Santos et al. (2013), que estudou o rendimento quântico dos compósitos de PANI/Au produzidos através de uma metodologia de síntese semelhante à nossa, o melhor rendimento quântico do compósito foi obtido para o valor de pH da solução em que ocorreu a própria síntese (pH ≈ 5,5), sem necessidade de ajustes. Por sua vez, os resultados da Fig. 29 (b) mostram que a intensidade de fluorescência permanece quase constante a partir do pH 6 (essencialmente o mesmo pH que o da síntese). Assim, o rendimento quântico da amostra A7 foi determinado sem que fosse feita alteração do pH do meio, do que resultou um valor de φ_f = 0,088, para o comprimento de onda de excitação de 300 nm. Este valor de rendimento quântico de fluorescência é não apenas surpreendentemente alto, se comparado com o da PANI em seus diferentes estados oxidativos (ALVES et al., 2013), como também maior que o reportado na literatura para a fluorescência de compósitos com PANI e partículas metálicas, para os quais φ_f = 0,0781 (SANTOS et al., 2013) e φ_f = 0,0772 (RAFIQI & MAJID, 2016).

O rendimento quântico das amostras excitadas em λ de 350 nm foi de φ_f = 0,35%, um valor bem abaixo que o observado para o λ_{exc} = 300 nm. Mesmo assim, esse valor pode ser considerado como favorável quando comparado com o determinado por Alves et al. (2013), que obtiveram um valor de φ_f entre 6,9 x 10^{-3} e 1,9 x 10^{-3}, o que pode ser atribuído à interação sinergética entre a cadeia polimérica e as nanopartículas metálicas.

Por sua vez, o tempo de vida é uma propriedade intrínseca de um fluoróforo e não depende de condições iniciais ou do comprimento de onda de excitação, duração da exposição à luz, da excitação de um ou múltiplos fótons ou dos métodos de medição. Ele é ainda um parâmetro largamente independente da intensidade de fluorescência e da concentração de fluoróforo. No entanto, como esse processo está associado à existência de um estado energeticamente instável, o tempo de vida da fluorescência pode ser sensível a uma grande variedade de fatores internos determinados pela estrutura do fluoróforo e fatores externos que incluem temperatura, polaridade e a presença de supressores de fluorescência. A combinação da influência interna e externa mencionada acima torna o tempo de vida da fluorescência um método independente, mas complementar às medições tradicionais de intensidade de fluorescência (BEREZIN & ACHILEFU, 2011).

Para que um fluoróforo possa ser usado como um marcador eficiente, seu tempo de vida deve estar na faixa de centenas de picossegundos a centenas de nanossegundos. Fluoróforos com tempos de vida de fluorescência muito curtos costumam ser emissores fracos e se tornam em geral menos atraentes para a geração de imagens, devido a uma sensibilidade limitada e por demandarem uma longa exposição e maior tempo de aquisição (BECKER & BERGMANN, 2008; PERIASAMY & CLEGG, 2009; BEREZIN & ACHILEFU, 2011).

O tempo de vida do compósito PANI/Cu foi medido no comprimento de excitação de 300 nm, para os dois picos observados (342 e 666 nm). As medidas, realizadas para duas amostras A7 distintas, corresponderam a valores médios de tempos de vida iguais a 2.62 ns para a emissão em 342 nm, e 2.60 ns para aquela em 666 nm.

O valor do tempo de vida da amostra A7 do compósito de PANI/Cu é mostrado na Tabela 6, juntamente com o tempo de vida de outros fluoróforos bastante usados em aplicações de microscopia de imagem por fluorescência e como biomarcadores. De acordo com Wouter and Esposito (2008), o tempo de vida de fluorescência de

fluoróforos biologicamente relevantes está entre 1 e 10 ns, o que faz com que o compósito de PANI/Cu discutido neste trabalho se mostre competitivo para aplicações no bioimageamento.

Tabela 6 – Tempo de vida de fluorescência de diferentes classes de moléculas fluorescentes bastante estudadas em aplicações de geração de imagem.

Classe de fluoróforos	Intervalo de tempo de vida de fluorescência (ns)	Ref.
PANI/Cu	**2,6 ns**	
Fluoróforos endógenos	0.1 – 7 ns	DE MELO (2007); SCHWEITZER et al. (2007).
Corantes orgânicos	0,1 - 20 ns	VALEUR (2002); FISZ (2007); BEREZIN & ACHILEFU (2011).
Proteínas Fluorescentes	0.1 – 4 ns	FINE & HANSEN (1971); BEREZIN & ACHILEFU (2011).
Pontos quânticos	média - 10-30 ns, até 500 ns	MCGOWN & NITHIPATIKOM (2000); KALYTCHUK et al. (2018).
Complexos organometálicos	10-700 ns	BECKER, BERGMANN & BISKUP (2007); BECKER & BERGMANN (2008).
Lantanídeos	de μs (Yb, Nd) para ms (Eu, Tb)	AMELOOT & VALEUR (2008), PATTING (2008); BOENS.
Fulerenos	< 1.2 ns	KIM et al. (1992)

Fonte: adaptado de BEREZIN & ACHILEFU (2011).

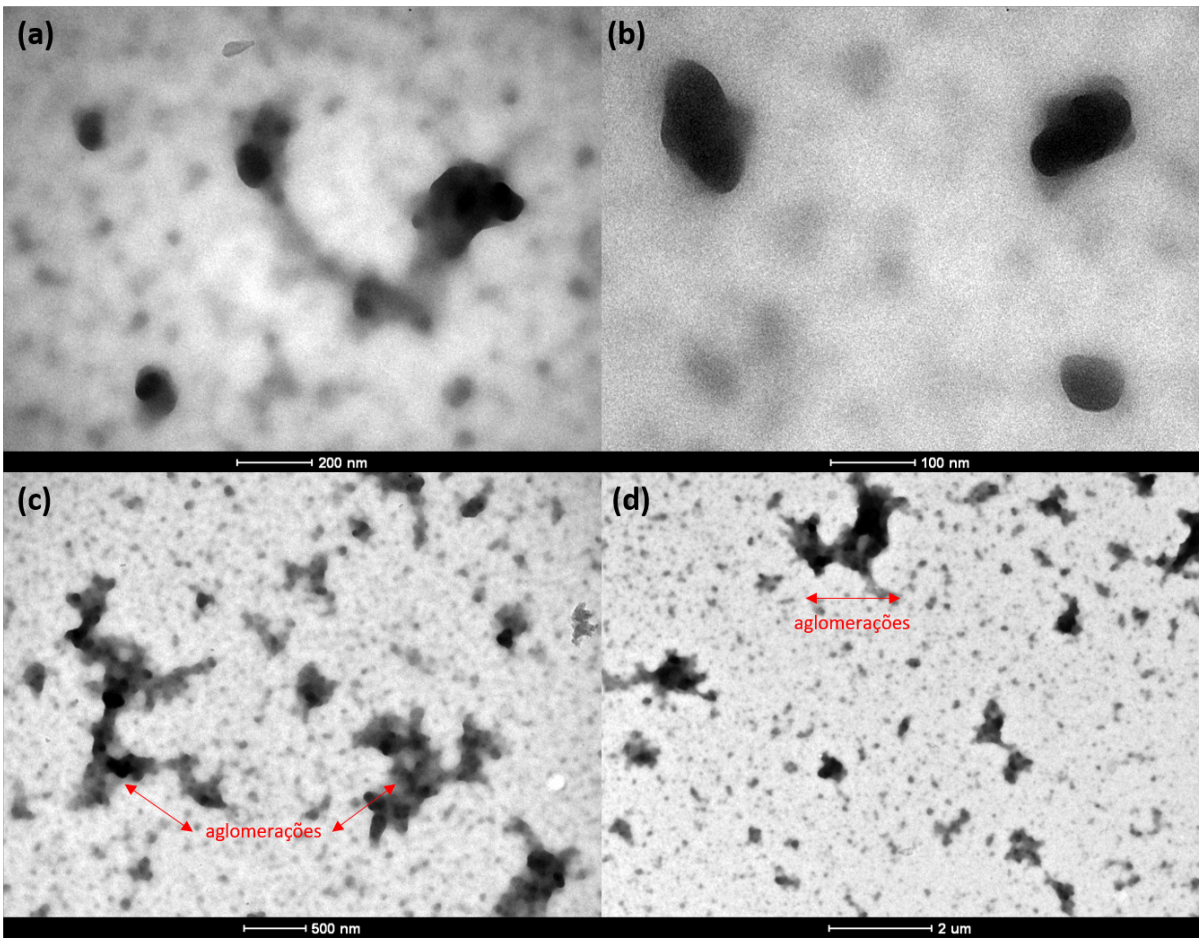
5.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A morfologia do compósito PANI/Cu pode ser analisada a partir de suas imagens em diferentes magnitudes obtidas por MET (Fig. 32). Nessas imagens, os pontos pretos são associados às partículas de cobre, que estariam encapsuladas pelo polímero (regiões cinza-claros). As nanopartículas de cobre apresentam formato esférico e são monodispersas, formando um núcleo para o crescimento do envoltório

de polianilina, do que resulta uma estrutura tipo núcleo-casca, que pode chegar a tamanhos menores que 100 nm (Figs. 32(a) e (b)). Percebe-se também que ocorre uma separação regular das nanopartículas metálicas, atribuído à ação do MPTS como agente estabilizante (ver Seção 3.3).

A presença das nanopartículas de cobre (Cu^0) se deve à redução dos cátions de cobre, com o crescimento simultâneo das cadeias de PANI, fazendo com que os sistemas isolados do tipo núcleo-casca passem a se formar. No entanto, com o prosseguimento da síntese esses sistemas distintos acabam por se aglomerar, resultando em uma matriz polimérica com as nanopartículas metálicas incorporadas no seu interior (Fig. 32 (c) e (d)), e com tamanho variando entre 500 nm e 2 μm.

Figura 32 - Imagem obtidas por MET do compósito PANI/Cu (+ + -) em diferentes magnificações.



5.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Determinar a biocompatibilidade de um novo material é algo complexo e envolve a investigação de uma gama de propriedades biológicas que são testadas pela adoção de métodos alternativos in vitro (LIMA, 2019). Através do uso de diferentes linhagens de células na análise da citotoxicidade, é possível estabelecer a ação que o material pode desempenhar frente aos diferentes tipos de estruturas celulares, resultando em um potencial de aplicação mais direcionado e seguro (HUMPOLÍČEK et al., 2018). Nesse contexto, para investigação do potencial citotóxico do compósito PANI/Cu, foram utilizadas neste trabalho duas linhagens de células (Vero e macrófagos) originadas de diferentes tecidos.

Tais modelos celulares são amplamente utilizados para avaliar a citotoxicidade de novos materiais ou moléculas, devido à possibilidade de sua interação com compostos candidatos ao uso na terapia de doenças (LIMA, 2019). As células Vero são oriundas do rim de macacos africanos, enquanto que os macrófagos são células relacionadas ao sistema imunológico de mamíferos sendo responsáveis pela fagocitose de organismos invasores. A fim de se obter uma melhor caracterização citotóxica, essas células foram inicialmente cultivadas na ausência do compósito (Controle) e em sua presença – usando diferentes concentrações (31,2 a 500 µg/mL) das partículas de PANI/Cu (amostra A7 (+ + -)), e posteriormente submetidas à análise da viabilidade celular pelo método do MTT (ver seção 4.4.8).

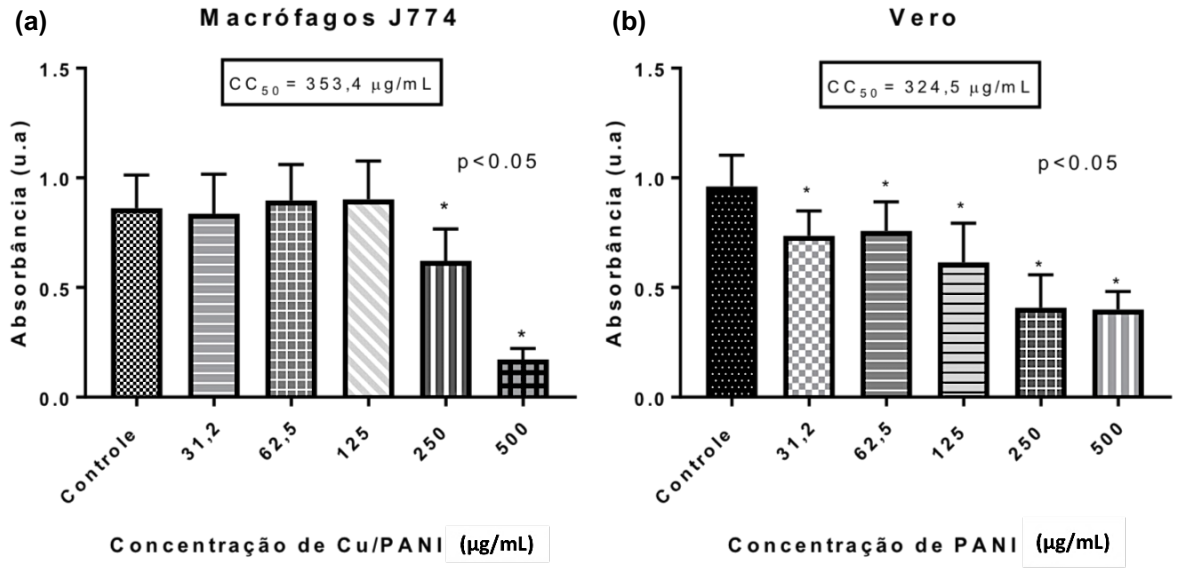
As diferentes concentrações testadas (31,2 a 500 µg/mL) do compósito PANI/Cu (+ + -) permitiram a obtenção da concentração citotóxica que reduz a viabilidade em 50% da cultura (CC_{50}) para ambas as linhagens de células investigadas. A Fig. 33, nos mostra a absorbância para cara umas das concentrações utilizadas (ver seção 4.4.8.), mostrando através dos asteriscos (*) as concentrações a partir das quais a viabilidade celular do grupo tratado muda em relação ao sistema controle apresentando diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$). Através de uma análise estatística descrita na seção 4.4.9. é possível encontrar o valor da CC_{50}. Para as células de macrófagos a CC_{50} foi de 353,4 µg/mL, enquanto para as células Vero obteve-se uma CC_{50} de 324,5 µg/mL.

Os valores de CC_{50} obtidos são satisfatórios se compararmos com a citotoxicidade da PANI e das CuNPs separadamente, conforme encontrado na

literatura. Li et al. (2014), por exemplo, concluem que o limite superior de segurança para as nanopartículas de PANI em macrófagos Celíacos de Rato é inferior a 10 µg/mL. Já o trabalho de Arancibia et al. (2016) mostra que a exposição de CuNPs em concentrações inferiores a 10 µg/ml não afeta a viabilidade celular dos macrófagos J774. Resultado encontrados no trabalho de Saranya et al. (2017), por outro lado, mostram que a ação das CuNPs em relação a viabilidade celular das células Vero não foi estatisticamente significante ($p>0,05$) entre as concentrações e o tempo de exposição mostrados. Porém, conforme relatado recentemente (GAETKE, 2003; CHEN et al., 2006; KARLSSON et al., 2013), o cobre e suas nanopartículas apresentam grande toxidade para diversas células.

Através dos resultados da Fig. 33 é possível sugerir, com base nos limites obtidos (CC_{50}), que o compósito de PANI/Cu poderia ter uma aplicação biológica mais segura a nível celular, visto que este teste é preliminar e testes mais completos precisam ser realizados para que o material seja definido como biocompatível.

Figura 33 - Efeito da PANI/Cu amostra A7 (+ + -) sobre células de mamíferos. (a) macrófagos e (b) células Vero.



6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nesse trabalho, estudamos inicialmente as condições de síntese para a otimização das propriedades de fluorescência do compósito de PANI/Cu, obtendo-se como amostra ótima aquela – identificada como A7 (+ + -) – que corresponde a uma concentração de anilina, $CuSO_4$ e MPTS de 0,031 (mol/L), de 0,53 (mmol/L), 0,054 (mol/L), respectivamente. Para esta amostra, para o comprimento de onda de excitação de 300 nm, a intensidade de fluorescência foi da ordem de 10^6 (u.a) e ocorria na região do visível, apresentando uma coloração azul escuro, como resultado do somatório dos comprimentos de onda dos dois picos de fluorescência decorrentes desse comprimento de onda.

Através das técnicas de UV-Vis e FTIR foi confirmada a formação do polímero, e pelo conjunto de estudos relativos aos efeitos da variação do pH sobre a intensidade da fluorescência, e os valores da impedância e do potencial Zeta foi possível verificar o estado oxidativo da polianilina, e identificá-lo como sendo a leucoesmeraldina. No estado de base leucoesmeraldina a PANI é de coloração amarela e a mudança de seu estado oxidativo só ocorre em valores muito baixos de pH. Tanto a coloração quanto o padrão de resposta da amostra com a mudança de pH esperado para a leucoesmeraldina foram observados em nossas amostras de PANI/Cu.

Pelo planejamento fatorial, foi constatada a importância da interação metal-polímero, e como a mudança do metal nos proporciona diferentes respostas de fluorescência com diferenças estatisticamente relevantes ($p > 0,05$) para um intervalo de confiança de 95% na distribuição de t de Student. Acredita-se que a grande fluorescência observada destes (polímeros condutores)/(nanopartículas metálicas) se dá devido à uma interação sinérgica entre as propriedades da superfície das possíveis nanopartículas metálicas e a estrutura eletrônica das cadeias vizinhas PANI que as envolvem completamente.

Por fim, foram realizados testes de citotoxicidade do compósito visando averiguar sua adequabilidade para uso em sistemas biológicos. Para as células de macrófagos, a CC_{50} foi determinada como sendo 353,4 μg/mL, enquanto que para as células Vero obteve-se uma CC_{50} de 324,5 μg/mL, valores considerados como satisfatórios. Deve se destacar, porém, que os ensaios realizados foram apenas de

caráter ainda preliminar e que para uma melhor definição da biocompatibilidade do compósito PANI/Cu análises mais completas precisam vir a ser realizadas.

Como perspectivas para a continuidade deste trabalho, na busca de melhor avaliar as atividades antitumorais do compósito de PANI/Cu, testes da ação citotóxica do compósito em células de câncer cervical humano (HeLa) vêm sendo realizados. Além disso, como comprovado em testes iniciais de prova do conceito, o compósito tem se mostrado promissor na área de testes de diagnósticos rápidos, muito embora novos ensaios ainda precisem ser concluídos. Além disso, é preciso confirmar a presença do cobre metálico no compósito, o que pode ser feito através de espetroscopia de Transmissão com altas resoluções ou através da espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDX).

REFERÊNCIAS

ABDULLA, S. et al. Controlled Fabrication of Highly Monodispersed, Gold Nanoparticles Grafted Polyaniline (Au@PANI) Nanospheres and their Efficient Ammonia Gas Sensing Properties. **Journal of Biosens Bioelectron**, v. 6, p. 165, 2015.

ACEVEDO, D. F. et al. Synthesis, properties and aplications of functionalized polyanilines. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 2, p. 259-269, 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532005000200020&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 24 Maio 2019.

ALLEN, G.; AGGARWAL, S. L.; RUSSO, S. **Comprehensive Polymer Science and Supplements**. Oxford: Pergamon Press, 1989.

ALVES, K. G. B. et al. Preparation of fluorescent polyaniline nanoparticles in aqueous solutions. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, p. 1339, 2013.

ALVES, K. G. B. et al. Síntese de nanopartículas fluorescentes de polianilina dispersas em água para aplicações físicas e biotecnológicas. Patente, PCT/BR2012/000321, INPI. Brazil, 2011.

ANDREWS, D. L. Rayleigh scattering and Raman. In: TRANTER, G. E.; HOLMES, J. L. **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry**. New York: Academic Press, 1999.

ANTONEL, P. S.; ANDRADE E. M.; MOLINA, F.V. Fluorescence of polyaniline films on electrode surfaces: thickness dependence and surface influence. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 632, n. 1–2, p. 72–79, 2009.

ANTONEL, P. S.; MOLINA, F. V.; ANDRADE, E. M. Fluorescence of polyaniline films on platinum surfaces. Influence of redox state and conductive domains. **Journal of Eletroanalytical Chemistry**, v. 599, p. 52-58, 2007.

ARANCIBIA, S. et al. Copper oxide nanoparticles recruit macrophages and modulate nitric oxide, proinflammatory cytokines and PGE2 production through arginase activation. **Nanomedicine,** v. 11, n. 10, p. 1237–1251, 2016.

ARANDA-SOUZA, M. Â. et al. In vitro effect of Bothrops leucurus lectin (BLL) against Leishmania amazonensis and Leishmania braziliensis infection. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 431-439, 2018.

ATKINS, P. W.; JONES, L. **Princípios de química:** questionando a vida moderna e o meio ambiente. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2012.

BARLOW, R. Statistics: A Guide to the Use of Statistical Methods in the Physical Sciences. **John Wiley**, 1989.

BARSOUKOV, E.; MACDONALD, J. R. **Impedance Spectroscopy:** Theory, Experiment, and Applications. 2. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2005.

BÄSSLER, H. Charge transport in disordered organic photoconductors. **Physica Status Solidi**, v. 175, p. 15, 1993.

BATTOCCHIO, C. et al. Silver Nanoparticles Stabilized with Thiols: A Close Look at the Local Chemistry and Chemical Structure. **Physical Chemistry C**, v. 116, n. 36, p. 19571–19578, 2012.

BÄUERLE, P. Intrinsically Conducting Polymers – Quo Vadis?. **Advanced Materials**, v. 5, n. 12, p.879-886, 1993.

BECKER, W.; BERGMANN, A. Lifetime-Resolved Imaging in Nonlinear Microscopy. In: MASTERS, B. R.; SO, P. **Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy**. New York: Oxford University Press, 2008.

BECKER, W.; BERGMANN, A.; BISKUP, C. Multispectral fluorescence lifetime imaging by TCSPC. **Microscopy Research and Technique**, v. 70, p. 403, 2007.

BEKRI-ABBES, I.; SRASRA, E. Electrical and Dielectric Properties of Polyaniline and Polyaniline/Montmorillonite Nanocomposite Prepared by Solid Reaction Using Spectroscopy Impedance. **Journal of Nanomaterials**, v. 2015, 2015

BEREZIN, M. Y.; ACHILEFU, S. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 5, p. 2641–2684. 2011.

BERZINA, T. et al. Gold nanoparticles–polyaniline composite material: Synthesis, structure and electrical properties. **Synthetic Metals,** v. 161, p. 1408-1413, 2011.

BIKIARIS, D. N.; TRIANTAFYLLIDIS, K. S. HDPE/Cu-nanofiber nanocomposites with enhanced antibacterial and oxygen barrier properties appropriate for food packaging applications. **Materials Letters**, v. 93, p. 1–4, 2013.

BOENS, N.; AMELOOT, M.; VALEUR, B. Practical Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy: Avoiding Artifacts and Using Lifetime Standards. In: RESCH-GENGER, U. **Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements I**. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, v. 5, 2008.

BOEVA, Zh. A.; SERGEYEV, V. G. Polyaniline: Synthesis, Properties and Application. **Polymer Science**, v. 56, n. 1, p. 144–153, 2013.

BOGDANOVIĆ, U. et al. Copper-polyaniline nanocomposite: Role of physicochemical properties on the antimicrobial activity and genotoxicity evaluation. **Materials Science & Engineering**, v. 93, p. 49–60, 2018.

BOGDANOVIĆ, U. et al. Nanomaterial with High Antimicrobial Efficacy of Copper/Polyaniline Nanocomposite. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, p. 1955−1966, 2015.

BORKOW, G.; GABBAY, J. Copper as a biocidal tool. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2163–2175, 2005.

BRÉDAS, J. L.; STREET, G. B. Polarons, bipolarons, and solitons in conducting polymers. **Accounts of Chemical Research,** v. 18, p.390-315, 1987.

BRÉDAS, J. L.; THEMANS, B.; ANDRE, J. M. The role of mobile organic radicals and ions (solitons, polarons and bipolarons) in the transport properties of doped conjugated polymers. **Synthetic Metals**, v. 9, p. 265 – 274, 1984.

BROUWER, A. M. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 83, n. 12, p. 2213, 2011.

BUTTON, S. T. **Metodologia para planejamento experimental e análise de resultados**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas., 2005. Disponível em: http://www.fem.unicamp.br/~sergio1/pos-graduacao/IM317/apostila.pdf. Acesso em: 21 maio 2019.

CHEN, Z. et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. **Toxicology Letters**, v. 163, p. 109–120, 2006.

CHIANG, C. K. et al. Electrical conductivity in doped polyacetylene. **Physical Review Letters**, n. 39, p. 1098-101, 1977.

CHIANG, J. C.; MACDIARMID, A. G. 'Polyaniline': Protonic acid doping of the emeraldine form to the metallic regime. **Synthetic Metals**, v. 13, p. 193, 1986.

CHRISTINA, O. B. et al. Size control of gold nanoparticles grown on polyaniline nanofibers for bistable memory devices. **ACS Nano,** v. 5, p. 3469, 2011.

CIOFFI, N. et al. Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. **Chemistry of Materials**, v. 17, p. 5255–5262, 2005.

CLARKE, R. J.; OPRYSA, A. Fluorescence and Light Scattering. **Journal of Chemical Education**, v. 81, n. 5, p. 705, 2004.

DE ALBUQUERQUE, J. E. et al. Study of the interconversion of polyaniline oxidation states by optical absorption spectroscopy. **Synthetic Metals**, v. 146, p. 1–10, 2004.

DE BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos, pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** 2. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2001.

DE CARVALHO, L. A.; DE ANDRADE, A. R.; BUENO, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 796-804, 2006.

DE DEUS, J. F. **Dispositivos poliméricos emissores de luz branca.** 2008. Tese (doutorado) – Engenharia e Ciências dos Materiais, Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

DE LIMA, S. V.; DE OLIVEIRA, H. P.; DE MELO, C. P. Electrical impedance monitoring of proteinunfolding. **RSC Advances**, v. 6, p. 107644, 2016.

DE MEDEIROS, D. W. O. et al. Zeta potential and doping in polyaniline dispersions. **Materials Science**, v. 21, n. 2, 2003.

DE MELO, C. P.; ANDRADE, C. A. S.; DOS SANTOS, C. G. Fluorescent nanoparticle composites themselves, process for preparation of such composites, and use in rapid diagnosis systems with affinity to biological molecules. Patent. WIPO WO/2009/117798, 2009.

DE MELO, J. S. et al. Revisiting Perkin's dye(s): the spectroscopy and photophysics of two new mauveine compounds (B2 and C). **Communications Chemistry**, p. 2624, 2007.

DE PAOLI, M. A. Transporte de massa em polímeros intrinsecamente condutores. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p.358-368, 1999.

DE PAULA EIRAS, S.; COSCIONE, A. R.; DE ANDRADE, J. C. Métodos de otimização em química. **Chemkeys**, 2000.

DIVYA, V.; SANGARANARAYANAN, M. V. A facile synthetic strategy for mesoporous crystalline copper–polyaniline composite. **European Polymer Journal**, v. 48, p. 560-568, 2012.

ENGERT, C. et al. Dynamic structure of charge carrier in polyaniline by near-infrared excited resonance Raman spectroscopy. **Chemical Physics Letters***, n.* 218, p. 87, 1994.

FAEZ, R. et al. Polímeros condutores. **Química Nova na Escola,** v.11, p.13-18, 2000.

FILHO, R. C. R. Prêmio Nobel - Polímeros condutores: Descoberta e Aplicações. **Química Nova na Escola**. v.12, p.11-14, 2000.

FINE, S.; HANSEN, W. Optical Second Harmonic Generation in Biological Systems. **Applied Optics**, v.10, p. 2350, 1971.

FISZ, J. J. Another look at magic-angle-detecte emission anisotropy decays in fluorescence microscopy. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 111, p. 12867, 2007.
FRATODDI, I. et al. Chemiresistive polyaniline-based gas sensors: a mini review. **Sensor and Actuator B: Chemical**, v. 220, p. 534-548, 2015.

GAETKE, L. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. **Toxicology**, v. 189, p. 147–163, 2003.

GEDDES, C. D.; LAKOWICZ, J. R. Editorial: metal-enhanced fluorescence. **Journal of Fluorescence**, v. 12, n. 2, p. 121–129, 2002.

HAI-LONG, W.; RU-QIN, Y. Practical Analytical Applications of Multiway Calibration Methods Based on Alternating Multilinear Decomposition. **Data Handling in Science and Technology**, v. 29, p. 167-246, 2015

HAUFF, E. The Role of Molecular Structure and Conformation in Polymer Electronics. In: WEBER, E. R.; JAGADISH, C. **Semiconductors and Semimetals**. San Diego: Academic Press, 2011, v. 85, p. 231-260.

HELENA, P.O.N. et al. An impedimetric biosensor for detection of dengue serotype at picomolar concentration based on gold nanoparticles-polyaniline hybrid composites. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, p. 414–419, 2011.

HUANG, W. S.; HUMPHREY, B. D.; MACDIARMID, A. G. J. Polyaniline, a novel conducting polymer. Morphology and chemistry of its oxidation and reduction in aqueous electrolytes. **Journal of Chemistry Society, Faraday Transition**, v. 1, n. 82, p. 2385, 1986.

HUANG, W. S.; MACDIARMID, A. G. Optical properties of polyaniline**. Polymer**, v. 34, n. 9, 1993.

HUMPOLICEK, P. et al. Biocompatibility of polyaniline. **Synthetic Metals**, v. 162, n. 7-8, p. 722–727, 2012.

HUMPOLÍČEK, P. et al. Stem cell differentiation on conducting polyaniline. **RSC Advances**, v. 5, p. 68796-68805, 2015.

HUMPOLÍČEK, P. et al. The biocompatibility of polyaniline and polypyrrole: A comparative study of their cytotoxicity, embryotoxicity and impurity profile. **Materials Science and Engineering: C**, v. 91, p. 303-310, 2018.

HUNG, C.; WEI, Y. Site-selective deposition of ultra-fine Au nanoparticle on polyaniline nanofibers for H_2O_2 sensing. **Materials Chemistry and physics**, 2010.

IBRAHIM, K. A. Synthesis and characterization of polyaniline and poly(aniline-co-o-nitroaniline) using vibrational spectroscopy. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 2668-2674, 2017.

INGLE, A. P. et al. Mycosynthesis of silver nanoparticles using the fungus Fusarium acuminatum and its activity against some human pathogenic bacteria. **Current Nanoscience**, v. 4, p. 141–144, 2008.

INGLE, A. P.; DURAN, N.; RAI, M. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 3, p. 1001–1009, 2013.

INZELT, G.; LORÁND, E. Conducting Polymers: A New Era in Electrochemistry. In: _____ **Monographs in electrochemistry**. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg. 2. ed., 2012.

IOLE, V. et al. A nanostructured composite based on polyaniline and gold nanoparticles: synthesis and gas sensing properties. **Nanotechnology**, v. 24, p. 155503, 2013.

JAISHANKAR, M. et al. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 7, n. 2, p. 60–72, 2014.

JIAHUA, S. et al. The pH-controlled morphology transition of polyaniline from nanofibers to nanospheres. **Nanotechnology**, v. 24, p. 175602, 2013.

KALYTCHUK, S. et al. Carbon Dot Fluorescence Lifetime-Encoded Anti-Counterfeiting. **ACS Applied Materials Interfaces**, 2018.

KANG, E. T.; NEOH, K. G.; TAN, K. L. A polymer with many interesting intrinsic redox states. **Progress in Polymer Science**, v. 23, n. 2, p. 277-324, 1998.

KANG, K. et al. Fluorescence manipulation by gold nanoparticles: from complete quenching to extensive enhancement. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 16, 2011.

KARLSSON, H. L. et al. Cell membrane damage and protein interaction induced by copper containing nanoparticles--importance of the metal release process. **Toxicology**, v. 313, p. 59–69, 2013.

KASZOWSKA, Z. et al. Raman scattering or fluorescence emission? Raman spectroscopy study on lime-based building and conservation materials. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 169, p. 7-15, 2016.

KATRIEL, J.; PAUNCZ, R. Theoretical Interpretation of Hund's Rule. **Advances in Quantum Chemistry**, v. 10, p. 143-185, 1977.

KELLS, D. I. C.; O'NEIL, J. D. J.; HOFMANN, T. A Method for Eliminating Rayleigh Scattering from Fluorescence Spectra. **Analytical Biochemistry**, v. 139, p. 316-318,1984.

KIM, D. et al. Observation of fluorescence emission from solutions of C60 and C70 fullerenes and measurement of their excited-state lifetimes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 11, p. 4429–4430, 1992.

KINYANJUI, J. M.; HATCHETT, D. W. Chemical Synthesis of a Polyaniline/Gold Composite Using Tetrachloroaurate. **Chemistry of Materials**, v. 16, n. 17, p. 3390–3398, 2004.

KITTEL, C. **Introduction to Solid State Physics**. 8. ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 2005.

KOBAYASHI, T.; YONEYAMA, H.; TAMURA, H. Oxidative degradation pathway of polyaniline film electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 177, p. 281, 1984.

KUCEKOVÁ, Z. et al. Colloidal polyaniline dispersions: antibacterial activity, cytotoxicity and neutrophil oxidative burst. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 411-417, 2014.

KUCEKOVÁ, Z. et al. Cytotoxicity of colloidal polyaniline dispersions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 411-7, 2013.

LI, Y. S. et al. Cytotoxicity of Polyaniline Nanomaterial on Rat Celiac Macrophages *In Vitro*. **PLoS One,** v. 9, n. 9, 2014.

Li, Y.-S. et al. Cytotoxicity of Polyaniline Nanomaterial on Rat Celiac Macrophages In Vitro. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 107361, 2014.

LIBERT, J.; BREDAS, J. L.; EPSTEIN, A. J. Theoretical study of p- and n-type doping of the leucoemeraldine base form of polyaniline: Evolution of the geometric and electronic structure. **Physical Review B**, v. 51, n. 9, p. 5711–5724, 1995.

LIMA, E. M. de A. **Compósito Ag/Polipirrol: síntese, propriedades e atividade antitumoral.** 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais) – Programa de pós-graduação em Ciências de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco. Recife.

LIMA, P. H. C. et al. Polímeros condutores com propriedades eletrocrômicas: Uma revisão. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 13, n. 1, p. 1-17, 2018.

LITTLE, W. A. Possibility of synthesizing an organic superconductor**. Physical Review Journal**, v. 134, p. 1416, 1964.

LIU, A. et al. Preparation and Comparative Study of Polyaniline/Copper and Polyaniline/Silver Composites by Electrical Explosion of Wire. In: 7th International Forum on Strategic Technology (IFOST), 2012. Tomsk, Russia, 2012.

LIU, A. et al. Synthesis and Characterization of Conducting Polyaniline-Copper Composites. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology,** v. 13, p. 7728–7733, 2013.

LU, G. W.; GAO, P. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. In: KULKARNI, V. S. **Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems**. p. 59-94. 2010.

LVOVICH, V. F. **Impedance spectroscopy with application to electrochemical and dielectric phenomena**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2012.

MACDIARMID, A. G. "Synthetic Metals": A novel role for organic polymers**.** **Angewandte Chemie International Edition,** v. 40, n. 14, p. 2581, 2001.

MACDIARMID, A. G.; EPSTEIN, A. J. Polyanilines: a novel class of conducting polymers. **Faraday Discussions of Chemical Society**, v. 88, p. 317, 1989.
MANYALA, N. et al. Doping a semiconductor to create an unconventional metal. **Nature**, v. 454, p. 976–980, 2008.

MARTINEZ-GUITIERREZ, F. et al. Antimicrobial activity, cytotoxicity and inflammatory response of novel plastics embedded with silver nanoparticles. **Future Microbiology,** v. 8, p. 403–411, 2013.

MATTOSO, L. H. C. Polianilina: Síntese, Estrutura e Propriedades. **Química Nova**, v.19, n.4, p.388-399, 1996.

MCGOWN, L. B.; NITHIPATIKOM, K. Molecular fluorescence and phosphorescence. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 35, p. 353, 2000.

MOORE, G. E.; WOODS, L. K. Culture media for human cells—RPMI 1603, RPMI 1634, RPMI 1640 and GEM 1717. **TCA manual / Tissue Culture Association,** v. 3, n. 1, p. 503- 509, March 01 1977.

MÜLLER, J. G. Vibrational fluorescence spectroscopy of single conjugated polymer molecules**. Physical review B**, v. 70, p. 035205, 2004.

MUÑOZ-BONILLA, A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M. Polymeric materials with antimicrobial activity. **Progress in Polymer Science**, v. 37, p. 281–339, 2012.

NADAF, L. I; VENKATESH, K. S. Polyaniline-Copper Oxide Nano-Composites: Synthesis and Characterization. **Material Science Research India**, v. 12, n. 2, 2015.
NEOH, K. G; KANG, E. T; TAN, K. L. Evolution of polyaniline structure during synthesis. **Polymer**, v. 34, p. 3921-3928, 1993.

NEOH, K. G.; KANG, E. T.; TAN, K. L. Evolution of polyaniline structure during synthesis. **Polymer**, v. 34, n. 18, 1993.

PADILLA, R. M. A. **Estudo de Transporte de Carga de Polímeros de Polianilina**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica), PUC-Rio, Rio de Janeiro.

PALZA, H. et al. Effect of copper nanoparticles on the cell viability of polymer composites. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 66, n. 9, p. 462–468, 2017.

PALZA, H.; QUIJADA, R.; DELGADO, K. Antimicrobial polymer composites with copper micro-and nanoparticles: Effect of particle size and polymer matrix. **Journal of Bioactive and Compatible Polymer,** v. 30, p. 366–380, 2015.

PATTING, M. Evaluation of Time-Resolved Fluorescence Data: Typical Methods and Problems. In: RESCH-GENGER, U. **Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements I**., Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, v. 5, 2008.

PERIASAMY, A.; CLEGG, R. M. FLIM Microscopy in Biology and Medicine. **Chapman & Hall/CRC**, 2009.

RAFIQI, F. A.; MAJID, K. Synthesis, Characterization, Luminescence and Magnetic Properties of Composite of Polyaniline with Nickel Bisacetylacetonate Complex. **Polymer Science Series B**, April 2016.

REN, G. et al. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 587–90, 2009.

RUPARELIA, J. P. et al. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. **Acta Biomaterialia**, v. 4, p. 707–16, 2008.

SABBAH, I.A. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of colloidal copper nanoparticles stabilized by cationic thiol polyurethane surfactants. **Journal of Polymer Research**, v. 25, p. 252, 2018.

SANGAMESHA, M. A.; PUSHPALATHA, K.; SHEKAR, G. Synthesis and characterization of conducting polyaniline / copper selenide nanocomposites. **Indian Journal of Advances in Chemical Science**, v. 2, n. 3, p. 223-227, 2014.

SANNIGRAHI, A. et al. How the monomer concentration of polymerization influences various properties of polybenzimidazole: A case study with poly(4,4′-diphenylether-5,5′-bibenzimidazole). **Journal of Applied polymer**, 2008.

SANTOS, R. F. da S. **Caracterização das propriedades luminescentes de compósitos PANI/AuNPs e sua aplicação em testes de diagnósticos rápidos.** 2013. Tese (Doutorado em Ciências dos Materiais) – Programa de pós-graduação em Ciências de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, p. 78-79.

SANTOS, R. F. S. et al. Visible luminescence in polyaniline/(gold nanoparticle) composites. **Journal of Nanoparticle Research,** v. 15, n.1, 2013.

SAPURINA, I Yu.; SHISHOV, M. A. Oxidative Polymerization of Aniline: Molecular Synthesis of Polyaniline and the Formation of Supramolecular Structures. In: GOMES, A.S. **New Polymers for Special Applications**, 2012.

SAPURINA, I. Yu.; STEJSKAL, J. Oxidation of Aniline with Strong and Weak Oxidants. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 82, n. 2, p. 256-275, 2012.

SARANYA S. et al. In vitro cytotoxicity of zinc oxide, iron oxide and copper nanopowders prepared by green synthesis. **Toxicology Reports**, v. 4, p. 427–430, 2017.

SCHMIDTKE, H. H. Vibrational progressions in electronic spectra of complex compounds indicating strong vibronic coupling. In: YERSIN, H. (eds) **Electronic and**

Vibronic Spectra of Transition Metal Complexes I: Topics in Current Chemistry, v.171, p. 69–111. Heidelberg: Springer Berlin, 1994.

SCHWEITZER, D. et al. Towards metabolic mapping of the human retina. Microscopy Research and Technology, v. 70, n. 5, p. 410, 2007.

SELVAKANNAN, P. R. et al. Free-standing gold nanoparticle membrane by the spontaneous reduction of aqueous chloroaurate ions by oxyethylene-linkage-bearing diamine at a liquid-liquid interface. **Advanced Materials**, v. 16, n. 12, p. 966-971, 2004 (a).

SELVAKANNAN, P. R. et al. One pot, spontaneous and simultaneous synthesis of gold nanoparticles in aqueous and nonpolar organic solvent using a diamine-containing oxyethylene linkage. **Langmuir**, v. 20, n. 2, p. 295-298, 2004 (b).

SEYMOUR, R. B.; KIRSHENBAUM, G. S. High Performance Polymers: Their Origin and Development. **Elsevier Science Publishing Co.** New York, 1986.

SHARMA, S. et al. Chloroform vapour sensor based on copper/polyaniline nanocomposite, **Sensors and Actuators B**, v. 85, p. 131–136, 2002.

SHI, M. et al. Effects of Surface Chemistry on the Generation of Reactive Oxygen Species by Copper Nanoparticles. **ACS Nano**, v. 6, n. 3, p. 2157–2164, 2012.

SHIMANO, J. Y.; MACDIARMID, A. G. Polyaniline, a dynamic block copolymer: key to attaining its intrinsic conductivity. **Synthetic Metals**, v. 123, p. 251-262, 2001.

SHIRAKAWA, H. et al. Synthesis of electrically conducting organic polymers- halogen derivatives of polyacetilene, (CH)x. **Journal of the Chemical Society-Chemical Communications**, v.16, p. 578-580, 1977.

SHIRAVAND, S.; AZARBANI, F. Phytosynthesis, characterization, antibacterial and cytotoxic effects of copper nanoparticles. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 10, n. 4, p. 241–249, 2017.

SHUBHA, L. N.; KALPANA, M.; RAO, P. M. Study of Chemically Synthesized Polyaniline/Copper Oxide Nanocomposites. In: Proceedings of the National Seminar on Frontiers in Chemical Research and Analysis, St. Francis College for Women, Hyderabad. **Annual Report**, p.1-4, 2015.

SNOOK, G. A.; KAO, P.; BEST, A. S. Conducting-polymer-based supercapacitor devices and electrodes. **Journal of Power Sources**, v. 196, p. 1–12, 2011.

STEJSKAL, J. Conducting polymer-silver composites. **Chemical Papers- Slovak Academy of Sciences**, v. 67, p. 8, 2013.

STEJSKAL, J.; KRATOCHVFL, P. Polyaniline dispersions. 2. UV-Vis absorption spectra. **Synthetic Metals**, v. 61, p. 225-231, 1993.

STEJSKAL, J.; TRCHOVÁ, M. Aniline oligomers versus polyaniline. **Polymer International**, v. 61, p. 240–251, 2012.

SUBRAMANIAM, C.; TOM R. T.; PRADEEP, T. On the formation of protected gold nanoparticles form AuCl4- by the reduction using aromatic amines. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 7, p. 209–211, 2005.

TAMAYO, L. et al. Copper-polymer nanocomposites: An excellent and cost-effective biocide for use on antibacterial surfaces. **Materials Science and Engineering C**, v. 69, p. 1391–1409, 2016.

TEOFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

UYGUN, A.; ASLAN, E. Comparative study of conductingpolyaniline/copper and polyaniline/nickelcomposites in the presence of surfactants. **Polymer International**, v. 59, p. 1162 –1167, 2010.

VALEUR, B. **Molecular fluorescence: principles and applications**. New York: Wiley-VCH, 2002.

VAN VECHTEN, J. A. “A simple Man’s view of the Thermochemistry of Semiconductors”. In: MOSS, T. S. **Handbook on Semiconductors**: materials, Properties and preparation. Amsterdam: North-Holland, 1980, v. 3, c. 1, p. 3.

VARGAS, V. M. M. et al. A polianilina no cenário ambiental: uma abordagem sobre fotocatálise heterogênea. **Química Nova**, v. 41, n. 3, p. 315-325, 2018.

VIANA, M. A.; MEOLA, D. T. Curso de Planejamento Experimental. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2007. Disponível em: ftp://mecanica.ufu.br/LIVRE/Duarte/PE/Aula1_05_03_2015/apostila_estatistica_Duarte.pdf. Acesso em: 21 maio 2019.

WAN, M. Polyaniline as a promising conducting polymer. In: _____ **Conducting Polymers with Micro or Nanometer Structure**. China: Tsinghua University, 2008. p. 16-46.

WANG, L. P. et al. Protein adsorption under electrical stimulation of neural probe coated with polyaniline. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 80, p. 72–78, 2010.

WANG, N. et al. Synthesis of Fluorescent Copper Nanoparticles and Ultrasensitive Free Label Detection of Ag+. **Journal of Nanomaterials,** p. 1–5, 2019.

Wang, Y. et al. Processable colloidal dispersions of polyaniline-based copolymers for transparent electrodes. **Polymer Chemistry**, v. 4, n. 17, p. 4814, 2013.

WEI, Y. et al. A study of the mechanism of aniline polymerization. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 27, p. 2385-96, 1989.

WILLIAMS, A. T. R.; WINFIELD, S. A.; MILLER, J. N. Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer. **Analyst**, v. 108, p. 1067, 1983.

WOUTERS, F. S.; ESPOSITO, A. Quantitative analysis of fluorescence lifetime imaging made easy. **HFSP Journal**, v. 2, 1, p. 7–11, 2008.

XIAOMIAO, F. et al. (2006) Polyaniline/Au Composite Hollow Spheres: Synthesis, Characterization, and Application to the Detection of Dopamine. **Langmuir**, v. 22, p. 4384-4389.

XINGYOU, L. Three-dimensional bicontinuous nanoporous Au/polyaniline hybrid films for high-performance electrochemical supercapacitors. **Power Sources**, v. 197, p. 325, 2012.

ZHENG, K. et al. Specifically Grafting Hematin on MPTS-Coated Carbon Nanotubes for Catalyzing the Oxidation of Aniline**. Catalysts**, v. 6, n.8, p. 123, 2016.

ZOPPI, R. A.; DE PAOLI, M. A. Aplicações tecnológicas de polímeros intrinsecamente condutores: perspectivas atuais. **Química Nova**, v.16, n. 23, p. 560-569, 1993.

ANEXO A - POLÍMEROS CONDUTORES

Polímeros são macromoléculas formadas por unidades menores repetidas (os monômeros) que se ligam umas às outras através de uma reação de polimerização. Seu uso tem possibilitado muitos avanços na indústria, face à grande variedade de suas propriedades, como, por exemplo, uma grande resistência a agentes químicos e biológicos, boa flexibilidade, facilidade de serem moldados e poderem atuarem como isolantes (SEYMOUR & KIRSHENBAUM,1986). De fato, por muito tempo os polímeros foram usados como isolantes térmicos e elétricos, até que pela incorporação de cargas condutoras (negro de fumo, fibras metálicas ou fibra de carbono) puderam passar a apresentar propriedades elétricas, nos assim chamados “polímeros condutores extrínsecos” (FILHO, 2000).

Uma classe de especial importância é a dos polímeros orgânicos, materiais em geral formados por cadeias basicamente de carbono e hidrogênio, e que podem ser encontrados em grande parte da estrutura dos seres vivos, do que são exemplos moléculas importantes como a celulose, o DNA e proteínas. Em 1976, no laboratório de Hideki Shirakawa, do Instituto de Tecnologia de Tóquio, o primeiro polímero orgânico condutor intrínseco foi acidentalmente produzido, pela adição fortuita de uma quantidade 1000 vezes maior de catalisador que o usualmente adotado para a síntese do poliacetileno. Um filme prateado lustroso e parecido com uma folha de alumínio foi assim formado, ao invés do pó preto esperado (SHIRAKAWA et al., 1977). Surgia então uma nova classe de materiais, que apresentavam propriedades elétricas comparáveis a aquelas dos semicondutores: os polímeros condutores. Esses polímeros são moléculas conjugadas que possuem uma sequência de ligações simples e duplas alternadas, ou segmentos conjugados acoplados com átomos com orbitais p que podem permitir uma superposição contínua da densidade eletrônica π (por exemplo, N, S) (ALLEN et al., 1989).

Assim como os metais têm alta condutividade devido à livre movimentação de elétrons através de sua estrutura, os polímeros condutores devem possuir não apenas portadores de carga, mas também uma estrutura que permita a movimentação relativamente livre desses portadores ao longo da cadeia. A grande quantidade de átomos em uma molécula polimérica faz com que os níveis de energia do sistema estejam muito próximos, resultando em uma distribuição quase contínua de estados,

formando bandas de energia (ATKINS & JONES, 2012). Cada ligação dupla carbono-carbono (C=C) contém tanto uma ligação sigma (σ) quanto uma pi (π). A ligação sigma é mais forte e localizada, unindo covalentemente os átomos de carbono, de modo a criar a espinha dorsal da molécula, com seus elétrons fortemente localizados. Já a ligação π é menos localizada e polarizável, podendo seus elétrons se deslocalizarem por uma maior extensão da cadeia. A existência de elétrons π nos polímeros conjugados que apresentam propriedades condutoras é essencial, uma vez que alguns destes elétrons π (cuja energia de ligação é muito menor que a dos elétrons sigma) podem ser excitados, gerando defeitos estruturais que possibilitam o movimento dos portadores de carga que caracteriza a condutividade (BÄSSLER, 1993; HAUFF, 2011)

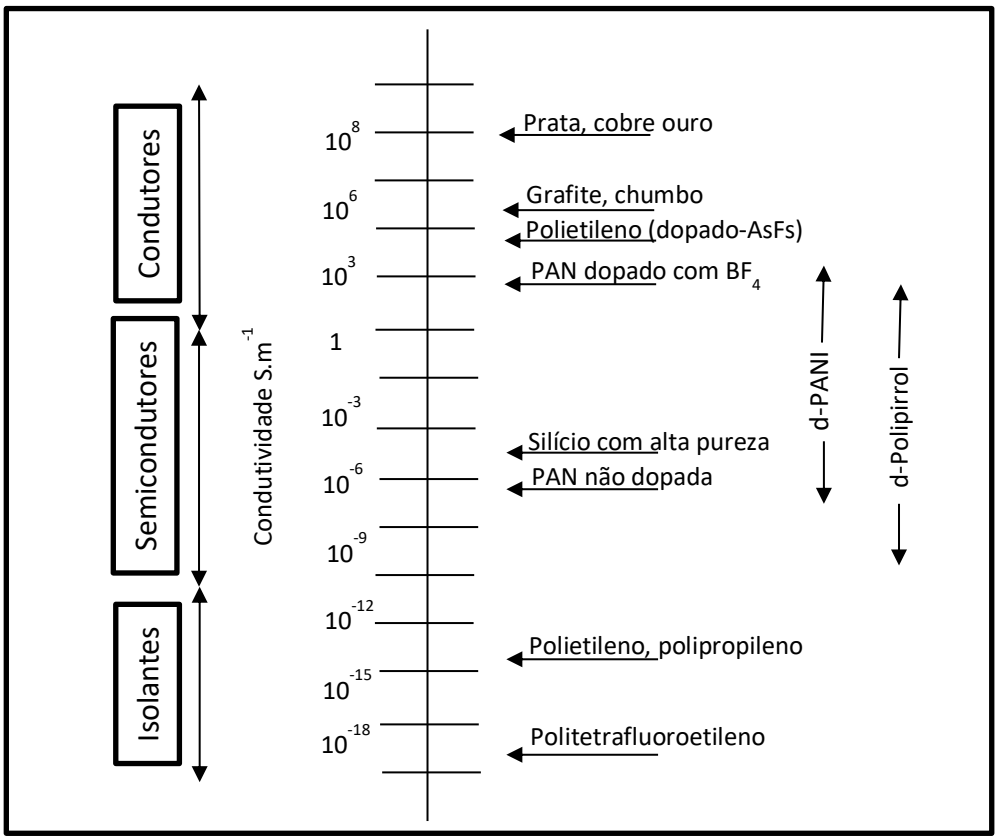
Em teoria, pode-se esperar que um sistema unidimensional, como um polímero conjugado, se comporte como metal unidimensional (LITTLE, 1964). Na prática, porém, esse não é o caso, uma vez que esses sistemas são sujeitos à instabilidade de Peierls, segundo a qual deformações elásticas na cadeia polimérica devem levar a uma redução na energia total do sistema, causando o aparecimento de um *gap* de energia na estrutura eletrônica (KITTEL, 2005).

Shirakawa, Heeger e MacDiarmid observaram que, ao submeter o filme de poliacetileno (Fig. 37) obtido a vapores de iodo, sua condutividade poderia ser aumentada em até 10 ordens de grandeza (CHIANG et. al., 1977; SHIRAKAWA, et. al., 1977). Essa descoberta serve de marco inicial para a pesquisa sobre polímeros intrinsecamente condutores (BÄUERLE, 1993). Descobriu-se então que, ao passar o poliacetileno por um processo de oxirredução de elétrons – no caso, o processo é também chamado de dopagem ou desdopagem – o polímero poderia variar drasticamente seu nível de condutividade. Isso torna os polímeros condutores uma classe muito interessante de semicondutores orgânicos, que através da dopagem podem ter seu nível de condutividade alterado de isolante a metálico.

Esse processo de oxirredução induz uma transição do tipo isolante/condutor, que é associada ao transporte de íons para o interior e para o exterior da matriz polimérica, como forma de compensar a carga positiva ou negativa oriunda da dopagem do polímero (com esses íons sendo chamados de contra-íons) (DE PAOLI, 1999). A Fig. 34 mostra a comparação da condutividade de alguns polímeros condutores dopados

e não dopados com aquela de materiais condutores e semicondutores bastante usados na indústria.

Figura 34 – Diagrama da ordem de grandeza da condutividade dos materiais.

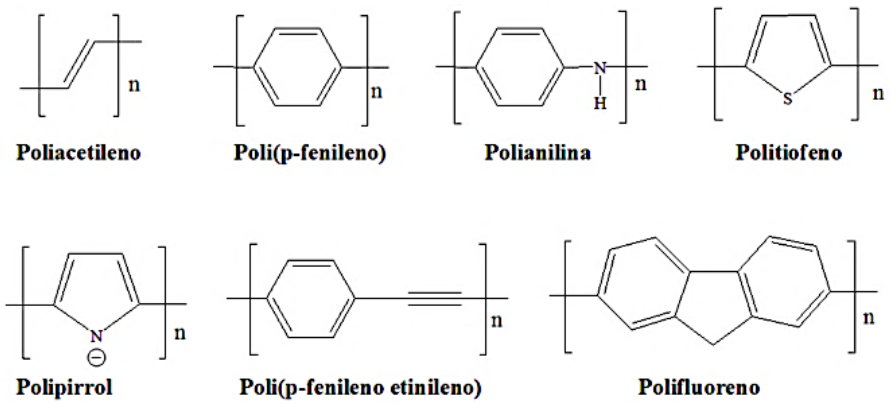


Fonte: MACDIARMID (2001).

Nessa área, o termo dopagem é usado em referência aos semicondutores inorgânicos cristalinos, muito embora os processos não ocorram da mesma maneira. Nos polímeros, as impurezas são introduzidas nas vizinhanças da estrutura polimérica e não diretamente na estrutura, o que causa o surgimento de deformações e defeitos carregados e localizados, que são responsáveis pelo aumento da condutividade do polímero. Por sua vez, a concentração de impurezas pode alcançar valores de até 50% em massa, diferentemente do caso dos semicondutores inorgânicos, para os quais essa concentração está na casa de ppm (VECHTEN, 1980; MANYALA et al., 2008).

Na Fig. 35 são mostradas as famílias de polímeros intrinsecamente condutores mais estudados, e que são atualmente os mais utilizados, dentre eles o poliacetileno, polipirrol, polianilina e o politiofeno (LIMA et al., 2018).

Figura 35 - Representação dos polímeros condutores mais estudados atualmente.



Fonte: (LIMA et al., 2018)

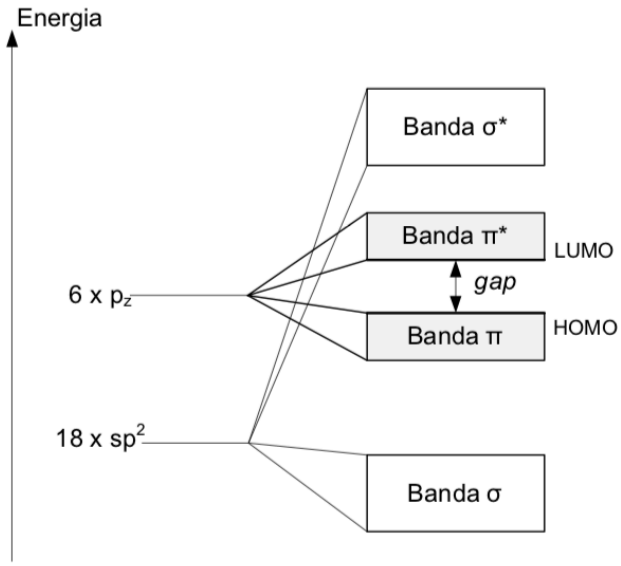
A primeira tentativa explicação para a condutividade elétrica dos polímeros condutores foi feita com base na adotada para o caso dos semicondutores inorgânicos, através do modelo das bandas. Nesse modelo, bandas eletrônicas contínuas se formam devido à interação entre os orbitais moleculares da grande cadeia polimérica, os quais possuem energia muito semelhante entre si (BRÉDAS & STREET, 1987). Os orbitais moleculares π formariam uma banda quase contínua, chamada de banda de valência, representando a banda eletrônica de maior energia ocupada. Já os orbitais moleculares não ligantes π* formariam uma banda também quase contínua chamada de banda de condução, criando a banda eletrônica de menor energia desocupada. Essas duas bandas seriam separadas por uma faixa de energia proibida, chamada de *band gap*, cuja largura determina as propriedades intrínsecas do material (FAEZ et al., 2000; ATKINS & JONES, 2012).

Baseado nos semicondutores, ao ocorrer uma dopagem da cadeia polimérica de tipo p haveria a ausência de elétrons, com a criação de lacunas na banda de valência; já uma dopagem do tipo n levaria à adição de elétrons próximo a banda de condução. Assim, a depender do tipo de impurezas adicionadas, se são doadores ou aceitadores de elétrons, o nível de Fermi do semicondutor (o estado de energia abaixo do qual

todos os estados de energia permitidos são preenchidos e acima do qual todos os estados estão vazios) é capaz de se deslocar para cima ou para baixo em relação a sua posição original no centro do gap da banda de energia, surgindo assim níveis localizados no *band gap*. Esses níveis de energia criados facilitam o fluxo de elétrons e permitem a ocorrência da condução.

Em ambos os casos, o fluxo de carga entre os sítios das impurezas adicionadas se tornaria possível. Neste caso, a interação entre os orbitais ligantes π se assemelharia à banda de valência e a interação entre os orbitais antiligantes π* se assemelha à banda de condução dos semicondutores inorgânicos, conforme ilustrado na Fig. 36.

Figura 36 - A superposição entre os orbitais π e a superposição entre os orbitais π* dos átomos de carbono resultam em uma distribuição de estados eletrônicos que se assemelha a uma estrutura de bandas. Formação do HOMO e LUMO.



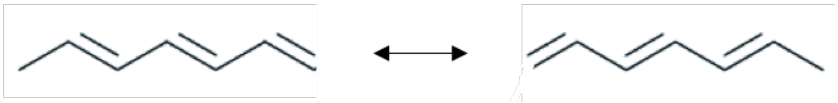
Fonte: adaptado de DE DEUS (2008).

Entretanto, o modelo de bandas unidimensional não explica o fato de que no caso dos polímeros condutores (em especial, no trans-poliacetileno), a condutividade elétrica não está associada à existência de elétrons deslocalizados (portanto, com spin ½), mas sim a portadores de carga de spin zero (BRÉDAS & STREET, 1987). Por consequência, um novo modelo teve de ser formulado com base na existência de defeitos na cadeia, os quais surgiriam durante a polimerização e corresponderiam a

radicais não dopados. Esse defeito, chamado de sóliton, leva ao aparecimento de um nível eletrônico semipreenchido com um elétron no meio do band gap.

A Fig. 37 mostra duas estruturas diferentes para o trans-poliacetileno (A e B), que se diferenciam apenas pela mudança na alternância entre ligações duplas e simples do carbono-carbono ao longo da cadeia. Ambas possuem a mesma energia devido a deslocalização da ligação π, de modo que uma estrutura pode facilmente se converter na outra.

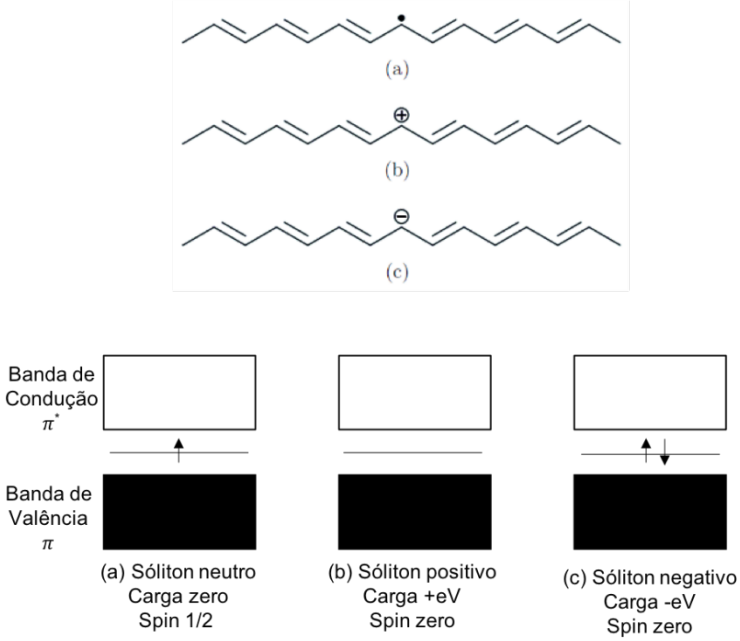
Figura 37 - Trans-poliacetileno, estruturas A e B.



Fonte: BREDAS et al. (1984).

Quando essa deslocalização dos elétrons π causa a passagem da estrutura A para a B, defeitos chamados de sólitons, Fig. 38, podem ocorrer. O sóliton no trans-poliacetileno pode ser denotado como uma parede de domínio unidimensional que marca a separação e a passagem gradual entre as duas estruturas do estado fundamental ao longo de uma cadeia. Uma característica muito importante é que a presença de um sóliton provoca o aparecimento de um nível eletrônico localizado no meio do gap de energia, ou seja, ~ 0,7 eV acima do topo da banda de valência (BV) (BREDAS et al., 1984).

Figura 38 – Representação do Sóliton na estrutura do trans-poliacetileno.



Fonte: adaptado de BRÉDAS & STREET (1987).

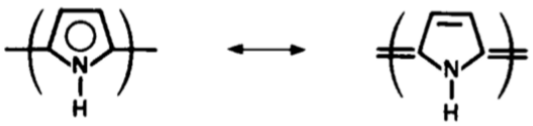
A Fig. 38 mostra a representação do sóliton na estrutura das bandas de energia para o trans-poliacetileno: em (a), temos um defeito deslocalizado denominado sóliton neutro, o qual cria um nível de energia semipreenchido com um elétron no meio da região do gap. Mediante processos de oxidação ou redução, é possível adicionar ou remover elétrons, dando origem a sólitons sem spin, como o sóliton positivo (b) ou o sóliton negativo (c) (ZOPPI & DE PAOLI, 1993). Sólitons carregados devem ser vistos simplesmente como ânions (dopagem tipo n) ou cátions (dopagem tipo p) poliméricos associados a um relaxamento local da geometria da cadeia, cujo estado eletrônico está localizado no meio do gap (BRÉDAS & STREET, 1987).

Ocorre, no entanto, que o modelo baseado em sólitons explica somente a condução em polímeros cujo estado fundamental é degenerado. Para polímeros que possuem o estado fundamental não degenerado, como o polipirrol (PPY), o politiofeno (PT), a polianilina (PANI) e outros polímeros heterocíclicos, o conceito físico mais aceito é o que envolve a formação de quase-partículas chamadas de pólarons e bipólarons. Essas quase-partículas, que estão associadas a níveis de energia localizados entre a banda de condução e a banda de valência, se encontram relativamente estão livres para se movimentar ao longo da cadeia polimérica,

respondendo pelo observado alto grau de condutividade elétrica (BREDAS et al., 1984; BRÉDAS & STREET, 1987).

A geometria do estado fundamental desses polímeros corresponde a uma estrutura aromática, com anéis e ligações simples entre os anéis. Uma outra estrutura de ressonância possível é a quinóide, onde as ligações entre os anéis têm um caráter duplo mais fortemente ligado. Ambas estruturas podem ser vistas na Fig. 39. A forma ressonante quinóide tem uma energia total maior que a forma aromática, de modo que devido a essa diferença de energia entre as formas ressonantes fundamentais não é possível o surgimento de um sóliton que separe as duas estruturas do estado fundamental.

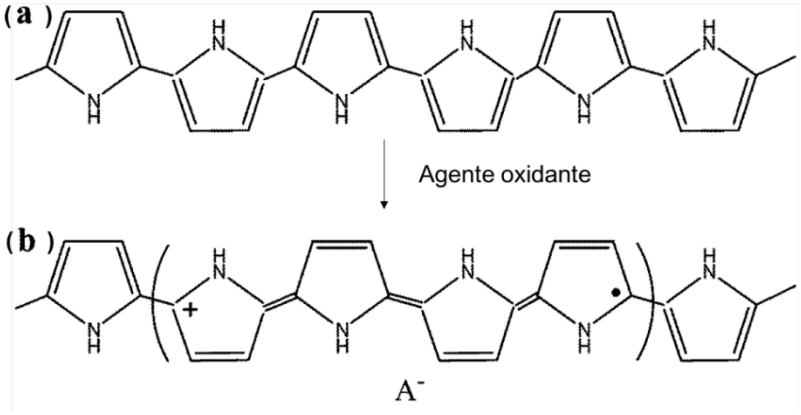
Figura 39 - Estrutura aromática a esquerda e a quinóide a direita.



Fonte: Adaptado de BREDAS et al. (1984).

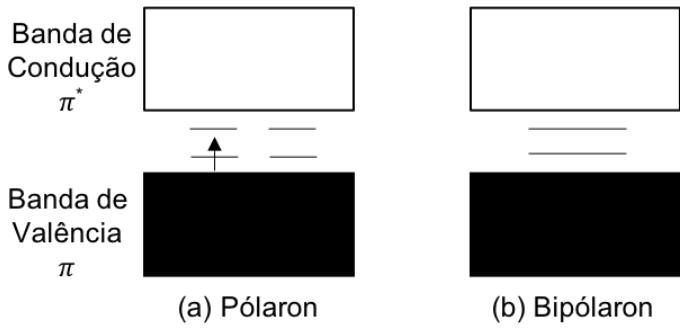
Quando se tem baixos níveis de dopagem, as cargas transferidas através da cadeia podem ser acomodadas de duas maneiras, ou como um sóliton carregado ou como um íon-radical que causa um relaxamento da geometria local, ou seja, um pólaron. O íon-radical surge quando um dos sólitons de um par sofre “dopagem tipo p”, como representado na Fig. 40. Os pólarons têm spin 1/2 e também podem ser descritos como o resultado da interação entre um par sóliton carregado de spin 1/2 e uma carga positiva sem spin (sóliton positivo) (BREDAS et al., 1984). O pólaron está associado a uma distorção localizada do retículo (que passaria da forma aromática para a forma quinóide e depois retornaria a ela) e à presença de dois estados no gap, um estado de "ligação" ligeiramente acima da borda da banda de valência e um estado antiligante ligeiramente abaixo da borda da banda de condução (FAEZ et al., 2000). Na formação do pólaron, a banda de valência permanece cheia e a de condução vazia, como mostrado na Fig. 41.

Figura 40 - Representação da oxidação do polipirrol e a formação de um pólaron mostrando em (a) sua forma reduzida e em (b) sua forma quinóide no estado pólaron. "A-" representa o contra-íon que equilibra as cargas durante a dopagem.



Fonte: (ZOPPI E DE PAOLI, 1993)

Figura 41 - Modelo das bandas do polímero condutor, mostrando o surgimento de bandas de energia no band gap para o (a) pólaron e (b) bipólaron.

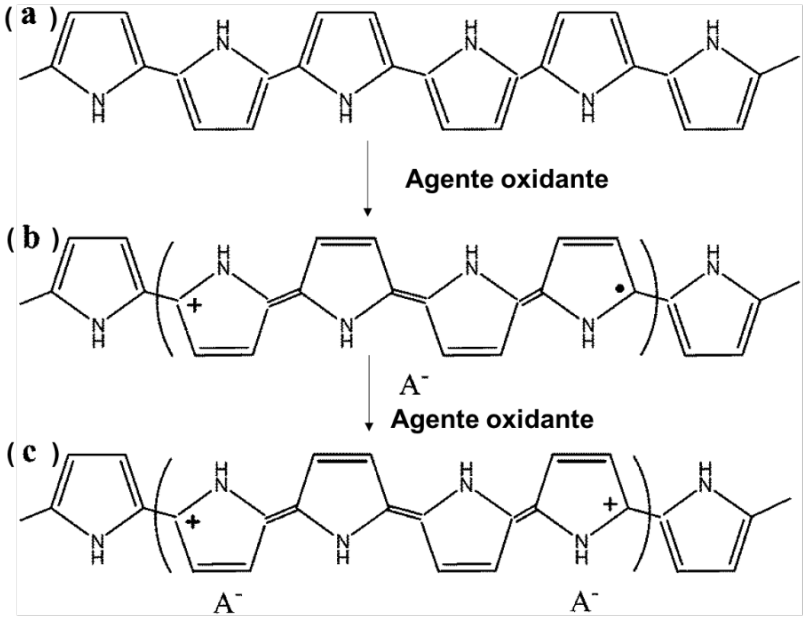


Fonte: Autor

Quando o grau de dopagem é moderado, um segundo elétron pode ser removido da cadeia que já contém um pólaron, causando o surgimento de duas cargas positivas na cadeia, com a formação de um bipólarons (Fig. 42). O bipólaron nada mais é que um par de cargas iguais, ou seja, um dicátion com spin zero, ao qual está associada uma grande distorção do retículo (FAEZ et al., 2000). A formação de um bipólaron é mais estável e termodinamicamente mais favorável que a formação de dois pólarons, pois pólarons adjacentes se tornam instáveis devido à repulsão coulombiana entre as cargas de mesmo sinal, que causa um aumento de energia do sistema. Tem-se que

oxidação adicional é acompanhada pela eliminação dos pólarons e a formação de novos estados de bipólarons (Fig. 41 e 42).

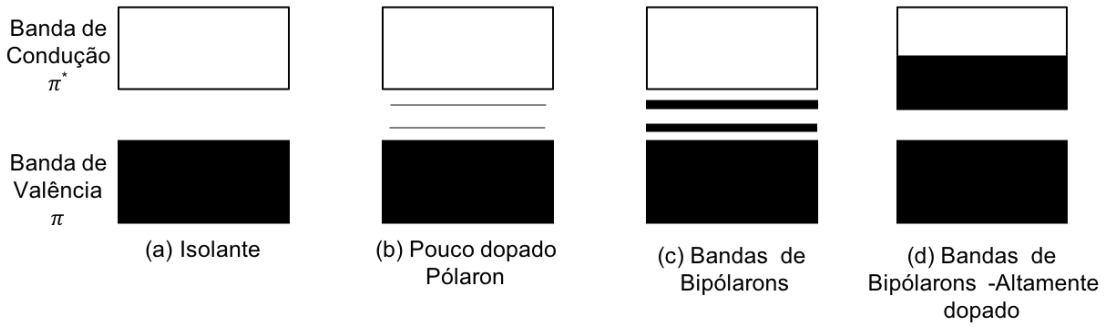
Figura 42 - Dopagem do polipirrol (a) e surgimento dos estados de pólaron (b) e bipólaron (c).



Fonte: (ZOPPI E DE PAOLI, 1993)

Quando se tem um alto grau de dopagem, surgem mais estados de bipólaron e uma banda de bipólarons é criada, conforme mostrado na Fig. 43. Para polímeros conjugados com grandes concentrações de dopantes, os bipólarons dão origem a bandas de energia simetricamente localizadas acima da banda de valência e abaixo da banda de condução, as quais se encontram parcialmente preenchidas, condição necessária para haver condução tipo metálica, segundo a teoria de bandas. Analogamente ao processo de oxidação, a redução de um polímero condutor (dopagem tipo n) leva à formação de cargas negativas, conhecidas como pólarons e bipólarons negativos. Assim como na formação de pólarons/bipólarons positivos, esse processo de dopagem pode ter origem química ou eletroquímica. Em resumo, o excesso de carga criado nas cadeias dos polímeros conjugados através dos processos de oxidação ou redução são acomodados em estados eletrônicos localizados no gap (BREDAS et al., 1984*)*.

Figura 43 – Surgimento de bandas de energia com o aumento do grau de dopagem mudando de (a) isolante para (b) pouco dopado até o surgimento de bandas de bipólaron em (c) e (d).



Fonte: (BREDAS et al., 1984)