



VICTOR COSTA BASSETTO

**EMPREGO DE LIGAS DE COBRE COMO DETECTOR ELETROQUÍMICO DE
AMINOÁCIDOS EM CROMATÓGRAFO DE ÍONS.**

CAMPINAS

2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

VICTOR COSTA BASSETTO

**EMPREGO DE LIGAS DE COBRE COMO DETECTOR ELETROQUÍMICO DE
AMINOÁCIDOS EM CROMATÓGRAFO DE ÍONS.**

ORIENTADOR: PROF. DR. LAURO TATSUO KUBOTA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM QUÍMICA NA
ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
POR VICTOR COSTA BASSETTO, E ORIENTADA PELO PROF.DR. LAURO TATSUO KUBOTA.**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Lucas Gonçalves de Oliveira - CRB 8/8144

B294e Bassetto, Victor Costa, 1986-
Emprego de ligas de cobre como detector eletroquímico de aminoácidos em cromatografo de íons / Victor Costa Bassetto. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Lauro Tatsuo Kubota.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Ligas de cobre. 2. Cromatografia de íons. 3. Detecção amperométrica pulsada. 4. Aminoácidos. I. Kubota, Lauro Tatsuo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Employment of copper alloys for the direct detection of amino acids in ion chromatography

Palavras-chave em inglês:

Copper alloys
Ion chromatography
Pulsed amperometric detection
Amino acids

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Lauro Tatsuo Kubota [Orientador]
Mauro Bertotti
Juliano Alves Bonacin

Data de defesa: 30-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Química

“When I stand before thee at the day’s end, thou shalt see my scars and know that I had my wounds and also my healing.”

Rabindranath Tagore

Aos meus pais, Vladis e Josefa,

Minhas tias e primos.

Por todo o apoio e compreensão ao longo destes anos,

DEDICO.

Agradecimentos

Ao Prof. Lauro pelos muitos ensinamentos ao longo desta trajetória. Desde a oportunidade dada no início me recebendo em seu laboratório até os inúmeros conselhos passados ao longo dos anos necessários para o desenvolvimento deste projeto e acima de tudo, deste aluno.

Ao Sr. Rogério Telles por ter sido a ponte de início deste trabalho e a quem sempre agradeço por ter me apresentado ao Prof. Lauro, bem como pelas inúmeras oportunidades de intercâmbio de ideias ao longo destes anos. Juntamente na Metrohm – Pensalab agradeço ao Sr. Sandro Barrinonuevo, Marcos e Sra. Larissa Zanuni por todo o apoio neste mestrado.

A todos os colegas do LEEDS, que desde Agosto de 2010 a Julho de 2014 ajudaram a construir cada frase desta dissertação. Agradeço muito ao Mestre José Tiago Claudino Barragan “Zé” por toda a base de eletroquímica que me ensinou. Aos, graduando, pós graduando e pós graduados, Murilo Santiago, Cecilia Castro, Ronaldo Timm, Mariana Massafera, Maurício Hilgemann, Leandro Shiroma, Rúbia Sena, Humberto Machado, Leopoldo Ferronato, Maiuí, Camila Maroneze, Alexandre Kisner, Viviane Grassi, Glauco Pilon, Dênio Emanuel, Ananda Xavier, Cátia Crispilho Côrrea e Jailson Cardoso Dias por todos os inúmeros ensinamentos, conselhos e lições. Essa dissertação é nossa, pois cada um de vocês foi responsável por um pouco do que está aqui. Desculpe só se não está perfeita como deve ser.

A todos os colegas da Unicamp de todos os departamentos, que ajudaram de todas e mais variadas formas a realização deste trabalho. Agradeço também aos funcionários que cada um dentre suas possibilidades foram responsáveis pela realização deste trabalho.

Ao Prof. Philip N. Bartlett e seu grupo na University of Southampton, que de braços abertos me receberam e contribuíram de forma imensurável ao desenvolvimento científico e pessoal. A família Cook, Jim, Eileen, David, Daniel and Aidee por ter tão afetuosamente me recebido em minha temporada na Inglaterra.

Agradeço enormemente também aos amigos pessoais, Rafaella Takehara, Douglas “Cazuza” Alencar, Luis Fernando “Zeitona” Macedo di Christofaro, Suellen Alves, Waldermir Paschoalino, Grabiela Patricia Kissling Kemp e Jack Branch por ajudarem a manter a sanidade desde autor. Agradeço enormemente aos amigos Adriana Tahara e Ricardo Ansai, que na fase final desta dissertação foram tão importantes para a preparação desta dissertação, visto que boas páginas desta dissertação foram escritas no hospital Santa Catarina – São Paulo.

Sem esquecer claro de agradecer a minha família que sempre apoiou, muitas vezes sem entender essa escolha de seguir pela pós graduação, e que esteve do meu lado nos bons e não tão bons momentos assim.

A banca examinadora do exame de qualificação e de mestrado. Prof. Mauro Bertotti, Prof. Juliano Alves Bonacin, Prof. Thiago Regis Longo Cesar da Paixão e Prof. Dosil Pereira de Jesus.

À FAPESP pelas bolsas concedidas ao longo desta trajetória.

Curriculum Vitae

INFORMAÇÕES PESSOAIS

Nome: Victor Costa Bassetto

Naturalidade: Santos – São Paulo

Data de Nascimento: 02/05/1986

FORMAÇÃO ACADÊMICA

03/2011 – 06/2014 - Mestrado em Química

Título da dissertação: “Emprego de ligas de cobre para detecção direta de aminoácidos em cromatografia de íons”.

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, processos 2011/04043-0. Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, Campinas, SP.

05/2013 - 10/2013 - Período sanduíche – *University of Southampton* – UK

Título do trabalho: Uso de ferramentas de espectroscopia Raman acoplada a eletroquímica para a investigação dos mecanismos de oxidação de aminoácidos sobre eletrodos de cobre.

Supervisor: Prof. Dr. Phillip N. Bartlett

Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, processos 2013/02849-3. Departamento de Química, Instituto de Química, Univeristy of Southampton, Southampton, Hampshire, UK.

02/2005 – 12/2009 - Graduação – Bacharelado em Ciências Farmacêuticas e Bioquímica.

Modalidade: Alimentos e Nutrição.

Universidade Estadual Paulista, UNESP – Campus Araraquara.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR.

06/2013 – Electrochemistry Summer School – Southampton – UK.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Participação em Projetos de Pesquisa

08/2010 – 03/2011 – Projeto Metrohm – Unicamp.

Título: Química Eletroanalítica em células de Fluxo: Novos Sistemas de Detecção para Cromatografia Líquida e tópicos relacionados.

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Artigo Submetidos

Bassetto, Victor C.; Russell, Andrea E.; Bartlett, Phil N.; Kubota, Lauro T; Preparation of copper sphere segment void templates for electrochemical SERS and their use to study the interaction of amino acids with copper under potentiostatic control. *Electrochimica Acta* – Submetido – Abril/2014.

Prêmios

Prêmio concedido pela ISE - The International Society of Electrochemistry de melhor trabalho na área de eletroanalítica do XIX SIBEE, Abril de 2013 Campos do Jordão, SP.

Resumo

Título: Emprego de ligas de cobre para a detecção direta de aminoácidos em cromatografia de íons.

Autor: Victor Costa Bassetto

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Palavras – chave: ligas de cobre, cromatografia de íons, detecção amperométrica pulsada e aminoácidos.

Esta dissertação apresenta os desenvolvimentos realizados para a aplicação de ligas de cobre como detector de aminoácidos em cromatografia de íons. O trabalho apresenta o desenvolvimento desde estudos eletroquímicos fundamentais, onde a propriedade de metais como ouro, atual padrão para a técnica, e cobre são investigados frente aos aminoácidos. Neste passo a técnica de voltametria cíclica foi escolhida, pois permitiu explorar os vários fenômenos que ocorrem nos processos de óxido redução das moléculas sobre os eletrodos. Uma particularidade do trabalho é o eletrólito, que deve ser também a fase móvel da cromatografia, no caso hidróxido de sódio $0,15 \text{ mol L}^{-1}$. Após o entendimento dos mecanismos básicos de óxido redução dos diferentes aminoácidos sobre os eletrodos de ouro e cobre em meio alcalino, este foi transferido para a aplicação em células de fluxo. Nessa fase observou-se que o cobre puro não apresentava suficiente resistência a corrosão que viabilizasse sua aplicação no sistema de cromatografia de íons. Sendo assim, optou-se pela aplicação do bronze como material sensor. O bronze escolhido possui 86% de cobre em sua composição e após comprovação através de estudos viu-se que o comportamento de óxido redução dos aminoácidos é similar ao cobre puro, porém com vantagens na resistência à corrosão. Também foram desenvolvidos, em conjunto com a University of Southampton, substratos de cobre que apresentam o efeito SERS. Este trabalho foi realizado para permitir a investigação das espécies intermediárias que se formam entre o aminoácido e o cobre (II) formado na superfície do eletrodo. Para a aplicação em fluxo foi necessário o desenvolvimento de pulsos de potencial para viabilizar a detecção dos aminoácidos e aumentar o tempo de vida útil do eletrodo. Após o desenvolvimento os pulsos foram otimizados e o sistema foi utilizado para detecção de valina em amostras de suplemento alimentar.

Abstract

Title: Employment of copper alloys for the direct detection of amino acids in ion chromatography.

Author: Victor Costa Bassetto

Supervisor: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Key-words: copper alloys, ion chromatography, pulsed amperometric detection and amino acids.

This dissertation presents the developments made for the application of copper alloys as detector for amino acids in ion chromatography. The work presents the development from fundamental electrochemistry studies, where properties of metals such as gold, current standard for the technique, and copper where tested against amino acids were performed through cyclic voltammetry technique. This method was chosen for the investigation because it allowed exploring the various phenomena that occur in the oxide reduction processes of the molecules on the electrodes. As a feature of the working electrolyte must also be the mobile phase of the chromatography, where 0.15 mol L^{-1} sodium hydroxide was used. After understanding the basic mechanisms of reduction and oxidation of the different amino acids over gold and copper electrodes in an alkaline medium, the knowledge obtained was transferred to the flow cells. At this time it was observed that the pure copper did not present sufficient resistance to corrosion, limiting its application in ion chromatography system. Thus, we chose the application of brass as sensor material. The chosen brass had 86% copper in its composition and demonstration through the studies, which its redox behavior of the amino acids is similar to those observed on pure copper, but with advantages in corrosion resistance. In addition, copper substrates showing the SERS effect was also developed in conjunction with the University of Southampton. This study was conducted to allow the investigation of intermediary species that are formed between the amino acid and copper (II) on the electrode surface. For application in flow was necessary to develop potential pulses to enable the detection of amino acids and increase the lifetime of the electrode. After the development of the pulses, it was optimized and the system was used for detection of valine in samples of food supplement.

Sumário

Lista de Abreviações	xxi
Lista de Tabelas	xxiii
Lista de Figuras	xxiii
I - Introdução	1
I.1 Aminoácidos.	1
I.2 Análises de aminoácidos.	5
I.3 Modos de detecção de amino ácidos em cromatografia líquida.	6
I.3.1 Detecção indireta de aminoácidos	6
I.3.2 Detecção direta de aminoácidos	7
I.4 Cromatografia de íons.	8
I.5 Detecção amperométrica de aminoácidos.....	10
I.6 Cobre e suas ligas	12
I.7 Raman intensificado com efeito de superfície obtido através de cavidades de segmento esférico.	13
I.8 Motivação	16
II Objetivos	17
II.1 Objetivo Geral.....	17
II.2 Objetivos específicos	17
III – Materiais e Métodos	19
III. 1 Reagentes e soluções	19
III. 2 Equipamentos.....	19
III. 3 Cobre e suas ligas.	20
III. 4 Eletrodos.....	20
III.4.1 – Construção de eletrodos convencionais.....	20

III.4.2 Construção de Célula de fluxo.	21
III.5 – Limpeza do eletrodo	24
III.6 Estudos voltamétricos preliminares.	25
III.7 Estudo do mecanismo de detecção.	25
III.8 Estudo da influência da camada de óxido de cobre.	26
III.9 Estudos em fluxo.	26
III.9.1 Otimização do pulso de potencial	26
III.9.2 Robustez do sistema.....	27
III.9.3 Estabilidade do sistema.	27
III.10 Análise da amostra de suplemento alimentar	27
III. 11 SERS	27
III.11.1 Fabricação dos substratos.	27
III.11.2 Avaliação da profundidade da cavidade.....	28
III.11.3 Medidas de espectroeletroquímica.....	28
IV – Resultados e discussão - Eletrodos de Ouro e Cobre	29
IV.1 – Estudos voltamétricos preliminares	29
IV.2 – Mecanismo de oxidação.....	35
IV.3 – Influência do óxido.....	39
IV.4 Otimização do pulso.	41
IV.5 – Limitações	42
V – Resultados e Discussão Ligas de Cobre	45
V.1 – Caracterização das ligas de cobre.	45
V.2 Estudos voltamétricos preliminares do bronze.	47
V.3 Mecanismo de oxidação do aminoácido no Bronze TM 620.	50
V.4 Estudos em Fluxo.....	51

V.5 Robustez do sistema.....	55
V.6. Análise da amostra.....	56
VI. Resultados e discussão SERS	59
VI.1 Fabricação do substrato	59
VI.1.1 Preparação da cela fina.	59
VI. 1.2 – Deposição das nanopartículas.....	59
VI. 1.3 Eletrodeposição do cobre.	61
VI. 2 Eletrodeposição de cobre.....	61
VI.2.1 Potencial aplicado para eletrodeposição de cobre.....	62
VI.2.2 – Solução de eletrodeposição para o cobre.....	63
VI. 3. Caracterização do Substrato	65
VI.3.1. Profundidade das cavidades e fator de aumento.....	65
VI.3.2 Avaliação do fator de aumento.	71
VI. 4 –Medidas SERS de aminoácidos em substratos SSV de cobre.....	72
VI.4.1 Aminoácidos aromáticos.....	72
VI.4.2 Aminoácidos não aromáticos.....	75
VII – Conclusões	79
VIII Referências.....	81
IX - Perspectivas Futuras	87

Lista de Abreviações

Ag/AgCl	Eletrodo de referência de prata/cloreto de prata.
BCAA	<i>Branched Chain Amino Acids</i> – Aminoácidos de cadeia ramificada.
DMF	N’N dimetilformamida.
EDX	Energia dispersiva de raio X.
mW	Unidade de potência do laser milliwatt ou 10^{-3} watt.
PCA	Potencial de Circuito Aberto.
PEEK	Material termoplástico polimérico constituído de um polímero de éter éter cetona.
PEG	Polietileno Glicol.
PTFE	Politetrafluoroetileno.
SERS	<i>Surface Enhanced Raman Spectroscopy</i> – Espectroscopia Raman com intensificação por efeito de superfície.
SSV	<i>Sphere Segment Void</i> – Substrato de cavidades esféricas.
XRF	Fluorescência de raio X.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Comparação das concentrações dos elementos majoritários presentes na liga Bronze TM 23 utilizada para a fabricação dos eletrodos.	45
Tabela 2: Comparação das concentrações dos elementos majoritários presentes na liga Bronze TM 620 utilizada para a fabricação o dos eletrodos	46
Tabela 3 Atribuição de picos para o benzenotiol, conforme o trabalho de Abdelsalam et al. (34)	72
Tabela 4 Atribuição de picos para ao triptofano.	75
Tabela 5 Atribuição de picos para serina.	77

Lista de Figuras

Figura 1 Estrutura básica do aminoácido com destaque em azul para o carbono α e em vermelho para o grupo R.....	2
Figura 2 Aminoácidos que apresentam o grupo R não-polares e alifáticos.	2
Figura 3 Aminoácidos que apresentam o grupo R aromáticos.....	3
Figura 4 Aminoácidos que apresentam o grupo R não-carregados mas polares....	3
Figura 5 Aminoácidos que apresentam o grupo R carregados positivamente.	3
Figura 6 Aminoácidos que apresentam o grupo R carregados negativamente.	4
Figura 7 Esquema ilustrativo da instrumentação necessária para realização da derivatização pós coluna em cromatógrafos líquidos.....	6
Figura 8 Ilustração da reação que ocorre entre a ninidrina e a amônia proveniente da oxidação desaminativa dos aminoácidos. (16).....	7
Figura 9 Estrutura de uma resina de troca catiônica, onde R é substituído pelo polímero que forma a resina. Adaptada da referência (17).	9

Figura 10 Pulso de potencial desenvolvido para a detecção de aminoácidos. Adaptado a partir da referência (24).....	11
Figura 11 Canhão de artilharia do navio britânico Mary Rose que afundou em 1545 e recuperado em 1982. Foto do arquivo pessoal. Museu Naval Portsmouth – Agosto de 2013.	14
Figura 12 Eletrodos convencionais utilizados no trabalho.....	21
Figura 13 Esquema ilustrativo da célula de fluxo empregada no cromatógrafo de íons.	22
Figura 14 Fotos dos eletrodos utilizados na célula de fluxo no cromatógrafo de íons. Tem-se a seguinte geometria na célula de fluxo, o eletrodo de trabalho fica no centro, circundado pelo eletrodo auxiliar, o eletrodo de referência está localizado na outra metade da célula. Há na figura a célula de comercial com eletrodo de trabalho em ouro, a célula não comercial com eletrodo de cobre e bronze TM 620. Destaque para as células de bronze onde a célula A tem o eletrodo auxiliar com 3 mm de profundidade e a célula B com 1,5mm.	23
Figura 15 Fotos dos eletrodos utilizados na célula de fluxo no cromatógrafo de íons. Tem-se as células não comerciais com eletrodos de trabalho em bronze TM 620, com eletrodo auxiliar com profundidade de 1,5mm e material externo em PTFE e PEEK.....	24
Figura 16 Célula de espectroeletroquímica desenvolvida na Unicamp. Em (A) tem-se a célula aberta com o substrato exposto e em (B) a célula fechada e conectada pronta para uso.	28
Figura 17 Perfil de corrente em função do potencial, eletrodo de ouro em hidróxido de sódio 0,1 mol L ⁻¹ , varredura iniciando em 0 V e velocidade de 100 mV s ⁻¹	29
Figura 18 Perfil da corrente em função do potencial para o eletrodo de ouro em meio de hidróxido de sódio 0,1 mol L ⁻¹ (em preto) e na presença de glicina (em vermelho) com a varredura iniciando em 0 V e velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹	30

Figura 19 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de ouro em meio de hidróxido de sódio 0,1 mol L ⁻¹ com a varredura iniciando em 0V e velocidade de varredura de 10 mV s ⁻¹ . Medidas realizadas com glicina e serina.	31
Figura 20 Estruturas moleculares: a) Serina com destaque ao grupo R, b) Glicina.	32
Figura 21 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de cobre em meio de hidróxido de sódio 0,1 mol L ⁻¹ com a varredura iniciando em 0V e velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹	33
Figura 22 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de cobre em meio de hidróxido de sódio 0,1 mol L ⁻¹ (em preto) e na presença de glicina (em vermelho) com a varredura iniciando em 0 V e velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹	34
Figura 23 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de cobre em meio de hidróxido de sódio 0,1 mol L ⁻¹ com a varredura iniciando em 0 V e velocidade de varredura de 10 mV s ⁻¹ . Medidas realizadas com glicina e seria. ..	35
Figura 24 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de cobre em meio de hidróxido de sódio 0,1 mol L ⁻¹ com a varredura iniciando em 0 V e velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹ . Em destaque região onde ocorre a formação do complexo aminoácido – cobre.	36
Figura 25 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de ouro em meio de hidróxido de sódio 0,1 mol L ⁻¹ com a varredura iniciando em -0,4 V e velocidade de varredura de 10 mV s ⁻¹ . Medidas realizadas com glicina e seria. Faixa de potencial onde ocorre a complexação entre o aminoácido e cobre.	37
Figura 26 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de cobre em meio de hidróxido de sódio 0,1 mol L ⁻¹ com a varredura iniciando em 0 V e velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹ . Em destaque região onde ocorre a oxidação do aminoácido.	38
Figura 27 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de ouro em meio de hidróxido de sódio 0,1 mol L ⁻¹ com a varredura iniciando em 0 V e velocidade de	

varredura de 10 mV s^{-1} . Medidas realizadas com glicina e serina. Faixa de potencial onde ocorre a oxidação do aminoácido.....	39
Figura 28 Intensidade do sinal em função do tempo de oxidação do cobre.....	40
Figura 29 Pulso de potencial desenvolvido.	42
Figura 30 Cromatogramas obtidos em célula de fluxo com eletrodo de trabalho em cobre, tendo como eluente hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção amperométrica pulsada conforme pulso apresentado na Figura 29.	43
Figura 31 – Fotografia retirada após a abertura da célula de fluxo.	44
Figura 32 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de bronze TM 620 em meio de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a varredura iniciando em 0 V e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}	47
Figura 33 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de bronze TM 620 em meio de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (em preto) e na presença de glicina (em vermelho) com a varredura iniciando em 0 V e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}	48
Figura 34 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de bronze TM 23 em meio de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a varredura iniciando em 0 V e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}	49
Figura 35 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de bronze TM 23 em meio de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (em preto) e na presença de glicina (em vermelho) com a varredura iniciando em 0 V e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}	50
Figura 36 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de ouro em meio de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a varredura iniciando em 0 V e velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} . Medidas realizadas com glicina e serina. Faixa de potencial onde ocorre a oxidação do aminoácido.....	51
Figura 37 Pulso de potencial otimizado para detecção de aminoácido com a liga de cobre.	52

Figura 38 Célula de fluxo com eletrodo de trabalho com 3 mm de diâmetro. Destaque para a região amarela no centro do eletrodo de trabalho, indicando o local onde o fluxo atinge o eletrodo.	53
Figura 39 Célula com eletrodo de trabalho de 1 mm de diâmetro.	53
Figura 40 Cromatogramas obtidos em sequencia com concentração crescente dos componentes da amostra. Vazão $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, fase móvel hidróxido de sódio $0,15\text{ mol L}^{-1}$ com acetato de sódio $0,1\text{ mol L}^{-1}$. Detecção amperométrica pulsada sobre eletrodo de bronze de 1 mm de diâmetro. As concentrações utilizadas são, em azul $1,0\cdot 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$, $1,0\cdot 10^{-2}\text{ mol L}^{-1}$ e $1,0\text{ mol L}^{-1}$ de valina, leucina e isoleucina respectivamente. Em verde: $2,5\cdot 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$, $2,0\cdot 10^{-2}\text{ mol L}^{-1}$ e $2,5\text{ mol L}^{-1}$ de valina, leucina e isoleucina respectivamente. Em vermelho: $3,75\cdot 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$, $3,0\cdot 10^{-2}\text{ mol L}^{-1}$ e $3,75\text{ mol L}^{-1}$ de valina, leucina e isoleucina respectivamente. Em amarelo: $5,0\cdot 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$, $4,0\cdot 10^{-2}\text{ mol L}^{-1}$ e $5,0\text{ mol L}^{-1}$ de valina, leucina e isoleucina respectivamente.	54
Figura 41 Curva de calibração para a valina.	57
Figura 42 Cromatograma de uma amostra de BCAA. Vazão 1 mL min^{-1} , fase móvel hidróxido de sódio $0,15\text{ mol L}^{-1}$ com acetato de sódio $0,1\text{ mol L}^{-1}$. Detecção amperométrica pulsada sobre eletrodo de bronze de 1 mm de diâmetro.	58
Figura 43 Esquema para preparação da célula para deposição das nanopartículas.	59
Figura 44 Compartimento fino preparado com o filme de nanopartículas formado.	60
Figura 45 – Ilustração gráfica dos filme após eletrodeposição de cobre (A) e dissolução das nanopartículas (B).	61
Figura 46 Imagem de microscopia eletrônica de varredura do substrato de cobre após a eletrodeposição a partir da solução de $0,1\text{ mol L}^{-1}$ de sulfato de cobre. Em A vê-se a imagem com $1000\times$ de aumento, B $8000\times$, C $8000\times$ com medida do tamanho da cavidade formado e em D $10000\times$ com as medidas de tamanho das cavidades formadas.	63

Figura 47 Imagem de microscopia eletrônica de varredura do substrato de cobre após a eletrodeposição a partir da solução de $0,1\text{mol L}^{-1}$ de sulfato de cobre com PEG e KCl. Em A vê-se a imagem com 1200x de aumento, B 1500x, C5000x e em D 6500x.	64
Figura 48 Imagem de microscopia eletrônica de varredura do substrato de cobre após a eletrodeposição a partir da solução de $0,1\text{mol L}^{-1}$ de sulfato de cobre com PEG e KCl. Em A vê-se a imagem com 12000x de aumento, B 12000x com medida de tamanho das cavidades, C15000x e em D15000x com medida do tamanho da cavidade.	65
Figura 49 Espectro Raman do substrato de cobre puro. Tempo de aquisição de 10 segundos. Laser de 633 nm com potencial de 3mW.....	66
Figura 50 Espectros Raman obtidos para benzenotiol sobre o substrato SSV de cobre. 10 segundos de acumulação com um laser de 633 nm com potência de 10 mW.....	67
Figura 51 Imagem de microscopia eletrônica de varredura do substrato de cobre após a eletrodeposição a partir da solução de $0,1\text{mol L}^{-1}$ de sulfato de cobre com PEG e KCl. Em A vê-se a imagem com 1200x de aumento, B 1500x, C5000x e em 6500x.	68
Figura 52 Imagem de microscopia eletrônica de varredura do substrato de cobre, referente a região 3, após a eletrodeposição a partir da solução de $0,1\text{mol L}^{-1}$ de sulfato de cobre com PEG e KCl. Em A vê-se a imagem com 1200x de aumento, B 5000x, C 15000x e em 15000x com medida do tamanho das cavidades obtidas.	69
Figura 53 Imagem de microscopia eletrônica de varredura do substrato de cobre, referente a região 5, após a eletrodeposição a partir da solução de $0,1\text{mol L}^{-1}$ de sulfato de cobre com PEG e KCl. Em A vê-se a imagem com 1200x de aumento, B 5000x, C 15000x e em 15000x com medida do tamanho das cavidades obtidas.	70
Figura 54 Imagem de microscopia eletrônica de varredura do substrato de cobre, referente a região 7, após a eletrodeposição a partir da solução de $0,1\text{mol L}^{-1}$ de	

sulfato de cobre com PEG e KCl. Em A vê-se a imagem com 1200x de aumento, B 5000x.	70
Figura 55 molécula de benzenotiol.....	71
Figura 56 molécula do triptofano.	72
Figura 57 Degraus de potencial usados para a obtenção do espectro do triptofano no substrato SSV de cobre.....	73
Figura 58 Espectros obtidos para o triptofano em substrato SSV de cobre. Tempo de aquisição de 10 segundos com laser de 633 nm, potencial aplicado no eletrodo é dado no inserto do gráfico com valores expressos em função do eletrodo de referência de Ag AgCl em KCl saturado. Concentração de triptofano de $7,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	74
Figura 59 A) glicina B) serina.	76
Figura 60 Espectros obtidos para glicina e serina sobre o substrato SSV de cobre. Tempo de aquisição de 10 segundos com laser de 633 nm, potencial aplicado sobre o eletrodo de trabalho de $-0,65 \text{ V}$ vs Ag AgCl em KCl saturado. Concentração de glicina $9,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e serina $7,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	76

I - Introdução

I.1 Aminoácidos.

Os aminoácidos primários são tidos como os blocos construtores das proteínas, ou seja eles são os monômeros que constituem este polímero. A polimerização de aminoácidos ocorre como resultado da desidratação dos aminoácidos que se ligam de forma covalente ao aminoácido vizinho. Devido à importância biológica das proteínas, entender, qualificar e quantificar os seus blocos constituintes é de grande importância para o desenvolvimento tecnológico e biotecnológico.

Primeiramente será apresentada a estrutura fundamental dos aminoácidos. Os aminoácidos são moléculas que têm como estrutura química fundamental um grupo carboxila e um grupo amino, ligados ao mesmo átomo de carbono, neste caso o carbono α , como apresentado na Figura 1. Os aminoácidos diferem entre si por suas cadeias laterais ou grupo R, os quais variam em estrutura, tamanho e carga elétrica e influenciam a solubilidade do amino ácido em água. Existem 20 aminoácidos primários e inúmeros outros que são obtidos a partir de reações químicas ou bioquímicas. Para todos os aminoácidos primários, exceto a glicina, o carbono α liga-se a quatro grupos substituintes diferentes: um grupo carboxila, um grupo amino, um grupo R e um átomo de hidrogênio.

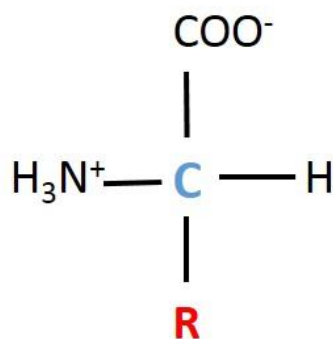


Figura 1 Estrutura básica do aminoácido com destaque em azul para o carbono α e em vermelho para o grupo R.

Através de características comuns do grupo R é possível diferenciar os 20 aminoácidos primários e 5 classes. As classes em função dos grupos R são; grupos R não polares e alifáticos Figura 2, grupos R aromáticos Figura 3, grupos R não-carregados, mas polares Figura 4, grupos R carregados positivamente Figura 5 e grupos R carregados negativamente Figura 6. Mesmo com esta primeira classificação; existem ainda características comuns a mais de uma molécula de uma mesma classe. Portanto a identificação e quantificação individual de um dado aminoácido proveniente, por exemplo, de uma hidrólise de proteínas não é algo trivial. Tanto que a identificação dos aminoácidos iniciou-se em 1806 e teve seu fim somente em 1938(1).

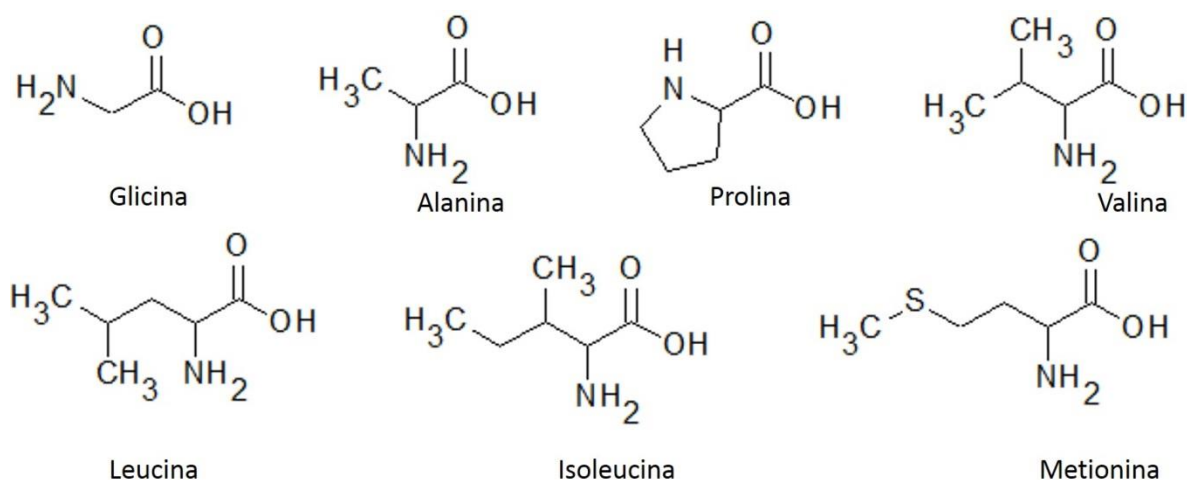


Figura 2 Aminoácidos que apresentam o grupo R não-polares e alifáticos.



Figura 3 Aminoácidos que apresentam o grupo R aromáticos

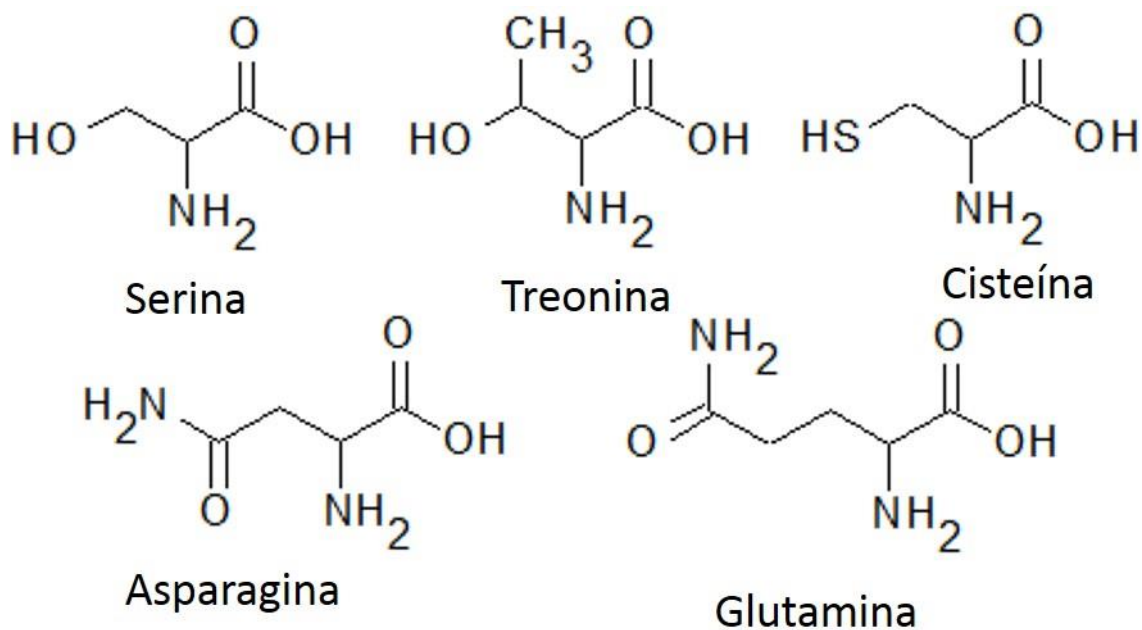


Figura 4 Aminoácidos que apresentam o grupo R não-carregados mas polares.

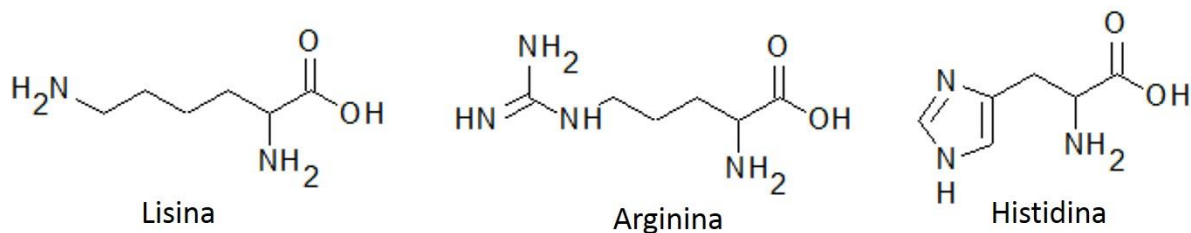


Figura 5 Aminoácidos que apresentam o grupo R carregados positivamente.

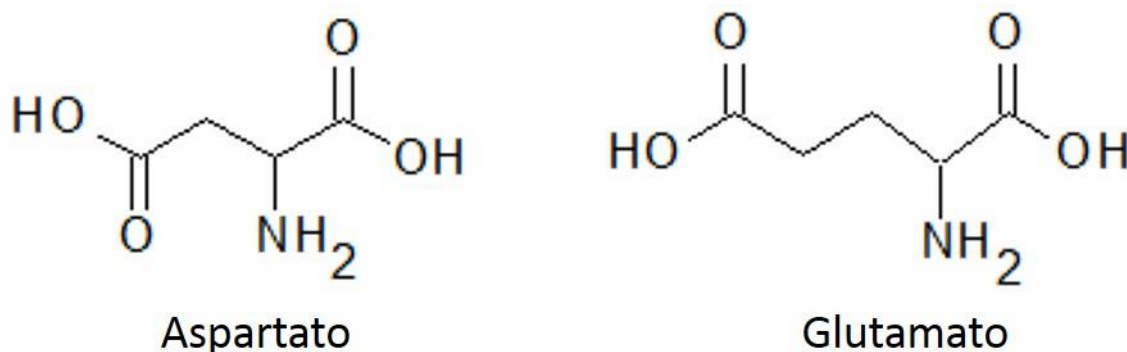


Figura 6 Aminoácidos que apresentam o grupo R carregados negativamente.

Uma segunda possível forma de identificação seria a separação através do ponto isoelétrico de cada aminoácido, visto que em diferentes valores de pH os aminoácidos estariam carregados ou neutros em função de sua estrutura básica e grupos R. Porém, os aminoácidos têm pontos isoelétricos muito próximos, principalmente dentro de um mesmo de grupo R. Tomando como exemplo a faixa de pH entre 5 e 7, temos nesta faixa o ponto isoelétrico de 15 dos 20 aminoácidos.

Sendo assim, outros parâmetros devem ser investigados para a detecção individual dos aminoácidos. Uma alternativa seria o uso de espectrofotometria, portanto identificar os aminoácidos através do comprimento de onda na qual a absorção de luz seja diferente. Contudo, devido às similaridades estruturais as faixas onde ocorre a absorção também são similares. Considerando métodos alternativos aos métodos espectrofotométricos temos os métodos eletroquímicos. Como apresentado no trabalho de Silva e colaboradores (2), onde eletrodos modificados são utilizados para a detecção de cisteína em amostras de suplemento alimentar. Contudo, quando é explorado um número maior de amino ácidos temos como problema que o potencial de oxidação varia muito pouco, entre os aminoácidos dependendo do eletrodo de trabalho, mas quando a amostra é complexa não é possível discriminar o sinal de qual aminoácido é proveniente naquela condição(3). Portanto, a identificação e quantificação de aminoácidos por um método direto sem prévia separação dos componentes, utilizando-se de características comuns se torna uma tarefa extremamente laboriosa.

I.2 Análises de aminoácidos.

Para a análise de aminoácidos devemos levar em consideração a complexidade de misturas que são características as amostras de aminoácidos, uma etapa de separação se faz necessária. Dentre as técnicas comumente utilizadas nessa etapa, tem-se a eletroforese (4), cromatografia em camada delgada (5), cromatografia líquida de alta eficiência(6-9) e eletroforese capilar (10). Dentre estas a cromatografia é aquela que tem o maior destaque e aceitação.

Desde suas formas mais simples, como a cromatografia em camada delgada, até equipamentos complexos como os de cromatografia líquida de alta eficiência tem seu lugar de destaque na ciência. Este destaque se dá pela capacidade intrínseca da técnica, até mesmo da origem de seu nome, de separar componentes de uma amostra complexa para posterior análise. Atualmente a cromatografia, em suas mais variadas formas, tem utilização difundida nos mais variados laboratórios desde química analítica, bioquímica e química orgânica.

Como apresentado no item I.1 os aminoácidos são moléculas muito plurais e com grupos radicais dos mais diversos, apresentando moléculas com radicais polares a moléculas com radicais apolares, com pontos isoelétricos ente 2,77 a 10,76. Contudo os aminoácidos não são moléculas voláteis, o que descarta a possibilidade de análise por cromatografia gasosa. Portanto, para a quantificação individual dos aminoácidos é necessária uma técnica que permita adequar os parâmetros utilizados na separação dos aminoácidos levando em conta as características únicas das moléculas que compõem este grupo.

Os principais parâmetros de separação que devem ser considerados envolvem a relação de afinidade do aminoácido entre a fase móvel e a fase estacionária, além do pH da fase móvel. Como apresentado na literatura, uma série de trabalhos mostram alternativas (7, 11-13) a separação dos aminoácidos, utilizando-se das mais variadas condições para a separação.

Fica claro que mesmo proveniente de amostras complexas hoje existem inúmeras alternativas para a separação de aminoácidos. Sendo então o grande desafio para este tipo de análise a detecção individual dos aminoácidos.

I.3 Modos de detecção de amino ácidos em cromatografia líquida.

I.3.1 Detecção indireta de aminoácidos

Para a análise de aminoácidos, os sistemas mais utilizados, envolvem detecção a espectrofotométrica com derivatização pós coluna. (14). Na Figura 7 está representada a instrumentação utilizada para permitir que este tipo de detecção ocorra. Esta derivatização pós coluna consiste na reação dos aminoácidos que são carregados da coluna cromatográfica com reagentes colorimétricos. Após uma reação química o produto gerado tem uma faixa ou banda de absorção em uma região de melhor sensibilidade. O reagente mais comumente utilizado para este tipo de reação é a ninidrina.

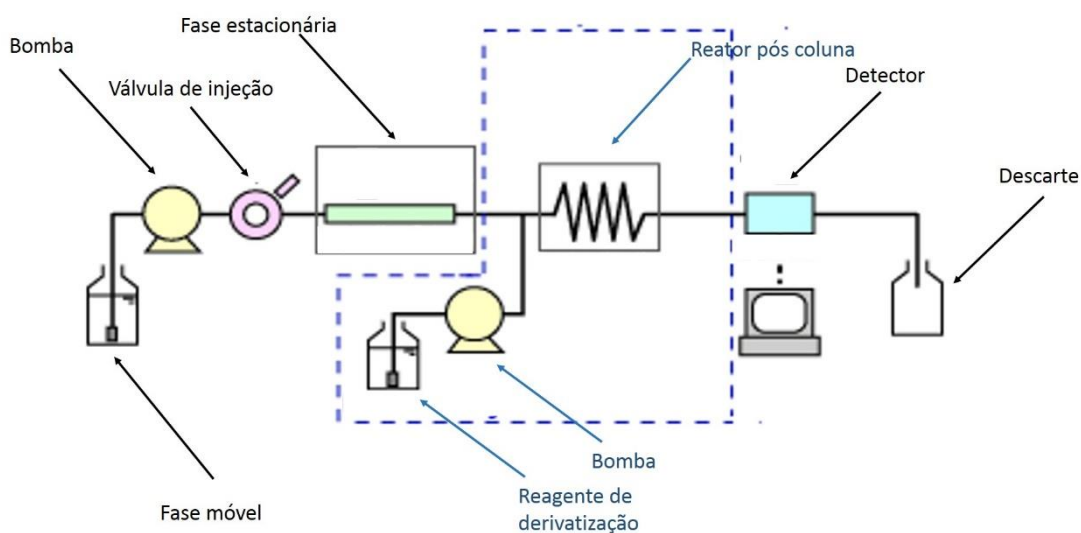


Figura 7 Esquema ilustrativo da instrumentação necessária para realização da derivatização pós coluna em cromatógrafos líquidos.

A reação entre a ninidrina e os aminoácidos está representada na Figura 8, o produto formado na reação, conhecido como púrpura de Ruhemann, tem sua banda de absorção com máximo entre 560 e 580 nm. Contudo, para que a reação ocorra, algumas condições devem ser respeitadas, primeiramente o pH do meio

deve estar entre 4 e 8, alguns trabalhos inclusive apresentam que a reação deve ocorrer a 100°C e por 10 minutos para que possa ter o melhor resultado(15). Note-se também a necessidade da inclusão de uma segunda bomba, forno e um reator pós coluna para que este tipo de detecção seja possível.

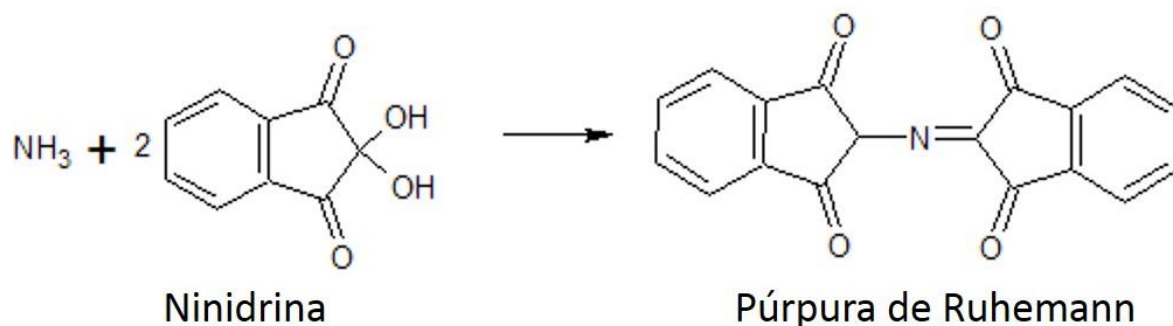


Figura 8 Ilustração da reação que ocorre entre a ninidrina e a amônia proveniente da oxidação desaminativa dos aminoácidos. (16)

Embora funcional, este sistema ainda apresenta algumas limitações, primeiramente o tempo para que a reação ocorra e que dificulta sua aplicação em sistemas de fluxo, além disto, ocorre um alargamento de pico devido a derivatização. A reação com ninidrina necessita de condições específicas para ocorrer, o que influencia na escolha da fase móvel (15) e não ocorre de forma igual com todos os aminoácidos, sendo que existem trabalhos que mostram que não há reação entre a ninidrina e a prolina(16).

Uma segunda alternativa seria o acoplamento do sistema de separações a um espectrômetro de massas que permita a identificação dos aminoácidos de forma individual após a separação. Contudo o preço deste instrumento ainda o torna proibitivo. O melhor cenário possível seria a detecção direta dos aminoácidos após a separação de forma simples e com baixo custo.

I.3.2 Detecção direta de aminoácidos

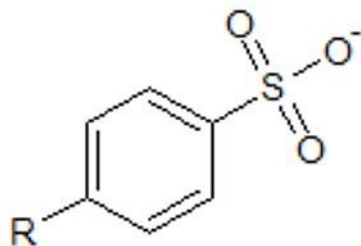
Na detecção direta de aminoácidos o sistema utiliza propriedades e condições que viabilizem a reação dos aminoácidos com o elemento sensor de forma direta. Neste caso a eletroquímica apresenta uma grande vantagem, pois nas condições corretas é possível promover as reações de óxido redução dos

aminoácidos sobre os eletrodos. Sendo que nestas reações a troca de elétrons com o eletrodo é medida de forma direta.

Estas condições envolvem a escolha de uma fase estacionária condutora, em pH adequado além do material adequado para a confecção do eletrodo que permita primeiramente que ocorra alguma reação entre o eletrodo e o aminoácido. O material eletródico também deve permitir que a janela de potencial necessária para a reação de oxido-redução seja atingida. Neste momento a cromatografia líquida de alta eficiência com fase normal ou reversa apresenta limitações visto que a maioria das fases móveis utilizadas é composta por soluções orgânicas. Sendo então a cromatografia de íons uma excelente alternativa para a utilização na separação de aminoácidos com detecção eletroquímica direta, devido as propriedades da fase móvel.

I.4 Cromatografia de íons.

A cromatografia de íons figura entre uma das alternativas dentre as mais variadas técnicas de cromatografia líquida. Um dos principais elementos de diferenciação da cromatografia de íons para as demais é o uso de soluções tampão como fase móvel. A cromatografia de íons teve seu início com os conceitos básicos da cromatografia de troca iônica. Estes conceitos passam diretamente pelo emprego de fases estacionárias com capacidade de troca iônica. Na Figura 9 tem-se a estrutura de uma resina de troca catiônica utilizada com essa finalidade.



Troca catiônica

Figura 9 Estrutura de uma resina de troca catiônica, onde R é substituído pelo polímero que forma a resina. Adaptada da referência (17).

Seguiu-se o desenvolvimento de técnicas que facilitassem a análise dos mais variados íons aplicando estas resinas como fase estacionárias. Como fase móvel no caso das resinas de troca catiônica, foram utilizadas soluções ácidas, nas quais o H^+ da fase móvel causa competição pelos sítios ativos da resina e de ânions, como Na^+ e K^+ . Mediante a diferença de afinidade dos íons entre a fase móvel e a fase estacionária os íons são eluídos.

Neste ponto, fica claro qual a grande vantagem da eletroquímica para o desenvolvimento de detectores para este tipo particular de cromatografia. As fases móveis por serem compostas de soluções eletrolíticas, que tem condutividade e os analitos também facilitam a detecção através de métodos eletroquímicos. Visto que desde métodos como a condutividade até reações de oxido-redução podem ser realizadas nestas condições. Logo desenvolveram-se os primeiros detectores como sendo detectores de condutividade, que consistem em células de condutividade. Essas células quando utilizadas no cromatógrafo sentem a diferença de condutividade quando um íon é carregado frente à condutividade da fase móvel.

Com a evolução da técnica de cromatografia de íons novos detectores foram surgindo. Não somente baseados na condutividade do analito, mas agora também considerando a possibilidade destes analitos sofrerem reações de óxido-redução. Sendo que, além do detector de condutividade, é possível a utilização de técnicas amperométricas nos detectores.

I.5 Detecção amperométrica de aminoácidos.

A detecção direta de aminoácidos em cromatografia de íons por via eletroquímica está bem difundida dentre as técnicas comerciais hoje existentes, sua utilização ainda não é tão comum quanto a derivatização pós coluna, contudo existem inúmeros sistemas comerciais disponíveis (18). O estado da arte da detecção direta de aminoácidos por amperometria pode ser dividida em duas linhas de pesquisa. Primeiramente, a linha de sistemas comerciais que se valem do uso de eletrodos de ouro montados nas células de fluxo ou eletrodos descartáveis. A segunda linha está na pesquisa realizada na tentativa de obter materiais alternativos ao ouro para a fabricação do eletrodo. Um exemplo disso é o trabalho de Casella, no qual é demonstrada a possibilidade do uso de cobre como material eletródico para determinação de aminoácidos em cromatografia de íons (19). Chen e colaboradores (20) reportam o grande interesse em pesquisar formas alternativas para a detecção de aminoácidos em eletrodos de ouro. Mais adiante, neste trabalho serão apresentados dados que comprovam a necessidade de investir mais em novos materiais do que em novas formas de detecção com o eletrodo de ouro.

A detecção amperométrica dos aminoácidos é fundamentada na aplicação de potencial fixo no eletrodo de trabalho e o registro da corrente proveniente da oxidação das espécies ao atingirem o eletrodo de trabalho, sendo que a corrente é proporcional à concentração destas, e os diferentes aminoácidos são identificados pelo tempo de retenção na coluna cromatográfica.

A detecção de biomoléculas empregando-se a cromatografia de íons com detecção amperométrica iniciou-se com o trabalho de LaCourse e colaboradores (21). Somente após o trabalho de LaCourse, foi difundida a utilização de eletroquímica na detecção de carboidratos, isso ocorreu devido ao desenvolvimento da técnica de amperometria pulsada onde ciclos de pulsos de potenciais são aplicados ao eletrodo de trabalho em ouro para a detecção de carboidratos. O intuito de aplicar pulsos de potenciais é melhorar o desempenho do eletrodo, pois no caso dos carboidratos, produtos de oxidação aderem à superfície do ouro, levando a queda de sinal ao longo da medida.

Para a detecção de aminoácidos o princípio empregado é parecido, tanto que alguns trabalhos presentes na literatura levam em conta a detecção de carboidratos e alguns aminoácidos como glicina (22, 23). Ciclos de potenciais são desenvolvidos com o intuito de aumentar o tempo de vida útil dos eletrodos e viabilizar as medidas. Temos na Figura 10 o esquema de pulsos de potenciais desenvolvido para a detecção de aminoácidos sobre eletrodos de ouro. Entretanto, devido à magnitude dos potenciais utilizados, a vida útil do eletrodo de ouro é reduzida. Isso se deve ao fato de que nos momentos do pulso o eletrodo de ouro é mantido em potenciais que vão além da região da oxidação do ouro em meio básico. Isso leva a degradação do eletrodo, pois facilita que ocorra, por exemplo, a formação de complexos entre o ouro e o cloreto presente na amostra. Isso ilustra a importância da busca de alternativas ao eletrodo de ouro, a fim de garantir análises com eletrodos que tenham maior vida útil, trabalhem em condições mais amenas e não necessitem de saltos de potencial tão abruptos.

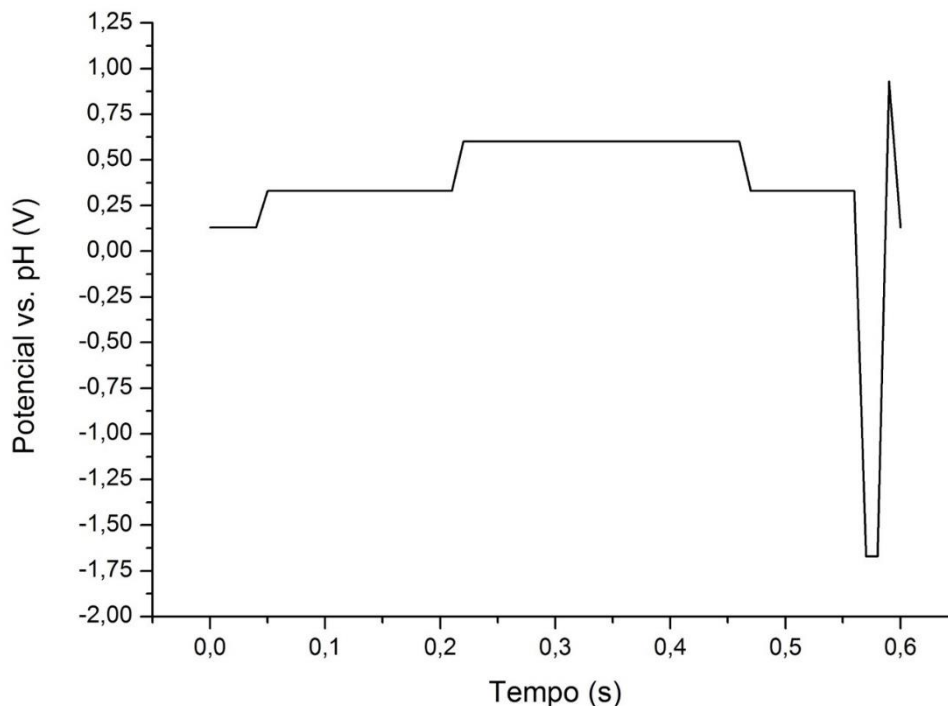


Figura 10 Pulso de potencial desenvolvido para a detecção de aminoácidos. Adaptado a partir da referência (24).

Dentre os materiais eletródicos alternativos, primeiramente há que se avaliar a possibilidade de sua utilização, levando em consideração as características do sistema cromatográfico. Inicialmente o material tem que ser capaz de promover reações de óxido-redução dos aminoácidos utilizando como eletrólito aquelas soluções que servem de fase móvel na cromatografia. Eles têm que apresentar dentre uma janela de potencial a região onde ocorram estas reações e por fim, tem que apresentar vantagens que viabilizem sua utilização frente aos eletrodos de ouro.

Mediante esta série de exigências tem-se como alternativa materiais a base de cobre. O cobre tem uma conhecida atividade catalítica sobre os aminoácidos (3, 22, 25), além de ser um elemento muito empregado na fabricação de ligas. Esta incorporação possibilita modular as propriedades físicas e químicas do cobre adequando as características do material a sua utilização.

I.6 Cobre e suas ligas

Desde os primórdios da humanidade o cobre e o bronze fazem parte dos objetos do cotidiano humano. Com o avanço da ciência e do conhecimento humano, os materiais foram mais bem planejados e seu uso refinado. O cobre possui propriedades químicas, físicas e eletrônicas de destaque. No passado foi amplamente utilizado para confecção de bens como lanças e jóias e hoje tem seu lugar de destaque na indústria de componentes eletrônicos (26).

O bronze, uma liga de cobre, estanho e pequenas proporções de zinco, por sua vez tem uma aplicação em áreas onde os processos de oxidação do cobre são danosos. Embora dentre os metais que compõem a liga bronze, o cobre seja o mais resistente aos processos de oxidação, quando incorporados todos na liga a resistência a corrosão é maior. Como exemplo ver a Figura 11, na qual está um canhão de navio que ficou submerso por quase 500 anos e mesmo assim resistiu em boas condições. Do ponto de vista científico tem-se na literatura os artigos de Badawy e colaboradores (27) e Kear e colaboradores (28) que abordam o incremento de resistência a corrosão dos metais quando inseridos em uma liga. Vê-

se que certos trabalhos datam do início do século 20, mostrando a atualidade do estudo do cobre e suas ligas. (27-30)

I.7 Raman intensificado com efeito de superfície obtido através de cavidades de segmento esférico.

A espectroscopia Raman é uma técnica espectroscópica usada para observar modos vibracionais e rotacionais de baixa frequência. A técnica se baseia no espalhamento inelástico da luz monocromática, como por exemplo, de um laser, ou também chamado de espalhamento Raman. A luz do laser interage com vibrações moleculares, fônons e outras excitações no sistema, resultando no deslocamento da energia dos fótons do laser (31).

O efeito que leva à intensificação do sinal de Raman devido ao efeito de superfície foi primeiramente descrito no trabalho de Fleischmann (32). O efeito SERS, (do inglês, *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*) é um considerável aumento na intensidade do sinal de Raman obtido para uma ou mais moléculas. O efeito SERS é atribuído a dois efeitos o de aumento em função do campo magnético e aumento químico. O aumento em função do campo é o mais significativo dos dois e ocorre quando partículas metálicas ou superfícies rugosas de metais são expostas ao laser de comprimento de onda adequado. Dentre estes materiais temos mais comumente os metais prata (33), ouro (34) entre outros (35).



Figura 11 Canhão de artilharia do navio britânico Mary Rose que afundou em 1545 e recuperado em 1982. Foto do arquivo pessoal. Museu Naval Portsmouth – Agosto de 2013.

SERS é reconhecido, dentre as técnicas analíticas espectroscópicas, como aquela que tem maior sensibilidade para análises químicas e bioquímicas (34, 36-40). A chave para esta aplicação é a obtenção de substratos estruturalmente uniformes com alta sensibilidade para SERS (41). Com isto em mente esta parte do trabalho descreve a preparação um substrato que utiliza segmentos vazios de esfera para estudo de SERS em eletrodos de cobre. O substrato nanoestruturado de cobre é produzido através da eletrodeposição de cobre através de moldes uniformes de partículas sub micrométricas ordenadas de poliestireno. Essa etapa foi realizada, pois é de grande interesse para a aplicação no sistema cromatográfico entender como ocorre a interação dos aminoácidos com o eletrodo de cobre.

O cobre é um material com propriedades únicas, que tem um importante papel em algumas doenças tais como Parkinson onde ele está associado a

conjugação proteica (42). O cobre também atrai um grande interesse como material com atividade antimicrobiana (43), devido as reações que ocorrem com os óxidos na superfície do metal. Somando-se a estes fatores, o cobre é amplamente utilizado para oxidação e detecção de aminoácidos (44-46) em aplicações analíticas. Contudo os mecanismos que controlam a oxidação dos aminoácidos sobre cobre dependem da formação de um intermediário entre o óxido de cobre II e o aminoácido. Este intermediário como apresentado em alguns trabalhos da literatura é um complexo, porém não há consenso dos grupos funcionais envolvidos na formação deste complexo (47-50).

O cobre é um metal que apresenta o efeito SERS, logo isto permite uma técnica sensível para observação das reações que ocorrem na superfície deste metal (51-53). O efeito SERS é geralmente aceito como efeito de duas contribuições para o aumento de sinal em função da geometria da superfície; um aumento de sinal em função da transferência de carga decorrente de quimissorção do adsorvido sobre a superfície metálica e um efeito eletromagnético. Destes dois efeitos a contribuição do efeito eletromagnético é geralmente o mais significativo e não é específica do adsorbato. O aumento em função do efeito eletromagnético decorre da focalização do campo elétrico em certos lugares da superfície do metal e, por conseguinte, é fortemente dependente da morfologia sobre superfície e forma exata da rugosidade apresentada na superfície do metal. Contudo, o estudo das reações que ocorrem entre os aminoácidos e cobre em meio alcalino são desafiadoras, devido à grande reatividade deste metal nestas condições. Para tal, um eletrodo estruturado de cobre deve ser desenvolvido. Esta estrutura deve fornecer um grande aumento no sinal, ser fácil de preparar, ter uma área superficial bem definida, ser reprodutível e estável. Os eletrodos de *surface segment void* (SSV) ou superfície obtida a partir de segmento de esferas atendem estas necessidades.

Como previamente descrito por Mahajan et al. (54), o uso dos substratos SSV apresentam várias vantagens e como forma de atingir um alto grau de aumento sem grande rugosidade do eletrodo. Sendo possível preparar estas superfícies com vários metais diferentes dentre eles, a prata (55), a platina e paládio (56).

I.8 Motivação

Devido a relevância dos aminoácidos para química, nutrição e bioquímica a sua quantificação é de suma importância. Portanto, a motivação que rege este trabalho é o estudo de materiais alternativos para a detecção direta de aminoácidos após separação cromatográfica, permitindo assim o uso de novos materiais para o estudo destas moléculas. Sendo também parte do objetivo um estudo de como ocorre a interação entre os aminoácidos e o cobre, tornando viável o emprego do cobre através de suas ligas na detecção deste importante grupo de moléculas

II Objetivos

II.1 Objetivo Geral

Avaliar materiais a base de cobre para detecção direta de aminoácidos em cromatografia de íons.

II.2 Objetivos específicos

- Obter e comparar as respostas obtidas para a oxidação de diferentes aminoácidos sobre eletrodos de ouro, cobre e ligas de cobre.
- Estudar os mecanismos que regem as reações de óxido-redução de aminoácidos em eletrodos de cobre.
- Aplicar os novos materiais em células de fluxo e avaliar os parâmetros analíticos, tais como reprodutibilidade, robustez e estabilidade.
- Avaliar uma amostra real de aminoácidos.
- Desenvolver uma plataforma que permita a avaliação dos mecanismos moleculares envolvidos na oxido redução de aminoácidos em eletrodos de cobre.

III – Materiais e Métodos

III. 1 Reagentes e soluções

Utilizou-se para realização dos experimentos os seguintes reagentes, os quais foram empregados sem tratamento prévio: água ultrapura Milli-Q (resistividade $\geq 18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, Millipore), hidróxido de sódio 98%, cloreto de potássio, kit com 21 L-aminoácidos, glicina, DL lisina, DL histidina, DL triptofano, nitrato de potássio, creatina mono-hidratada. Todos os reagentes foram fornecidos por Sigma Aldrich – St. Louis. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura.

Nos experimentos de espectroscopia Raman foram utilizados os seguintes reagentes: esferas de poliestireno monodispersas (Duke Scientific Corporation, solução em 1% de concentração em água com coeficiente de variação do diâmetro de 1.3%) Sulfato de cobre penta hidratado, cloreto de potássio da marca Fischer Scientific. Benzenotiol e polietileno glicol de massa molar 400 da empresa Sigma Aldrich – St Louis.

III. 2 Equipamentos

Para este trabalho foram utilizados os instrumentos analíticos descritos a seguir. O cromatógrafo utilizado é um sistema modular da Metrohm com um detector amperométrico modelo 817 – Bioscan (Metrohm AG – Herisau). Bomba de alta pressão modelo 818 (Metrohm AG – Herisau). Foram utilizadas neste trabalho uma coluna Carb1 de 250/4.6mm (Metrohm AG – Herisau), uma coluna Hamilton RX-30 de 250/4.6mm (Hamilton Company, Reno EUA.) e uma coluna AminoPac PA10 250/2mm (Thermo Scientific - Dionex).

Para as análises eletroquímicas utilizou-se um potenciostato Autolab, modelo μ Autolab II e o software NOVA versão 1.7 e GPES 4.9 para controle do equipamento. Utilizou-se um sistema de três eletrodos em que o eletrodo de referência é de Ag|AgCl em KCl 3,0 mol L⁻¹; o eletrodo auxiliar é constituído de um

fio helicoidal de platina e os eletrodos de trabalho empregados foram de ouro (comercial, comprado da empresa Metrohm) e os de cobre e bronze preparados no Instituto de Química da Unicamp.

Para as análises de espectroscopia Raman um microscópio eletrônico de varredura marca Philips modelo XL30 ESEM foi utilizado para imagens dos substratos. Todos os espectros Raman foram coletados com o uso de um equipamento da marca Renishaw Raman 2000 utilizando um laser de 633 nm HeNe com área amostrada de 5 μm de diâmetro e com potência de 3 mW

III. 3 Cobre e suas ligas.

Para este trabalho também foram fabricados eletrodos de trabalho de cobre e bronze. Para isso foram utilizados cobre eletrolítico, bronze TM 620 e bronze TM 23(57), conforme designação comercial da empresa fornecedora. Esses materiais foram a base tanto para os eletrodos convencionais quanto para eletrodos de trabalho das celas de fluxo.

III. 4 Eletrodos.

Para a realização deste trabalho foi necessária a fabricação dos eletrodos de cobre e bronze, dois tipos TM 23 e TM 620 bem como as células de fluxo com estes eletrodos. Esta parte do trabalho foi realizada na oficina de mecânica fina do Instituto de Química da Unicamp.

III.4.1 – Construção de eletrodos convencionais

Os eletrodos convencionais fabricados seguiram os modelos dos disponíveis comercialmente, como pode ser observado na Figura 12 temos os eletrodos com os 4 materiais utilizados neste trabalho. Todos os eletrodos tem 3 mm de diâmetro do material sensor e um diâmetro total de 10mm. A principal diferença entre os materiais utilizados está que o eletrodo convencional vem isolado com PEEK e o fabricado na Unicamp em PTFE.

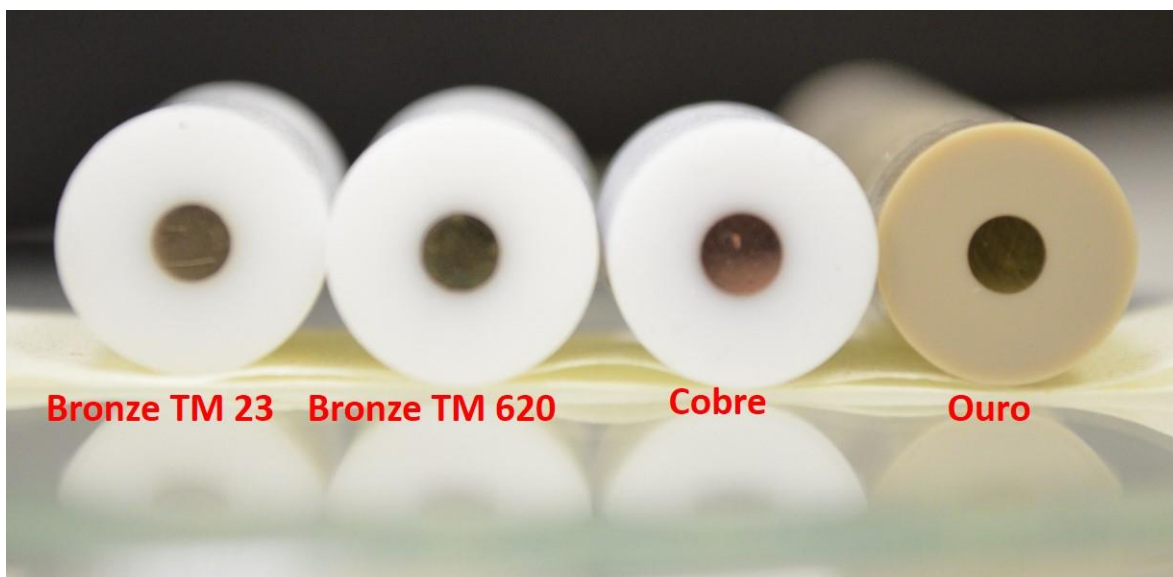


Figura 12 Eletrodos convencionais utilizados no trabalho.

III.4.2 Construção de Célula de fluxo.

Tendo em mãos os mesmos materiais utilizados para a construção dos eletrodos de disco rotatório, seguiu-se a confecção de células apropriadas para uso em sistemas de fluxo. As células de fluxo construídas seguiram o molde da célula convencional, no qual a parte do eletrodo de referência foi mantida, contudo a parte do eletrodo de trabalho foi fabricada para poder acomodar os diferentes materiais. Um esquema ilustrativo está apresentado na figura Figura 13, em que estão indicadas as partes da célula de fluxo. Tem-se o eletrodo de trabalho em posição central, logo a fase móvel atinge o eletrodo de forma perpendicular, o que leva esta célula a ter o nome de *Wall-Jet*. O material de confecção do eletrodo auxiliar, tanto na célula comercial quanto nas outras é inox. O eletrodo de referência de estado sólido de PtIr, está localizado na parte inferior a célula foi utilizado independente do material em estudo.

Neste passo cabe ressaltar que o bronze TM 23 não foi utilizado para a construção da célula por razões que serão discutidas mais à frente neste trabalho. Houve também uma otimização na célula frente aquelas disponíveis comercialmente, no caso das células apresentadas na Figura 14, as células de

bronze TM 620 – A e bronze TM 620 – B, há uma diferença na profundidade do contra eletrodo. Isso foi necessário para a diminuição do volume morto da célula bem como a diminuição da estagnação de bolhas no detector.

Uma última otimização do sistema foi realizada com a redução do diâmetro do eletrodo de trabalho de 3mm para 1mm, como apresentado na Figura 15, em que estão as células fabricadas nestas condições. Note-se que há uma mudança no material de fabricação da segunda célula que tem seu material externo em PEEK, isso se fez necessário devido à baixa resistência mecânica do PTFE. Após períodos prolongados de uso, o PTFE sofreu um alargamento e como consequência houve infiltração de fase móvel entre o PTFE e o eletrodo auxiliar.

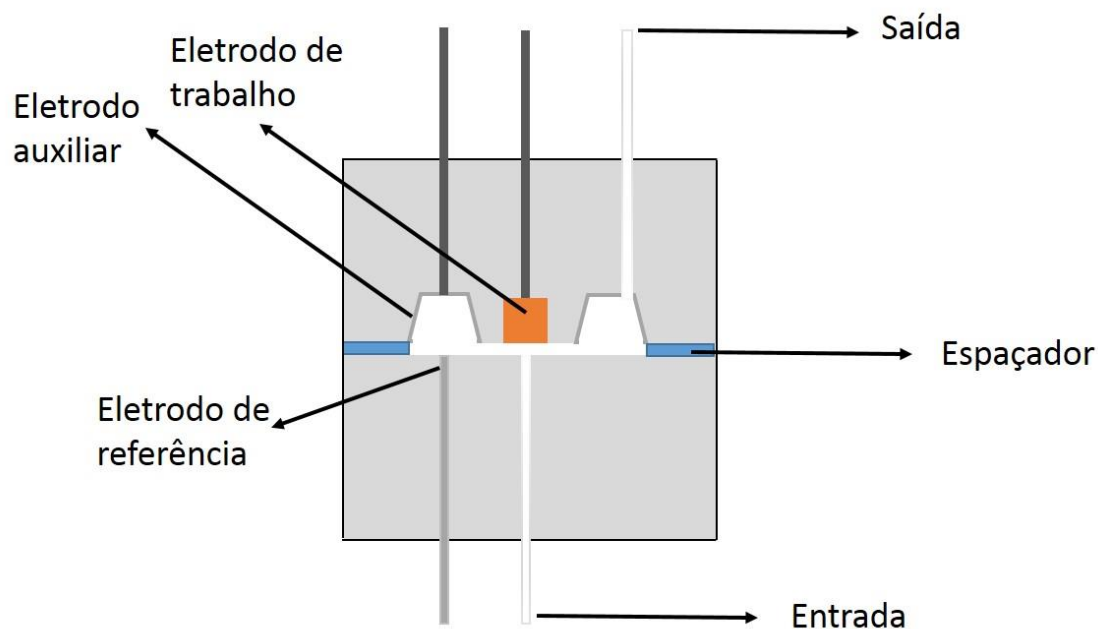


Figura 13 Esquema ilustrativo da célula de fluxo empregada no cromatógrafo de íons.

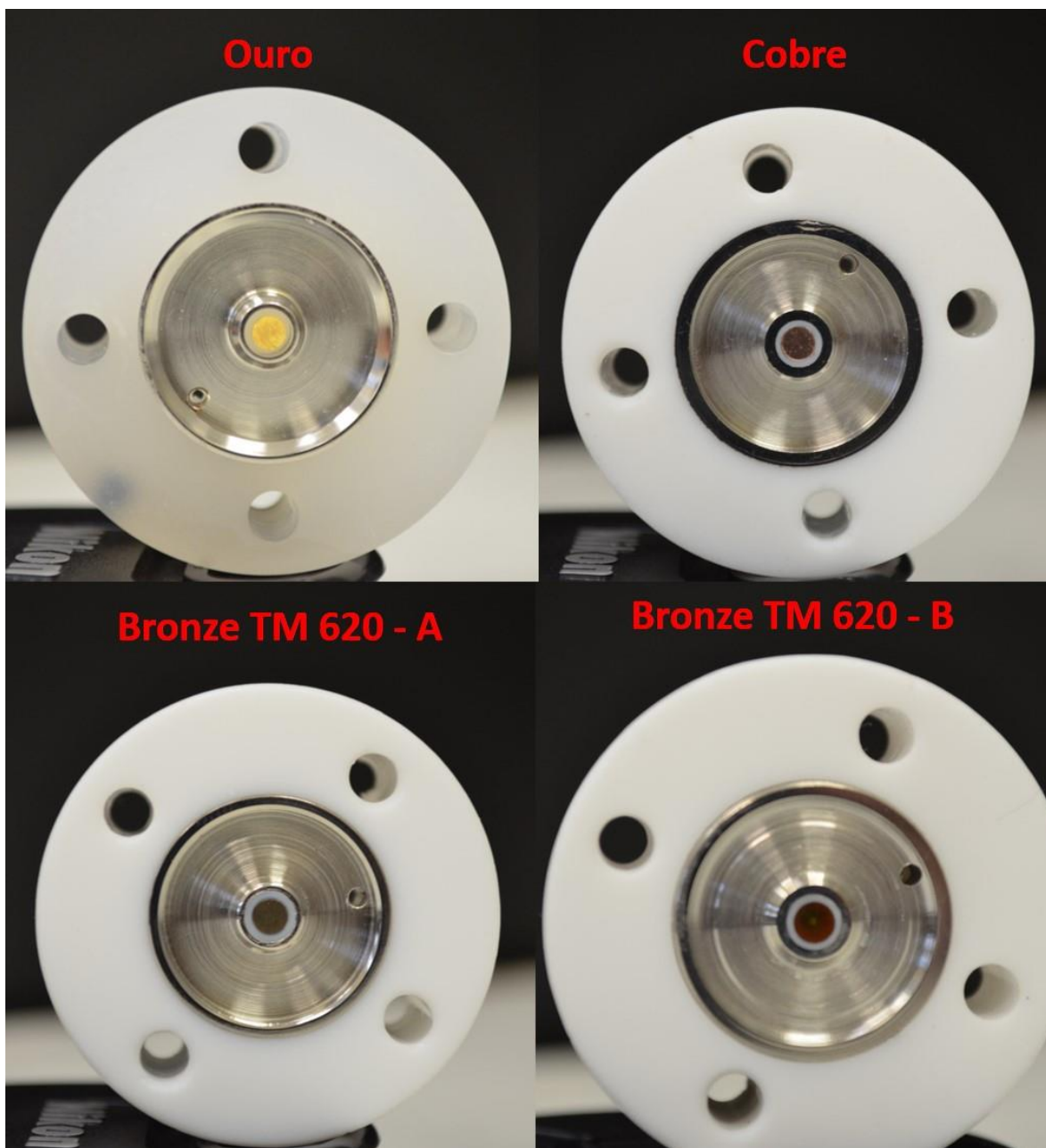


Figura 14 Fotos dos eletrodos utilizados na célula de fluxo no cromatógrafo de íons. Tem-se a seguinte geometria na célula de fluxo, o eletrodo de trabalho fica no centro, circundado pelo eletrodo auxiliar, o eletrodo de referência está localizado na outra metade da célula. Há na figura a célula de comercial com eletrodo de trabalho em ouro, a célula não comercial com eletrodo de cobre e bronze TM 620. Destaque para as células de bronze onde a célula A tem o eletrodo auxiliar com 3 mm de profundidade e a célula B com 1,5mm.

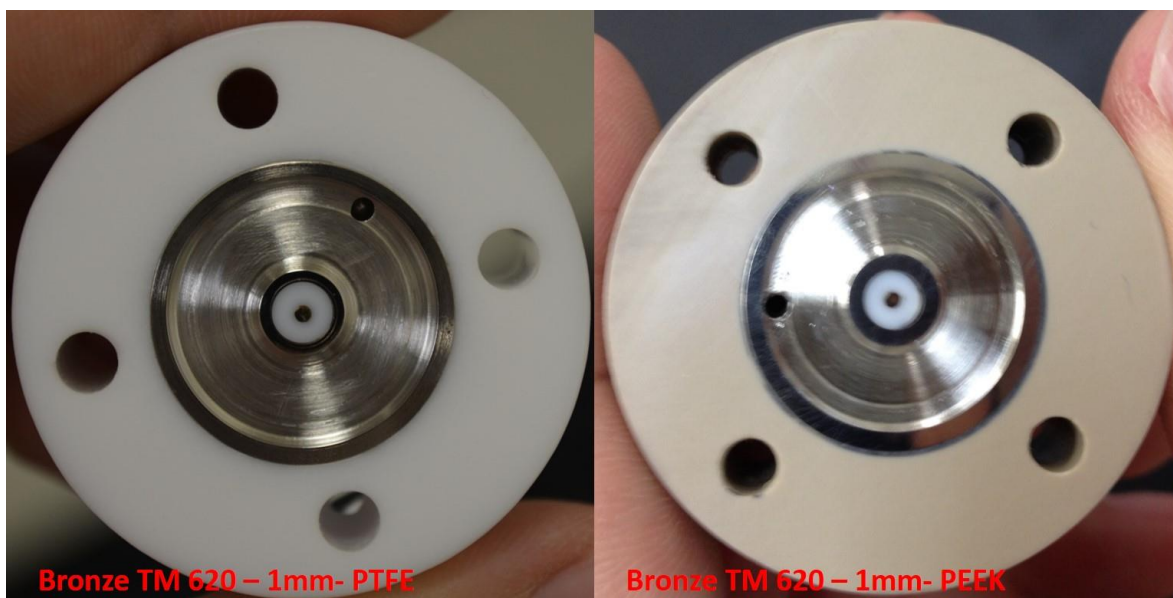


Figura 15 Fotos dos eletrodos utilizados na célula de fluxo no cromatógrafo de íons. Tem-se as células não comerciais com eletrodos de trabalho em bronze TM 620, com eletrodo auxiliar com profundidade de 1,5mm e material externo em PTFE e PEEK.

III.5 – Limpeza do eletrodo

Os eletrodos e células de fluxo não comerciais inicialmente foram lavados em solução de 10% de Extran® em banho de ultrassom por 30 minutos para retirar resíduos óleos do processo de fabricação. Em seguida foram lavados com água e polidos em lixas com granulometria de 400 a 2500, novamente lavados com água e passados para a etapa seguinte.

Deste ponto em diante a limpeza dos eletrodos segue um procedimento padrão de polimento em alumina com tamanhos decrescentes, com auxílio de uma politriz. As soluções de alumina continham partículas com tamanho de 1,0, 0,5 e 0,3 μm . O polimento inicialmente é feito com a solução de alumina com partículas com 1,0 μm de tamanho. Durante o polimento o eletrodo é limpo com água e o disco de polimento trocado e parte-se para a solução de alumina com partículas de 0,5 μm o mesmo procedimento é repetido para a solução de alumina com partículas de 0,3 μm . O eletrodo é polido por 5 minutos em cada tamanho de partícula da alumina. Em seguida o eletrodo é colocado em um banho de etanol:água 1:1 e colocado em

banho de ultrassom por 5 minutos. Por fim o eletrodo é colocado somente em água e colocado em banho de ultrassom por mais 10 minutos.

III.6 Estudos voltamétricos preliminares.

A primeira parte do estudo foi baseada no trabalho de Hampson (25). Seguindo a abordagem deste autor, os seguintes estudos foram realizados tendo como resultado o perfil de oxidação dos aminoácidos sobre diferentes materiais. A metodologia adaptada e empregada aos estudos preliminares foi a seguinte:

Ativação da superfície: Para garantir a uniformidade da superfície, o eletrodo passou por uma etapa de ativação por voltametria cíclica. Para os eletrodos de cobre e suas ligas a ativação consistiu na realização de 30 varreduras cíclicas com velocidade de 100 mV s^{-1} na faixa de $-1,6$ a $+0,8 \text{ V}$ versus eletrodo de Ag|AgCl em $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$. Para o eletrodo de ouro a faixa de varredura utilizada foi de $-0,8$ a $0,8 \text{ V}$ versus Ag|AgCl em $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Faixa de estudo: Para o estudo as condições utilizadas foram as seguintes. Para os eletrodos de cobre e suas ligas o estudo foi realizado com 3 varreduras cíclicas com velocidade de 10 mV s^{-1} na faixa de $-1,6$ a $+0,8 \text{ V}$ versus eletrodo de Ag|AgCl em $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$. Para o eletrodo de ouro a faixa de varredura utilizada foi de $-0,8$ a $0,8 \text{ V}$ versus Ag|AgCl em $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$.

III.7 Estudo do mecanismo de detecção.

O estudo do mecanismo de detecção dos aminoácidos foi baseado no trabalho de Zen e colaboradores (58), onde eles apresentam que dois tipos respostas são possíveis, mediante a interação do aminoácido com o eletrodo de cobre. A primeiro sinal ocorre em potenciais entre $-0,2$ à $+0,2 \text{ V}$ versus Ag|AgCl , é atribuído pelo trabalho de Zen à formação do complexo aminoácido – cobre (II). Já em potenciais entre, 0 à $+0,8 \text{ V}$ versus Ag|AgCl , ocorre a oxidação do aminoácido sobre o eletrodo. Neste estudo aminoácidos com diferentes grupos R foram utilizados.

III.8 Estudo da influência da camada de óxido de cobre.

Este estudo pode ser dividido em duas etapas: Primeiramente um estudo em diferentes velocidades de varredura foi realizado. Neste estudo voltametrias lineares foram realizadas na ausência e na presença de $7,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de treonina, em faixa de potencial de -0,5 à 0,8 versus Ag|AgCl em KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ V, tendo como eletrólito hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. As velocidades de varredura estudadas foram de $2,5 \text{ mV s}^{-1}$ a 10 mV s^{-1} . O objetivo neste ponto foi avaliar a influência do tempo de oxidação do eletrodo antes do potencial onde ocorre a oxidação do aminoácido e avaliar a corrente de pico obtida no processo de oxidação do aminoácido.

O segundo estudo consistiu em variar o tempo de crescimento da camada de óxido de cobre (II) em eletrólito composto de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ entre 5 e 450 segundos. Para induzir a formação do óxido de cobre (II) o eletrodo foi mantido em potencial constante por tempo determinado. Logo após o final do tempo determinado, $7,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ treonina foram adicionados ao eletrólito e uma voltametria cíclica foi realizada para a obtenção da corrente de pico referente ao processo de oxidação do aminoácido.

III.9 Estudos em fluxo.

O estudo em fluxo pode ser dividido em três partes como descritas abaixo. Mas as condições comuns para todo o estudo foi a composição da fase móvel com hidróxido de sódio $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ e acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, uma vazão de 1 mL.min^{-1} e detecção amperométrica pulsada.

III.9.1 Otimização do pulso de potencial

O pulso de potencial desenvolvido no trabalho teve suas condições otimizadas frente ao tempo de cada potencial que compõem o pulso. Sendo assim, inicialmente se otimizou o potencial onde ocorre a formação do complexo cobre aminoácidos, em seguida o potencial de detecção e, por fim, o potencial referente a reestruturação do eletrodo.

III.9.2 Robustez do sistema

O sistema foi validado frente a diferentes parâmetros como estabilidade onde a fase móvel foi testada, vazão de bomba e temperatura. Estes parâmetros foram avaliados com $n = 10$ injeções e o cálculo do coeficiente de variação e desvio padrão relativos foram realizados (59). Neste estudo devido às mudanças pontuais das condições de uso do equipamento as condições serão descritas junto aos resultados e discussão.

III.9.3 Estabilidade do sistema.

Para testar a estabilidade duas séries de 50 injeções de um padrão de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em duas condições foi avaliado. Na primeira condição, 25 injeções foram realizadas e o equipamento permaneceu ligado e 12 horas depois as outras 25 injeções foram realizadas. Na segunda condição o sistema foi desligado após as primeiras 25 injeções e 12 horas depois religado e as injeções foram concluídas.

III.10 Análise da amostra de suplemento alimentar

A metodologia empregada na análise da amostra consistiu em um protocolo simples. O preparo da amostra consistiu na abertura de uma capsula do suplemento do tipo BCAA e seu conteúdo diluído a 50 mL de água ultrapura. Uma curva de calibração foi construída, onde a concentração esperada dos componentes estivesse na concentração média da curva. Após a obtenção da curva de calibração a amostra foi avaliada.

III. 11 SERS

III.11.1 Fabricação dos substratos.

A seção que descreve a fabricação dos substratos para as medidas de SERS está descrita de forma mais detalhada na parte de resultados e discussão no Capítulo VI. Toda esta etapa do trabalho foi desenvolvida na Universidade de Southampton, UK, sob a orientação do Prof. Dr. Philip N. Bartlett.

III.11.2 Avaliação da profundidade da cavidade.

Em um substrato recém-preparado uma faixa de 3 por 10mm foi delimitada. O eletrodo foi conectado a um mecanismo que permite variação da profundidade do eletrodo na solução. O experimento foi montado de forma com que os primeiros 200 segundos de deposição fossem comuns a todo o eletrodo e a cada 100 segundos o eletrodo seria retirado 1mm da solução. Para a dissolução das partículas foi usado DMF e como sonda para as medidas de Raman uma solução etanoica de benzenotiol na concentração de $1,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

III.11.3 Medidas de espectroeletroquímica.

O sistema utilizado para as medições de SERS consiste em uma cela desenvolvida e construída na Unicamp, onde o eletrodo de trabalho (substrato) fica posicionado no centro da cela e está apresentado na Figura 16. Esta cela apresenta uma grande vantagem ao trabalho, pois permitem medidas de espectroeletroquímica sobre os substratos.

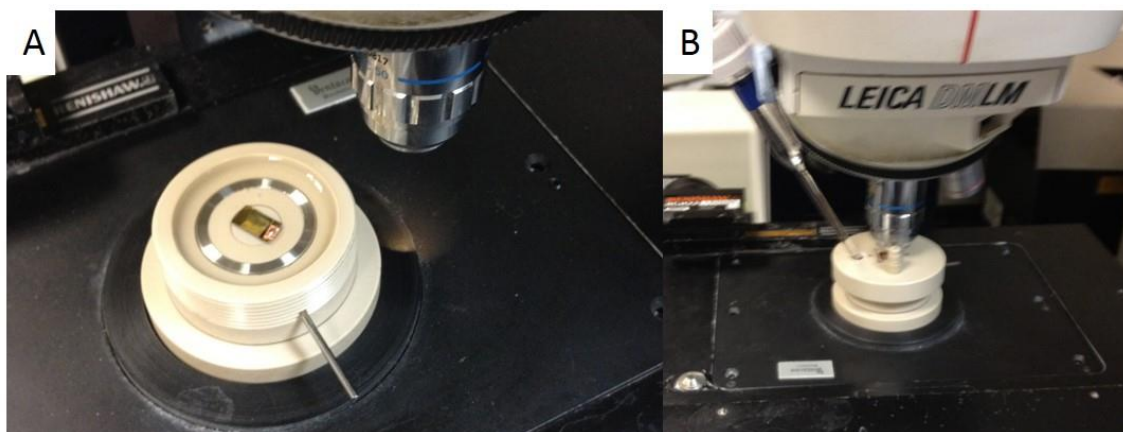


Figura 16 Célula de espectroeletroquímica desenvolvida na Unicamp. Em (A) tem-se a célula aberta com o substrato exposto e em (B) a célula fechada e conectada pronta para uso.

IV – Resultados e discussão - Eletrodos de Ouro e Cobre

IV.1 – Estudos voltamétricos preliminares

A primeira informação que é preciso obter é sobre a capacidade dos materiais em estudo responderem a oxidação/redução eletroquímica dos aminoácidos no meio proposto. Logo, este estudo foi planejado para obter informações preliminares da capacidade de oxidação/redução dos aminoácidos sobre os diferentes materiais eletródicos, primeiramente sobre o eletrodo de ouro. Esta estratégia foi utilizada para que inicialmente fosse possível acompanhar as reações obtidas dos aminoácidos sobre um padrão conhecido na literatura. Primeiramente, na Figura 17 apresenta-se o perfil voltamétrico do eletrodo de ouro obtido em hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a 10 mV s^{-1} de velocidade de varredura. Neste perfil ficam claros o pico da oxidação do ouro, que ocorre entre 400 e 600 mV, e o pico de redução do ouro, que ocorre entre 200 e 0 mV.

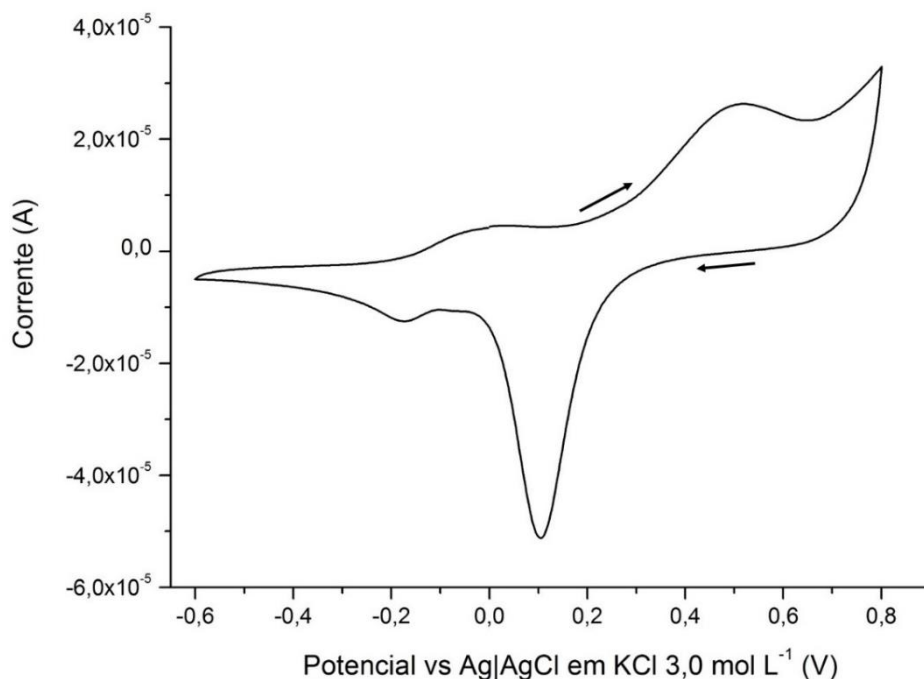


Figura 17 Perfil de corrente em função do potencial, eletrodo de ouro em hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, varredura iniciando em 0 V e velocidade de 100 mV s^{-1} .

Deve-se agora considerar a adição do aminoácido ao eletrólito e para tanto tem-se a Figura 18. Nela fica claro que há um aumento na corrente na região onde ocorre a formação do óxido de ouro e decréscimo na região de redução do ouro. Pode-se assumir que ocorre uma reação de óxido-redução da glicina em eletrodo de ouro, porém, a glicina é o aminoácido que tem como grupo R apenas um átomo de hidrogênio, sendo então esperado que a resposta seja dependente da estrutura fundamental do aminoácido. Mas diante da variedade de grupos R presentes o que aconteceria com o perfil de resposta?

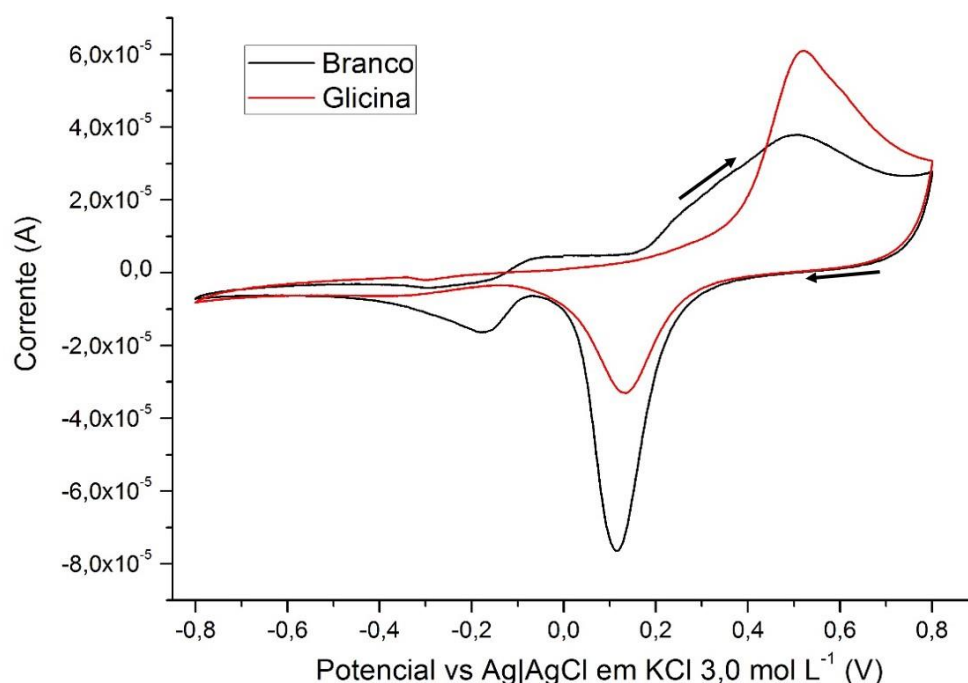


Figura 18 Perfil da corrente em função do potencial para o eletrodo de ouro em meio de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ (em preto) e na presença de glicina (em vermelho) com a varredura iniciando em 0 V e velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹

Como apresentado na Figura 19 há diferentes processos para diferentes aminoácidos, isso se deve principalmente ao grupo R de cada aminoácido envolvido. Este fato leva a conclusão de que, como os aminoácidos possuem diferentes grupos R, há uma variação entre as suas respostas de óxido redução, caso os grupos R interajam com o eletrodo e tenham relação com o mecanismo de

oxido redução dos aminoácidos. Utilizou-se como exemplo a serina e a glicina, cujas estruturas são mostradas na Figura 20, em destaque a hidroxila, do grupo R da serina. Neste caso esta hidroxila claramente participa do mecanismo de oxido-redução do aminoácido, interferindo assim no formato do voltamograma.

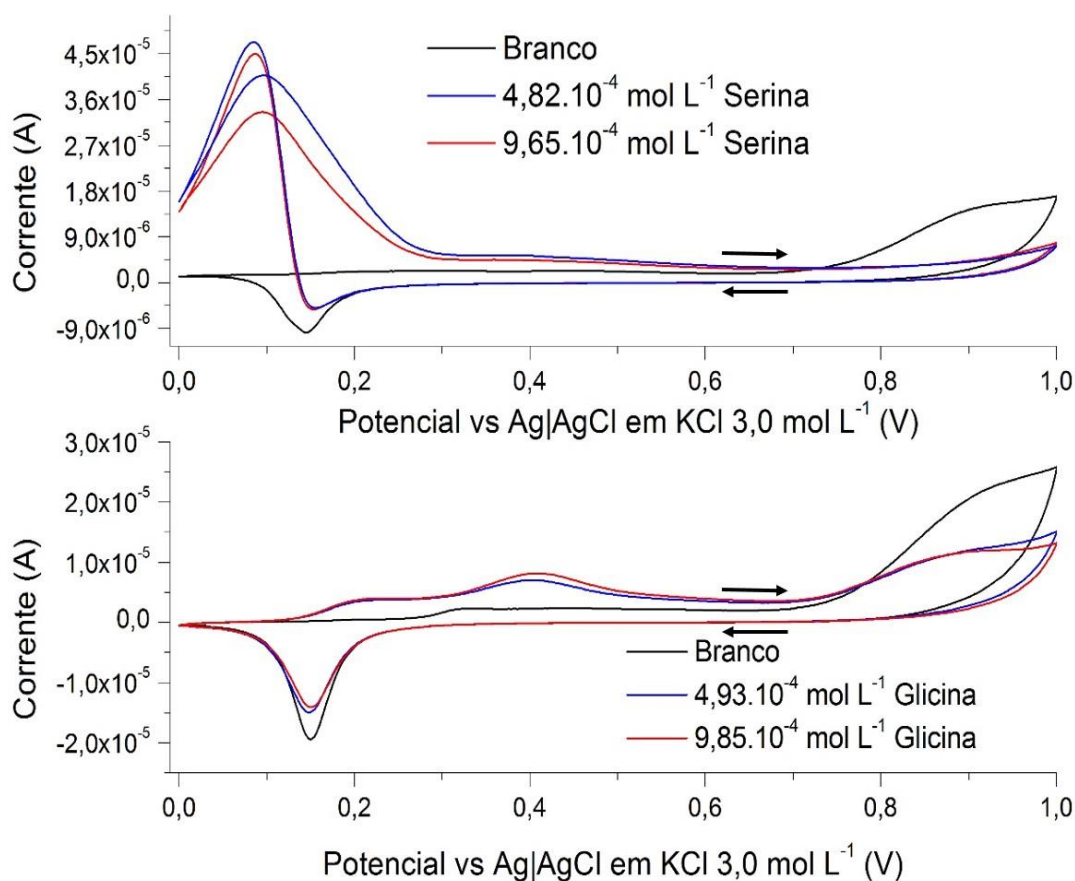


Figura 19 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de ouro em meio de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a varredura iniciando em 0V e velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} . Medidas realizadas com glicina e serina.

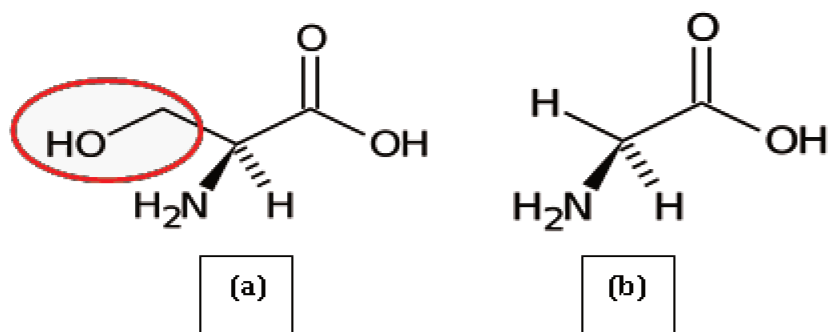


Figura 20 Estruturas moleculares: a) Serina com destaque ao grupo R, b) Glicina.

No caso apresentado na comparação entre serina e glicina, fica claro que há uma redução no potencial de oxidação do aminoácido para a serina. Isso se deve principalmente ao grupo R que no caso da serina possui uma hidroxila, o que faz com que a interação entre o aminoácido e o eletrodo ocorra de forma diferente para os diferentes aminoácidos. Como alternativa deve-se passar à análise do comportamento destes aminoácidos sobre o cobre e estudar a relação entre os grupos funcionais e o tipo de resposta obtida. Tem-se na Figura 21 o perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de cobre em meio de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ nele há as seguintes transições:

Oxidação de cobre 0 a cobre (I) que ocorre -400 mV a -150 mV e logo após a oxidação a cobre II que ocorre entre -125 mV a 0 mV. (60)

Redução de cobre (II) a cobre (I) que ocorre -400 mV a -600 mV e redução de cobre (I) a cobre 0 que ocorre entre -635 mV a -800 mV. (60)

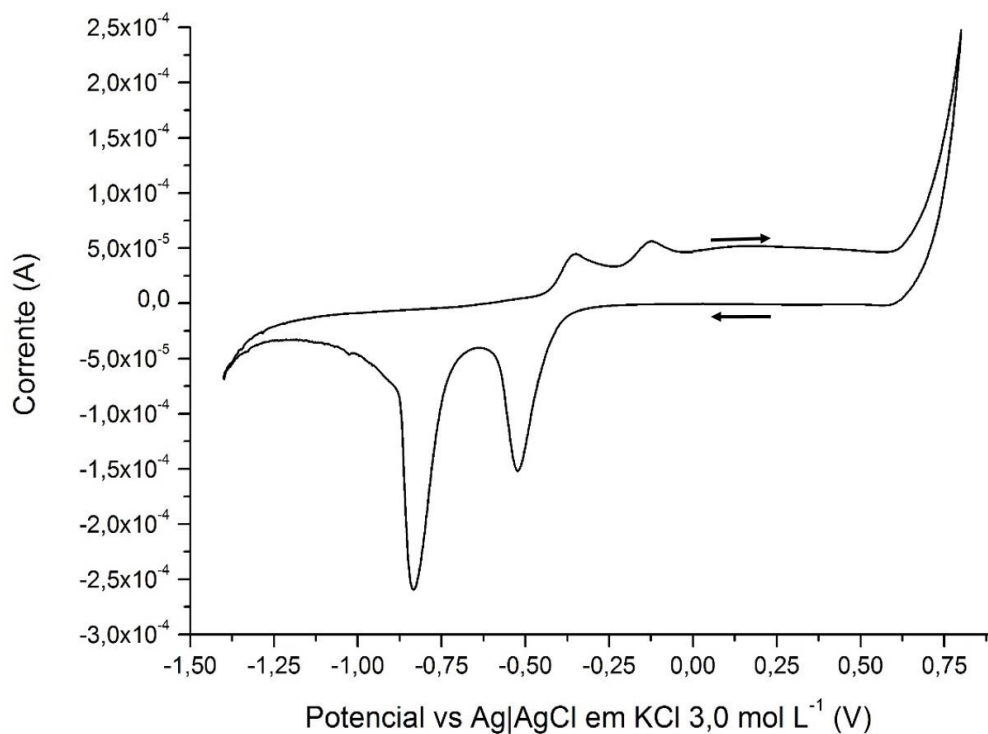


Figura 21 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de cobre em meio de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a varredura iniciando em 0V e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}

Quando é adicionado um aminoácido ao eletrólito, algumas mudanças do perfil voltamétrico do eletrodo ficam claras. Primeiro o aumento de corrente na região de formação do hidróxido de cobre II, que é atribuída a oxidação do aminoácido. Mostrando então a capacidade do eletrodo de cobre de responder na presença de aminoácidos Figura 22, porém também há um aumento no sinal correspondente a formação do cobre (I) e, como consequência, também há um aumento no sinal correspondente as reduções de cobre (II) a cobre (I) e de cobre (I) a cobre 0.

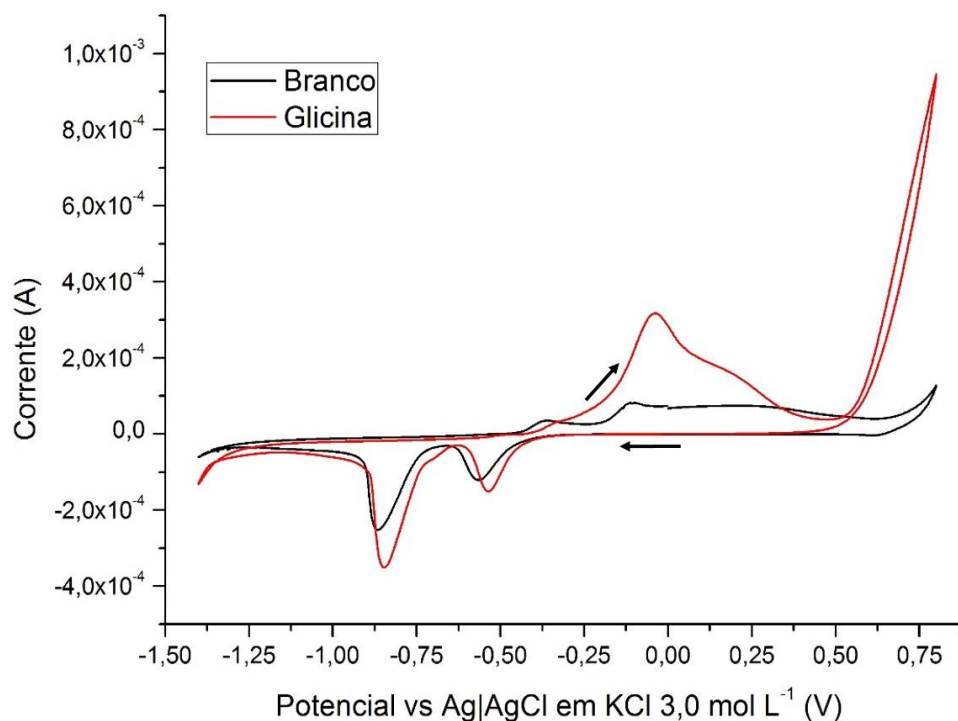


Figura 22 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de cobre em meio de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (em preto) e na presença de glicina (em vermelho) com a varredura iniciando em 0 V e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

Sabe-se que no eletrodo de ouro, diferentes aminoácidos, ou seja, diferentes grupos R, causam mudança no perfil voltamétrico em relação ao obtido para o eletrodo de ouro sem modificação. Na mesma condição em que se realizam as medidas no eletrodo de ouro, no cobre se tem os resultados apresentados na Figura 23. Quando os diferentes aminoácidos são oxidados em um eletrodo de cobre, a resposta é idêntica para ambas moléculas, demonstrando que sobre o eletrodo de cobre o mecanismo é relacionado à estrutura do amino ácido e que é comum a todas as moléculas deste grupo. Sendo assim, então o grupo R embora possa influenciar as características das moléculas, como solubilidade em água, ponto isoelétrico e massa molecular, não influenciam o perfil voltamétrico de forma significativa. Foram testados os 21 aminoácidos essenciais, contudo somente o exemplo da glicina e da serina são apresentados por mostrarem de forma clara e significativa as diferenças observadas para os aminoácidos.

Esta característica virá a facilitar a aplicação deste material, pois neste caso o grupo R do aminoácido em estudo não alteraria a resposta esperada, seja essa alteração devido ao deslocamento do potencial de oxidação para valores maiores ou menores, dependendo do aminoácido.

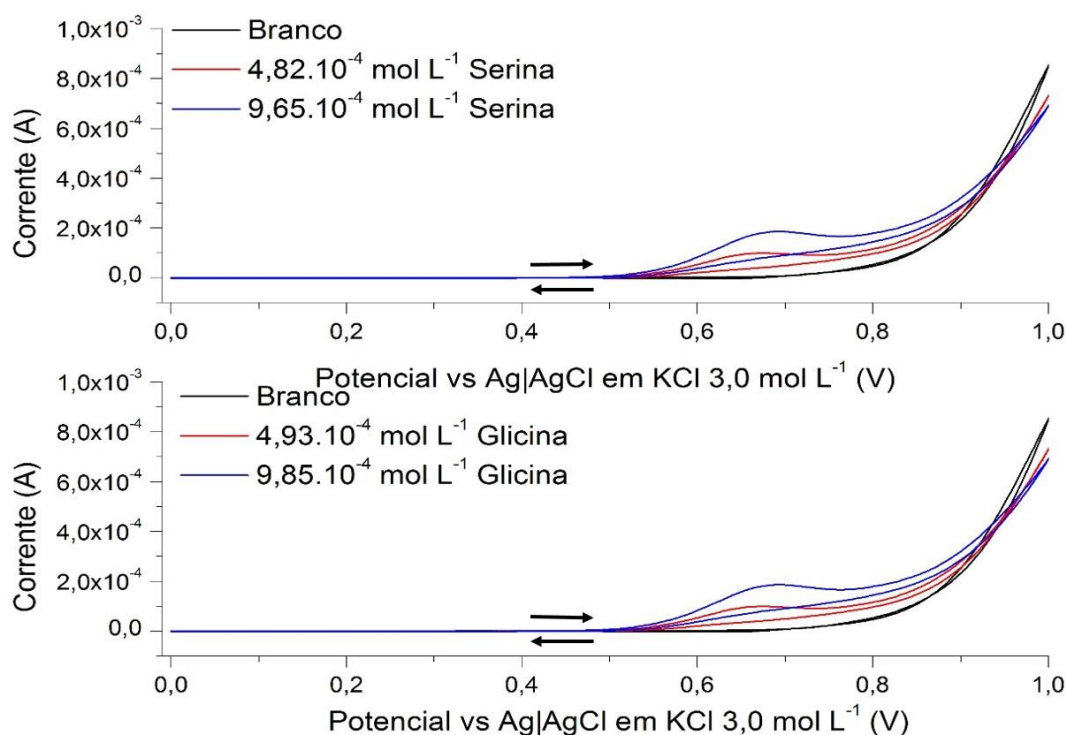


Figura 23 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de cobre em meio de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ com a varredura iniciando em 0 V e velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹. Medidas realizadas com glicina e serina.

IV.2 – Mecanismo de oxidação.

Seguindo o trabalho de Zen (58), e a metodologia já apresentada, uma série de experimentos foi planejada para que fosse possível identificar quais os possíveis mecanismos envolvidos na interação com subsequente oxidação dos aminoácidos em eletrodos de cobre. Zen descreveu que há duas regiões que podem ser utilizadas para a detecção dos aminoácidos. Na primeira delas, em potenciais entre -0,5 à 0 volts versus Ag|AgCl em KCl 3,0 mol L⁻¹, tem-se a formação de um complexo entre o aminoácido com o cobre (I). Na Figura 24 resta em destaque a região, no voltamograma característico do cobre em meio básico.

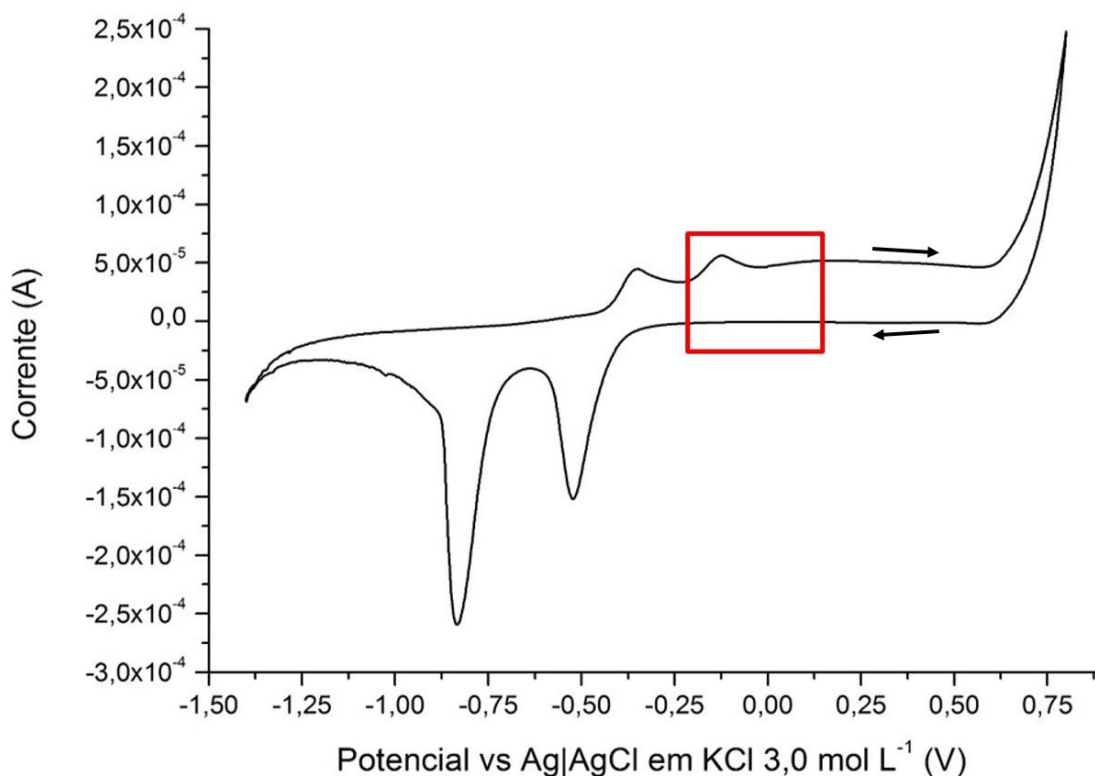


Figura 24 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de cobre em meio de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a varredura iniciando em 0 V e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Em destaque região onde ocorre a formação do complexo aminoácido – cobre.

Quando adicionam-se os aminoácidos, há duas respostas distintas como apresentado na Figura 25. No caso da glicina, a resposta é coerente com o que é apresentado no trabalho de Zen. Fica clara a diminuição da corrente em função da adição e aumento da concentração dos aminoácidos. Isso se deve a formação do complexo entre o aminoácido e cobre (I). Nesta etapa, o aminoácido interage com o cobre e estabiliza este óxido. Nesta estabilização não há a formação de novas camadas, logo a quantidade de sítios que reagem é baixa e a corrente diminui frente ao eletrodo que está somente em eletrólito.

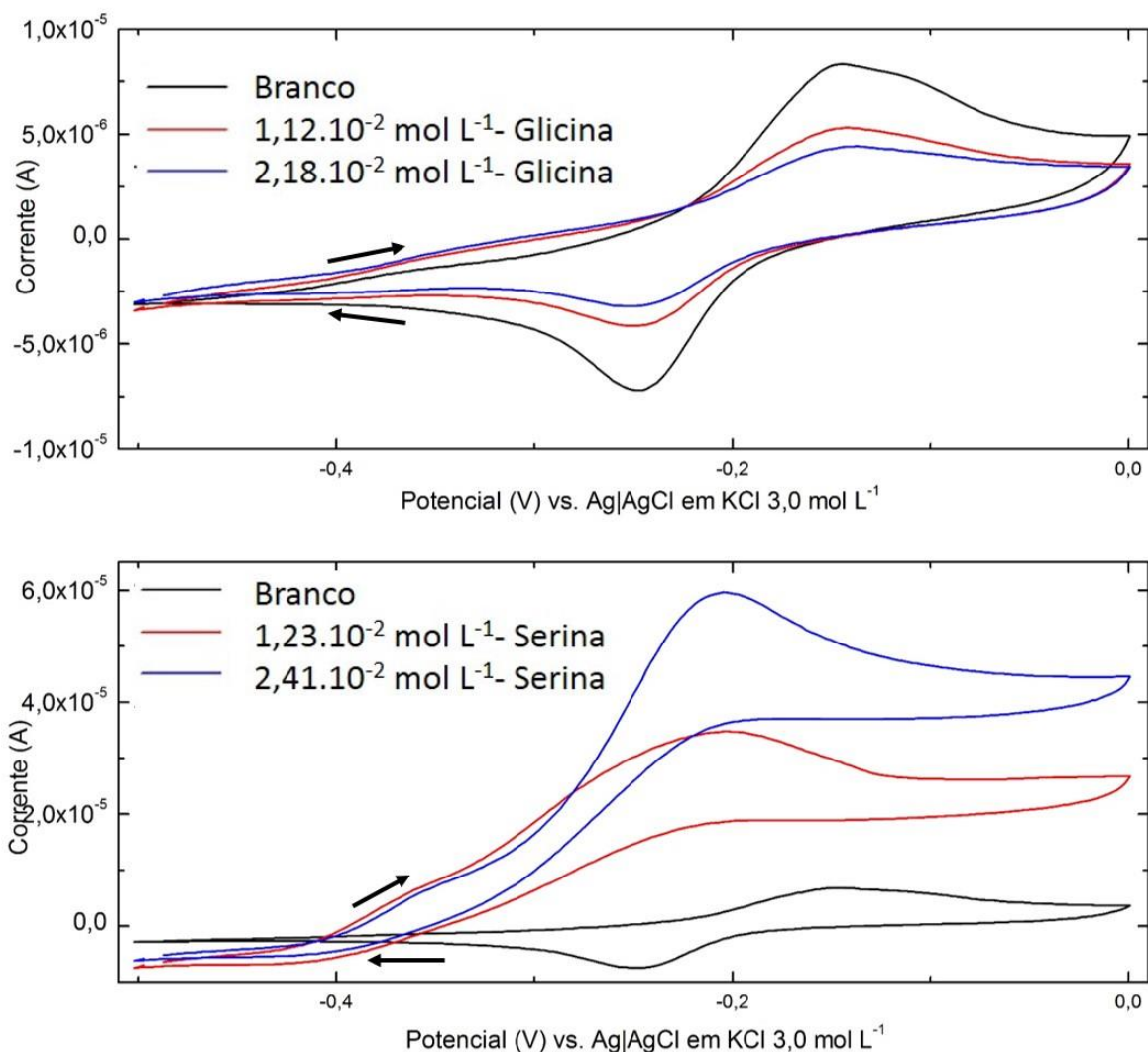


Figura 25 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de ouro em meio de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a varredura iniciando em $-0,4 \text{ V}$ e velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} . Medidas realizadas com glicina e serina. Faixa de potencial onde ocorre a complexação entre o aminoácido e cobre.

Na presença de serina o perfil obtido é diferente. Neste caso, na região onde é esperada a formação de complexo aminoácido-cobre, a energia do sistema já é suficiente para que ocorra a oxidação do aminoácido. Isto pode ser atribuído ao grupo R que sofre oxidação. Sendo então o tipo de interação aminoácido - eletrodo de cobre dependente do grupo R, como no eletrodo de ouro. O que novamente traz à tona o problema existente com o eletrodo de ouro, diferentes perfis voltamétricos para diferentes moléculas.

Com o intuito de avaliar a região em que de fato ocorre a oxidação dos aminoácidos, os experimentos foram conduzidos em potenciais mais positivos, entre 0 à 0,7 volts *versus* Ag|AgCl em KCl 3,0 mol L⁻¹, destacado na Figura 26.

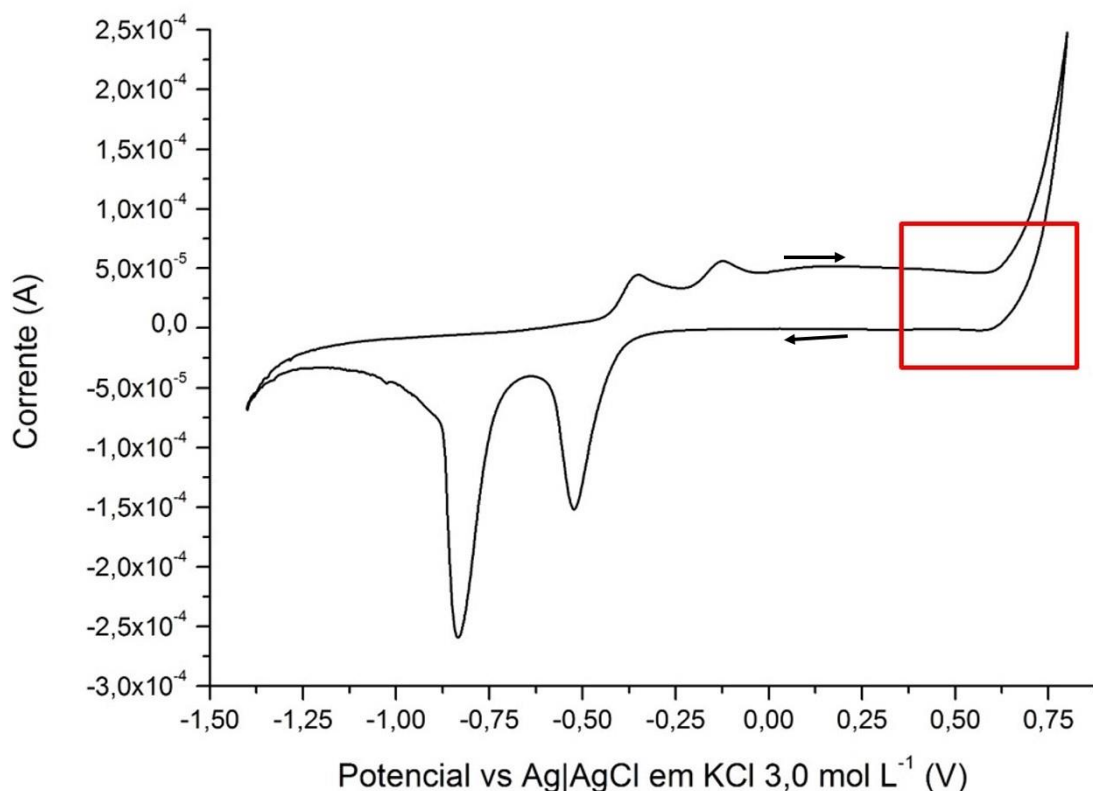


Figura 26 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de cobre em meio de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ com a varredura iniciando em 0 V e velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. Em destaque região onde ocorre a oxidação do aminoácido.

Como pode-se constatar na Figura 27, a glicina e a serina são, novamente empregadas como sonda. Na região de potencial em estudo, que Zen apresenta como a região em que acontece a oxidação dos aminoácidos, tem-se uma resposta que é idêntica para ambas moléculas. Esta informação foi importantíssima para a continuidade do trabalho, pois é necessário que haja um potencial no qual os aminoácidos respondam de forma similar para que este possa ser aplicado como potencial de detecção no sistema em fluxo. Com os experimentos realizados nesta parte do trabalho, pode-se ver que este potencial está nesta segunda região com um valor entre 0,5 à 0,6 V *versus* Ag|AgCl em KCl 3,0 mol L⁻¹.

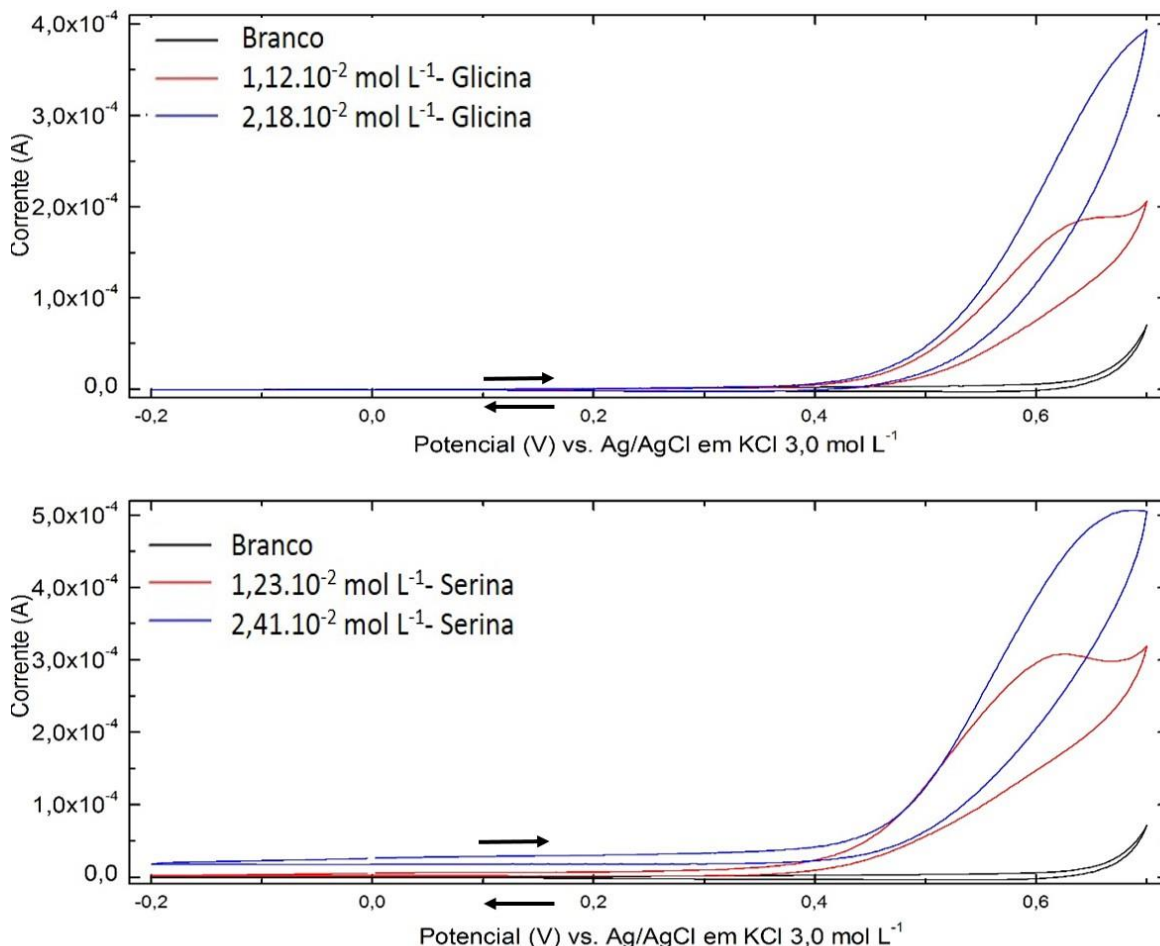


Figura 27 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de ouro em meio de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a varredura iniciando em 0 V e velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} . Medidas realizadas com glicina e serina. Faixa de potencial onde ocorre a oxidação do aminoácido.

IV.3 – Influência do óxido

A região onde ocorre a oxidação do aminoácido é a mesma onde o eletrodo de cobre sofre oxidação para o óxido de cobre II, logo pode-se supor uma clara relação entre o óxido de cobre II e a oxidação do aminoácido(25). Porém, também se sabe que o óxido de cobre II é um isolante. Camadas muito espessas de óxido de cobre II impedem a transferência eletrônica, mas, ao mesmo tempo, o óxido de cobre II é necessário para a oxidação do aminoácido no eletrodo. Considerando estes fatores a Figura 28 demonstra que conforme aumenta o tempo de oxidação do eletrodo, ou seja a espessura da camada de óxido de cobre II formada, há uma

queda na intensidade do sinal referente a oxidação do aminoácido utilizado como sonda.

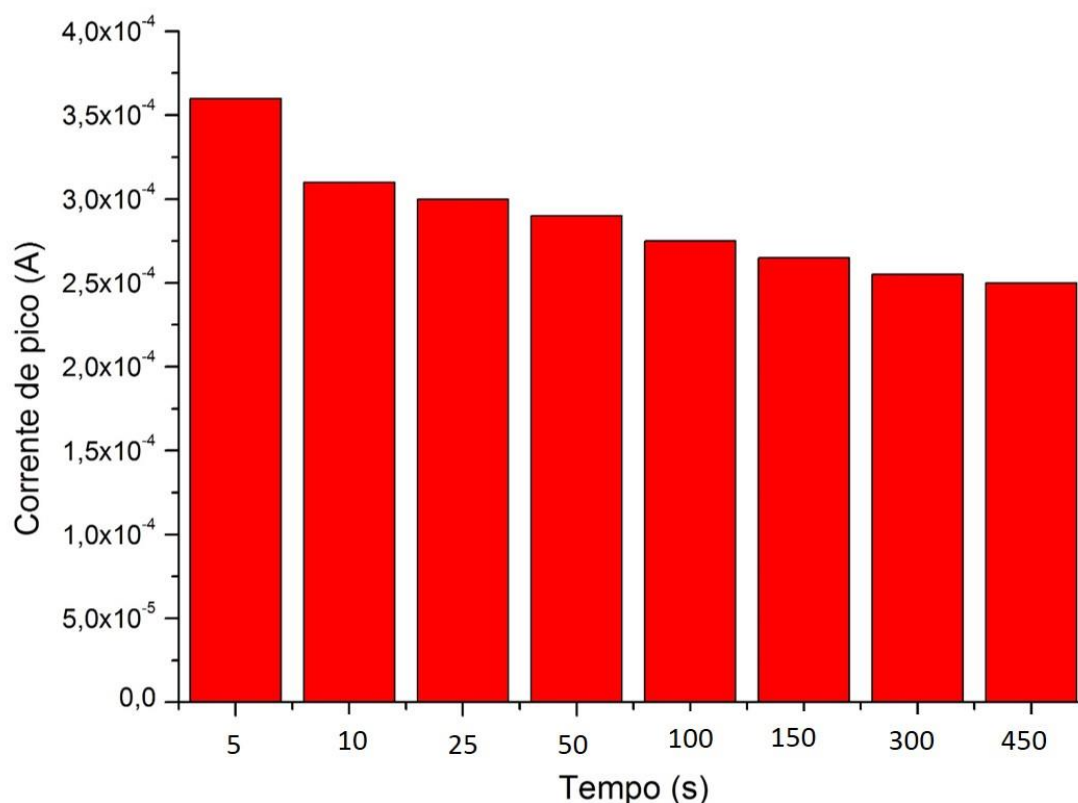


Figura 28 Intensidade do sinal em função do tempo de oxidação do cobre.

Para a aplicação em fluxo, a voltametria cíclica não é uma metodologia interessante. Os métodos eletroquímicos mais utilizados para a detecção são a amperometria e a amperometria pulsada. No caso do sistema para detecção de aminoácidos em eletrodo de cobre, a amperometria não será viável. Mantendo o potencial constante durante a medida, a camada de óxido de cobre II se tornaria muito espessa e mudaria a intensidade do sinal obtido, podendo levar até a perda total de sinal devido ao total isolamento do eletrodo.

IV.4 Otimização do pulso.

Como apresentado no tópico anterior, há uma impossibilidade do uso da amperometria como método para a detecção devido ao crescimento da camada de óxido na superfície do eletrodo. Para contornar esta questão e permitir que o sistema seja usado por longos períodos de tempo sem perdas de sensibilidade e qualidade da medida, um pulso de potencial teve de ser desenvolvido. A estratégia para o desenvolvimento deste pulso foi reestruturar a superfície do eletrodo de forma que a camada de óxido de cobre II formada não se torne tão espessa.

Usando os voltamogramas cíclicos do cobre e dos aminoácidos sobre cobre como referência, tem-se que a camada de óxido de cobre II e a oxidação do aminoácido ocorrem em potenciais de 0,6 V vs. Ag|AgCl em KCl 3,0 mol L⁻¹. Portanto o potencial ideal para a formação do óxido e oxidação dos aminoácidos. Um segundo momento do pulso é representado pela redução da camada de óxido de cobre II formada. Não uma completa redução desta camada, levando o eletrodo a cobre metálico, mas um decréscimo da espessura da camada formada. A Figura 29 representa de forma mais clara o pulso de potencial desenvolvido. Note que a escala de potencial está versus Ptlr que no caso deste trabalho é o eletrodo de referência utilizado na célula de fluxo.

Uma série de estudos foram realizados para a obtenção do pulso da Figura 29, os tempos de aplicação de cada potencial foram otimizados. Para o potencial de oxidação, tempos inferiores a 1,35 segundos, influenciam no tempo de reação que permite a interação entre o aminoácido e o óxido de cobre II, o que dificulta a oxidação do aminoácido. Tempos superiores a 1,35 fazem com que o tempo total de pulso seja muito alto, o que se reflete na resolução do sistema, idealmente, quanto mais curto o pulso mais pontos por evento é possível se obter. O tempo utilizado na etapa de redução foi otimizado considerando o menor tempo possível para manter uma linha de base estável no sistema evitando um pulso com tempo total muito alto.

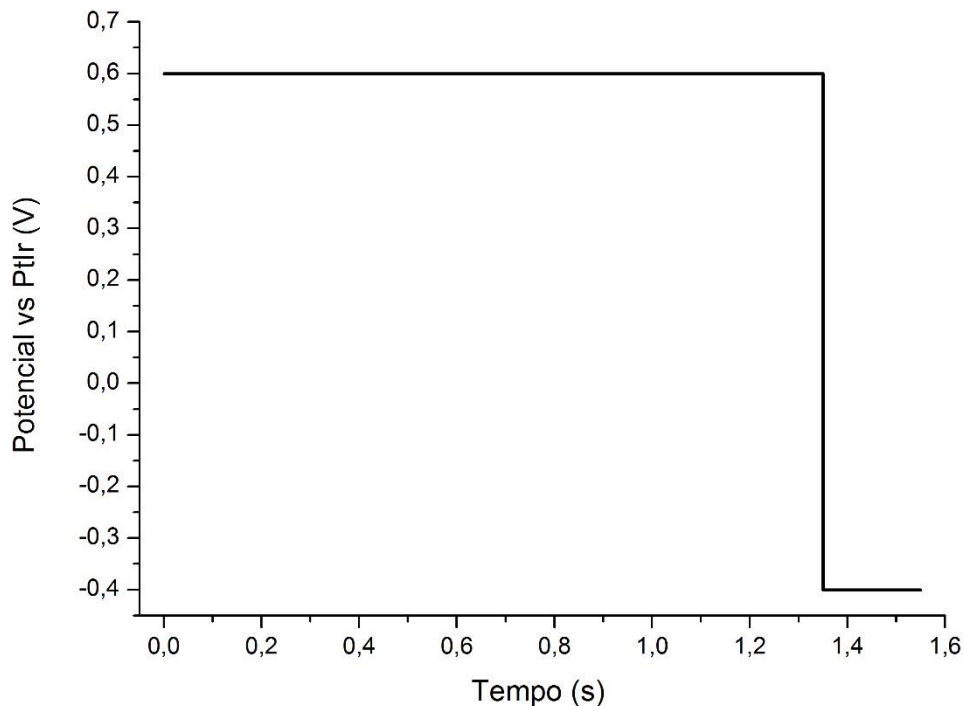


Figura 29 Pulso de potencial desenvolvido.

IV.5 – Limitações

Após o desenvolvimento do pulso de potencial a sua efetividade foi colocada à prova no sistema de fluxo. Na Figura 30 estão apresentados os cromatogramas obtidos com o eletrodo de cobre, com o pulso desenvolvido. Pode-se observar que inicialmente a linha de base se mantém estável. Contudo na análise realizada em sequência a linha de base começou a sofrer alterações.

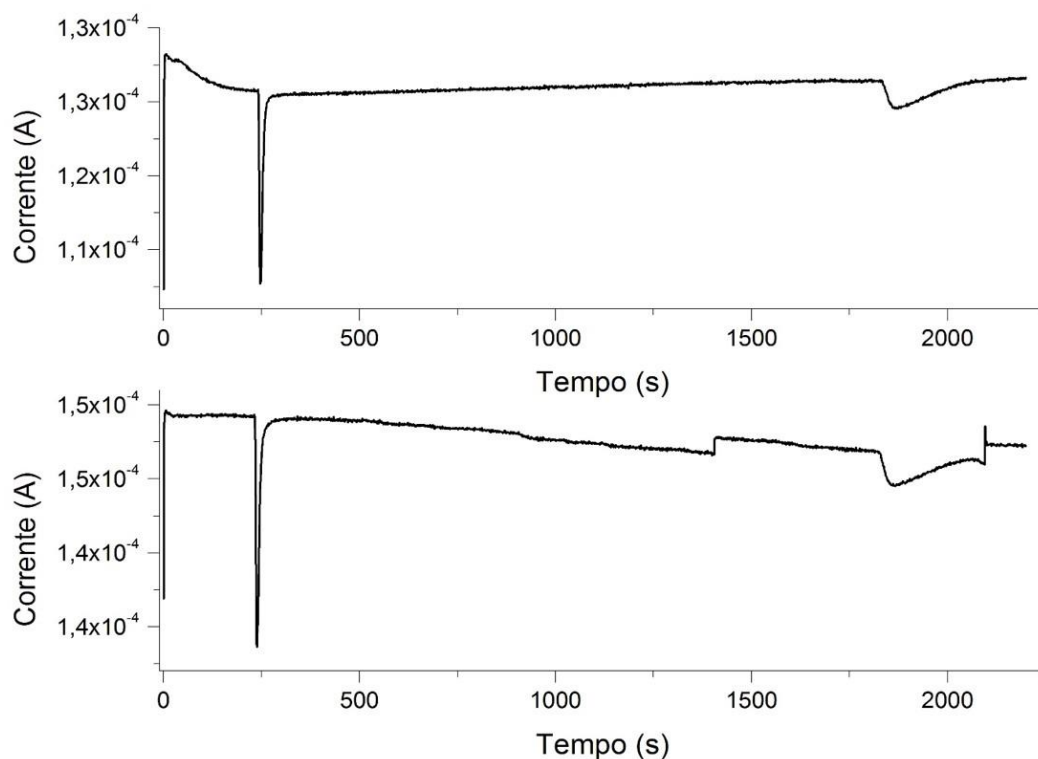


Figura 30 Cromatogramas obtidos em célula de fluxo com eletrodo de trabalho em cobre, tendo como eluente hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção amperométrica pulsada conforme pulso apresentado na Figura 29.

A conclusão que pode-se obter deste experimento é que o cobre puro não possui grande resistência à corrosão. Como a medida planejada envolve a oxidação forçada do eletrodo em meio alcalino, mesmo utilizando o pulso para contornar a oxidação excessiva, ao longo do tempo não foi possível evitar a corrosão. Na Figura 31 está apresentada a consequência da medida no eletrodo após a medida sofrer alteração. Fica claro que a corrosão do cobre foi danosa ao eletrodo a medida do uso, mostrando que o cobre puro como material eletródico para o sistema proposto é inviável. Sendo então o uso de ligas de cobre uma alternativa muito interessante. Pois permite aliar as propriedades do cobre, que é o componente majoritário, com outros metais que aumentam a resistência à corrosão.

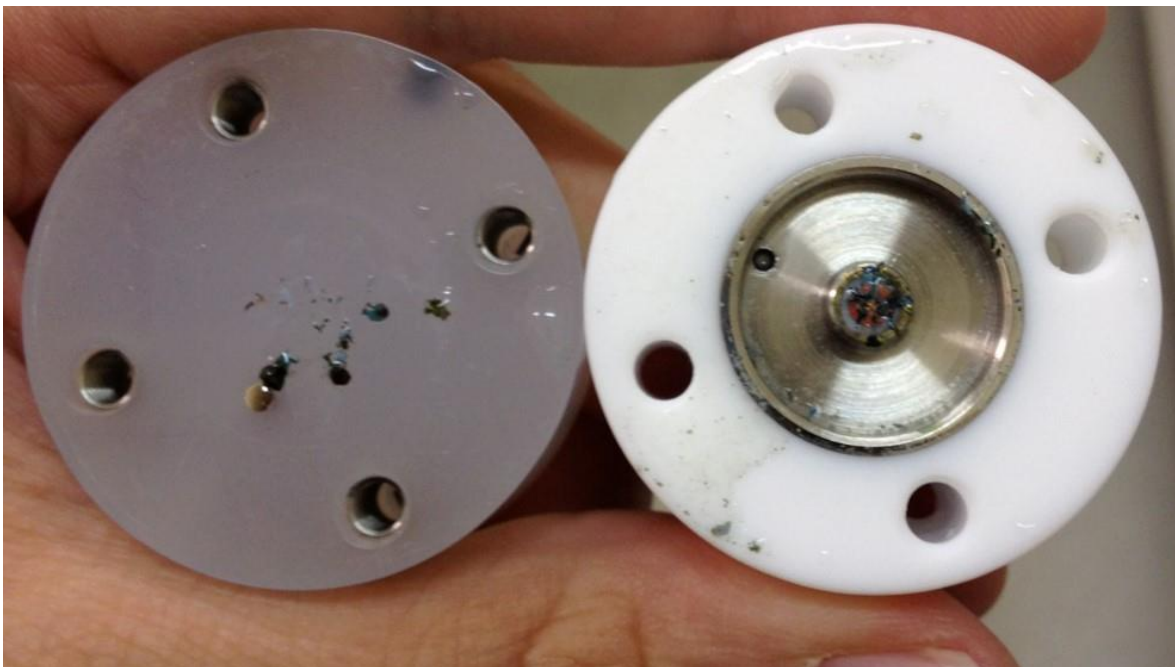


Figura 31 – Fotografia retirada após a abertura da célula de fluxo.

V – Resultados e Discussão Ligas de Cobre

V.1 – Caracterização das ligas de cobre.

Para garantir a qualidade e confiabilidade dos materiais comprados para fabricação dos eletrodos, foram feitas análises de EDX (*Energy-dispersive X-ray spectroscopy*) e XRF (*X-ray fluorescence*) a título de análise semi-quantitativa dos componentes majoritários das amostras. Mesmo se tratando de técnicas quantitativas, nesta aplicação foram escolhidas essas técnicas de forma semi-quantitativa, pois as informações a serem obtidas serviriam para que fosse possível comparar os valores com os valores da tabela fornecida pelo fabricante dos materiais. A preparação do material para as análises consistia no polimento dos metais com alumina 0,3 μm até a obtenção de uma superfície plana e brilhante. Após este tratamento os metais foram sonicados em uma solução de etanol água 1:1, sendo depois as medidas realizadas. Nas Tabela 1 e Tabela 2 constam estes resultados dos componentes majoritários presentes nas ligas compradas.

Tabela 1: Comparação das concentrações dos elementos majoritários presentes na liga Bronze TM 23 utilizada para a fabricação dos eletrodos.

Componente/Técnica	EDX	XRF	Fabricante
Cu	78,2%	73,9%	<70%
Pb	Não detectado	10,6%	>20%
Sn	5,2%	4,5%	<4%
Zn	10,9%	8,9%	>9%

Tabela 2: Comparação das concentrações dos elementos majoritários presentes na liga Bronze TM 620 utilizada para a fabricação o dos eletrodos

Componente/Técnica	EDX	XRF	Fabricante
Cu	84,9%	87,1%	<86%
Pb	Não Detectado	0,5%	>1%
Sn	6,9%	7,9%	<7%
Zn	5%	4%	>5%

As técnicas de EDX e XRF foram escolhidas, pois se tratam de técnicas não destrutivas. Além disso, não haveria a necessidade de preparo ou digestão da amostra para sua posterior análise. Nos resultados obtidos observa-se que o elemento chumbo não é detectado na análise de EDX, isso se deve ao fato de que nas condições de análise empregadas (aceleração de elétrons utilizada para estas análises) não houve energia suficiente para a detecção deste elemento. Caso este parâmetro fosse mudado, mudaria também a profundidade a qual o feixe de elétrons penetraria na amostra, podendo até mesmo aparecerem sinais oriundos do porta amostra. Esse fato levou a necessidade de uso de duas técnicas para a análise da amostra. Além disto a uma diferença na penetrabilidade dos feixes, a técnica de EDX tem melhor condição para avaliar a superfície do metal. Quanto a técnica de XRF tem uma penetração maior na amostra, permitindo uma análise mais homogênea dos componentes. Para observar a proporção dos metais na liga, ambas as técnicas se mostraram viáveis e coerentes com as proporções fornecidas pelo fabricante. Contudo os resultados apresentados por XRF se mostram mais confiáveis, pois as proporções levam em conta o elemento chumbo. Também é possível afirmar que os materiais utilizados neste trabalho estão de acordo com o desejado.

V.2 Estudos voltamétricos preliminares do bronze.

Como mostrado no tópico anterior a maior parte do material que compõem o bronze é cobre. Contudo o comportamento eletroquímico deve ser investigado para analisar a viabilidade do eletrodo frente a oxidação dos aminoácidos. Primeiramente as mesmas condições do sistema em cobre foram testadas. Um voltamograma característico do eletrodo foi obtido. Como apresentado na Figura 32, pode-se constatar que o perfil voltamétrico obtido é similar aquele para o eletrodo de cobre. Ficando claro que o bronze pode vir a ser uma boa alternativa, mas em seguida deve-se avaliar o comportamento frente aos aminoácidos.

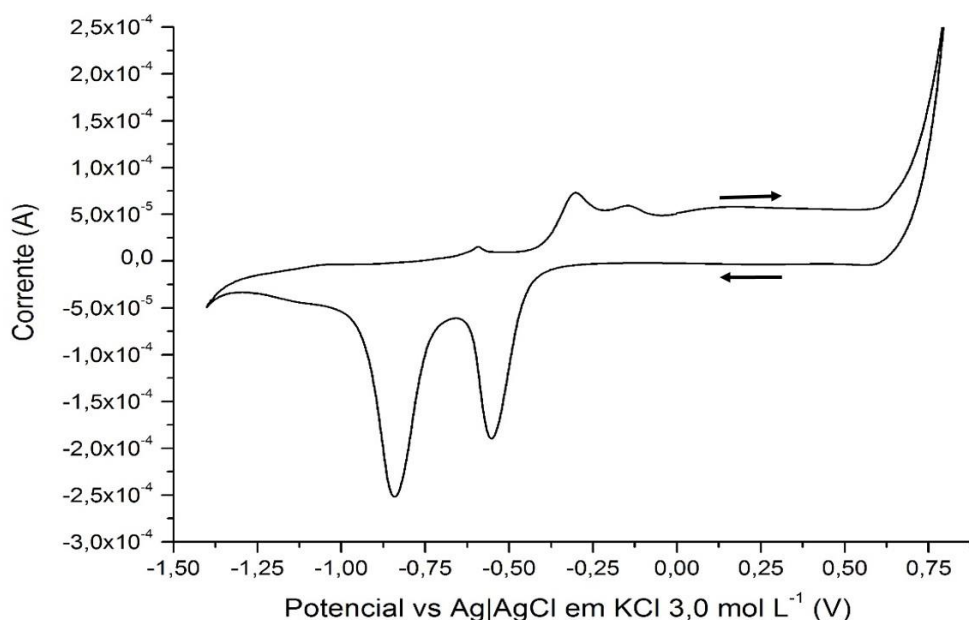


Figura 32 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de bronze TM 620 em meio de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a varredura iniciando em 0 V e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}

Quando são adicionados os aminoácidos o comportamento novamente é característico ao metal em maior proporção na liga. Como mostrado na Figura 33. Mas agora uma segunda questão surge: Como a proporção de cobre na matriz da liga influencia a resposta obtida? Nas Figura 34 e Figura 35 fica evidente que com o decréscimo da quantidade de cobre na liga e com os novos elementos, a liga com

menor quantidade de cobre se torna inviável para usos futuros. Visto que há perdas significativas na intensidade do sinal obtido com este sistema.

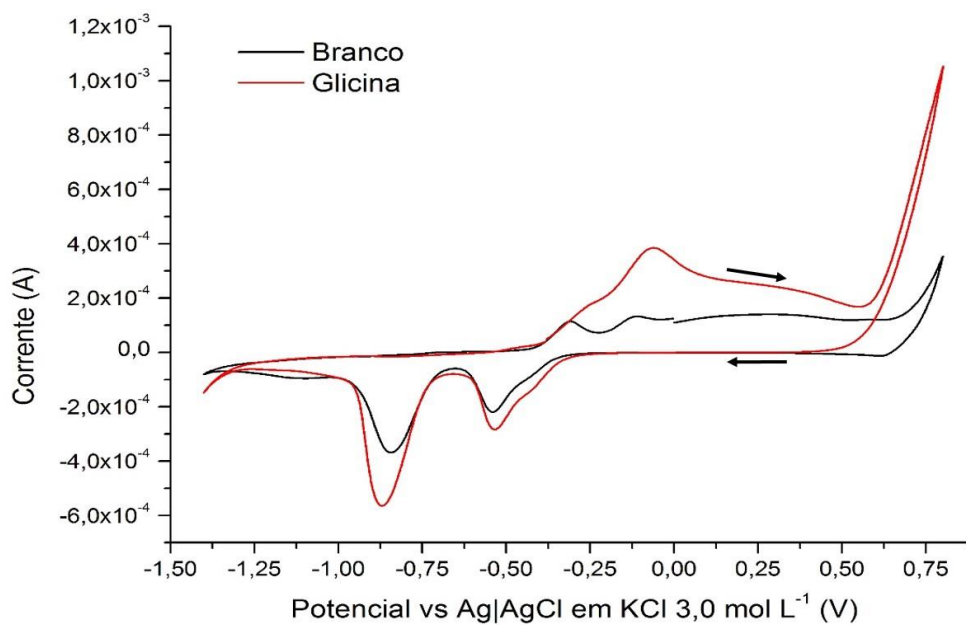


Figura 33 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de bronze TM 620 em meio de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ (em preto) e na presença de glicina (em vermelho) com a varredura iniciando em 0 V e velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹

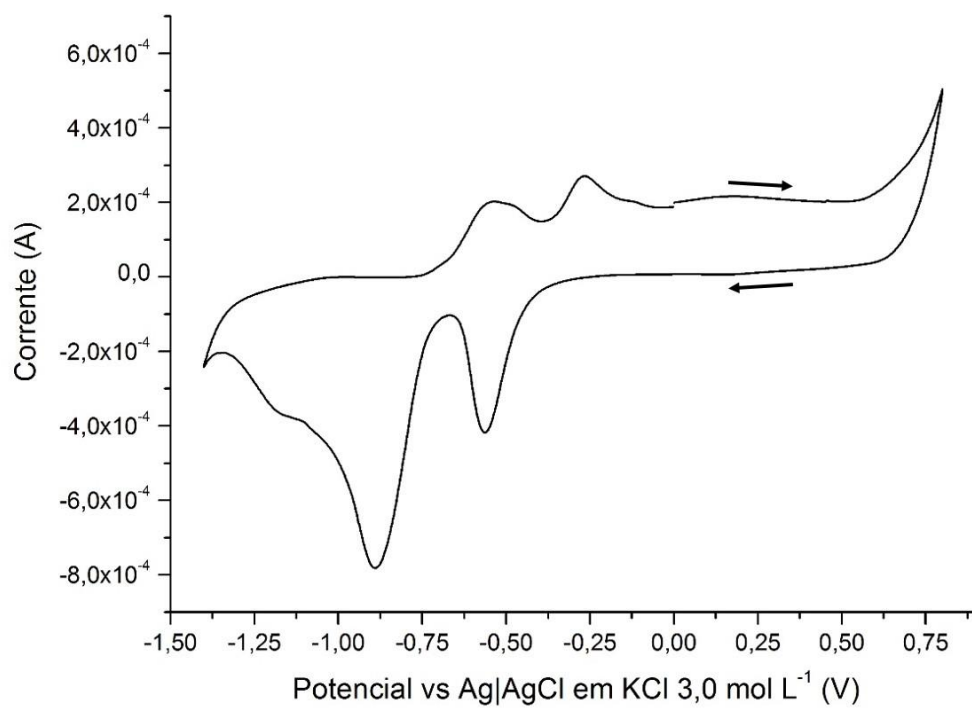


Figura 34 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de bronze TM 23 em meio de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ com a varredura iniciando em 0 V e velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹ .

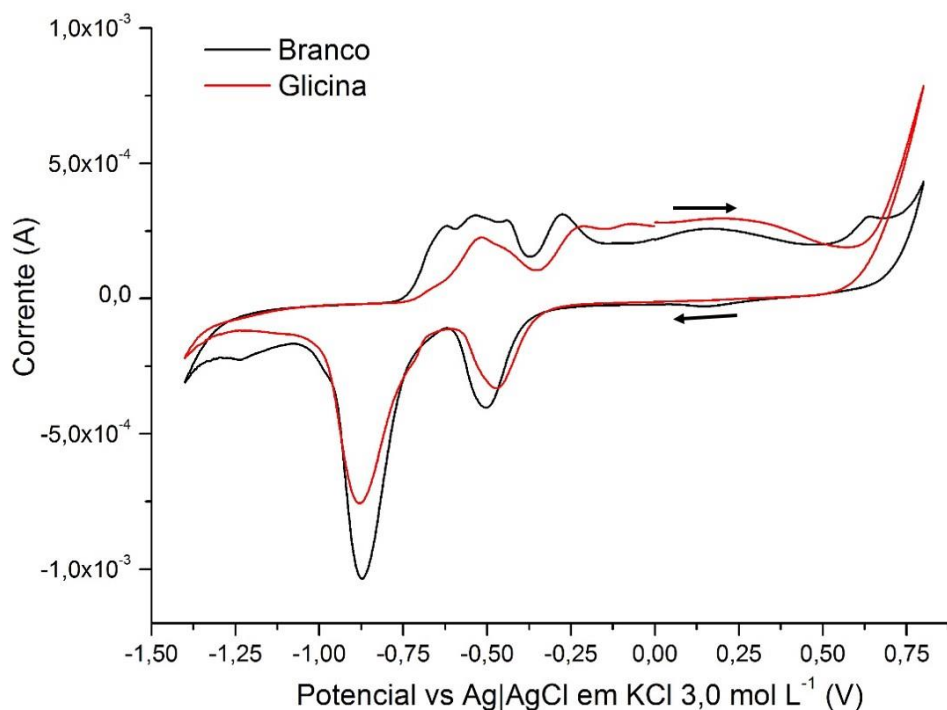


Figura 35 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de bronze TM 23 em meio de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (em preto) e na presença de glicina (em vermelho) com a varredura iniciando em 0 V e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}

V.3 Mecanismo de oxidação do aminoácido no Bronze TM 620.

Seguindo a linha de trabalho com o cobre, a última avaliação a ser realizada para verificar a viabilidade do bronze como material para oxidação de aminoácidos é a resposta frente a aminoácidos com diferentes grupos R. Utilizando serina e glicina como sondas, vê-se que, assim como no cobre, as respostas são idênticas. Podendo chegar a mesma conclusão que o mecanismo está diretamente relacionado ao grupo aminoácido e não há influência do grupo R na oxidação do aminoácido na faixa estudada.

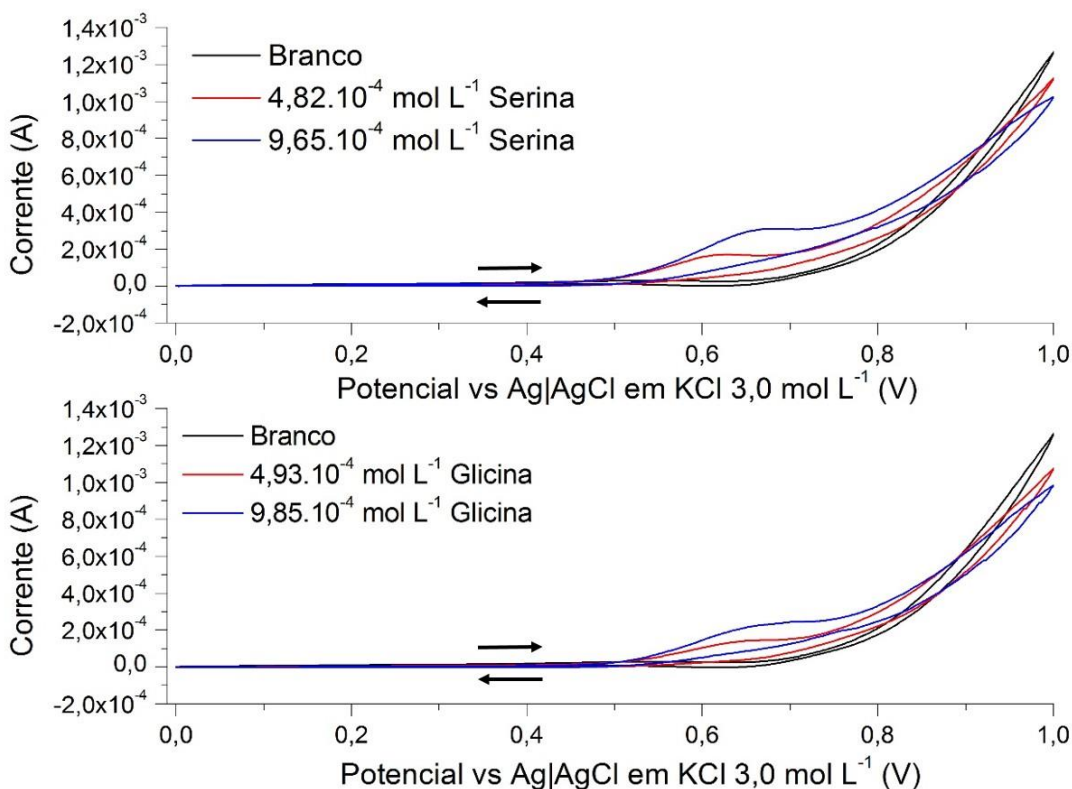


Figura 36 Perfil de corrente em função do potencial para o eletrodo de ouro em meio de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a varredura iniciando em 0 V e velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} . Medidas realizadas com glicina e serina. Faixa de potencial onde ocorre a oxidação do aminoácido.

V.4 Estudos em Fluxo.

Após confirmada a viabilidade do uso de bronze como material para a fabricação do eletrodo, adequamos agora as condições de seu uso em fluxo para extrair os melhores resultados. Neste caso a primeira modificação foi no pulso de potencial. Como o bronze é capaz de resistir melhor a corrosão, é possível aumentar o potencial de detecção no final do pulso, sem comprometer a estrutura do material. Este aumento é interessante pois permite que os valores de corrente obtidos sejam mais altos. Como apresentado na Figura 37, tem-se o pulso de potencial com este incremento. Este aumento de potencial foi realizado para deslocar a detecção mais próximo ao ponto de corrente máxima da oxidação dos aminoácidos, logo, obtendo um sinal mais intenso.

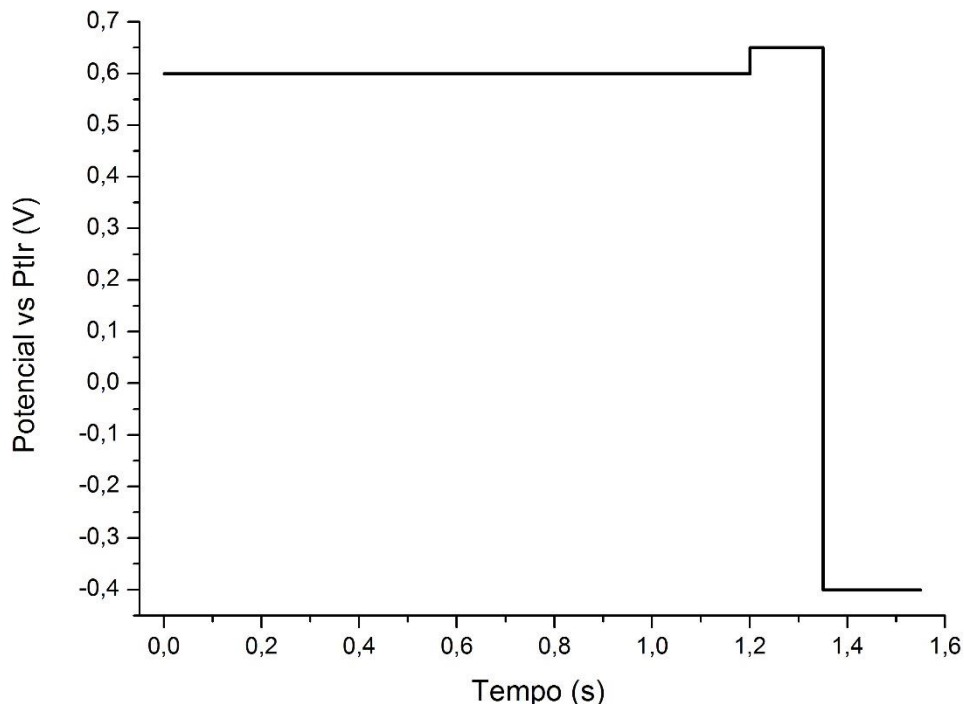


Figura 37 Pulso de potencial otimizado para detecção de aminoácido com a liga de cobre.

Na Figura 38 há o eletrodo de bronze TM 620 após sucessivas análises. Na Figura 40 ficam claras algumas questões. Diferentemente de cobre o eletrodo de bronze suportou as condições de uso sem maiores problemas. Também ficou claro que no centro do eletrodo, onde o fluxo atinge o eletrodo, o material reage de forma diferente. Isto fica claro na diferença de coloração das diferentes regiões do eletrodo e se deve ao fato de que as reações de oxidação dos aminoácidos ocorrem preferencialmente nesta região. No resto do eletrodo a superfície somente sofre a oxidação e redução do cobre. Logo, uma forma de melhorar o sistema seria a diminuição do eletrodo para um diâmetro que fosse compatível a saída do fluxo. Como apresentado na Figura 39 há o eletrodo da cela de fluxo com 1 mm de diâmetro. Nele pode-se observar que há pouca mudança no aspecto do eletrodo após o uso. Indicando que toda a sua área eletroativa está comprometida na oxidação dos aminoácidos.

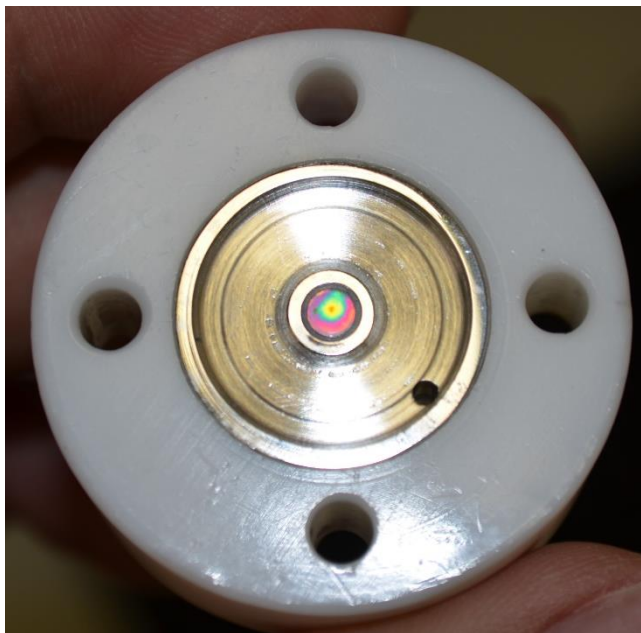


Figura 38 Célula de fluxo com eletrodo de trabalho com 3 mm de diâmetro. Destaque para a região amarela no centro do eletrodo de trabalho, indicando o local onde o fluxo atinge o eletrodo.

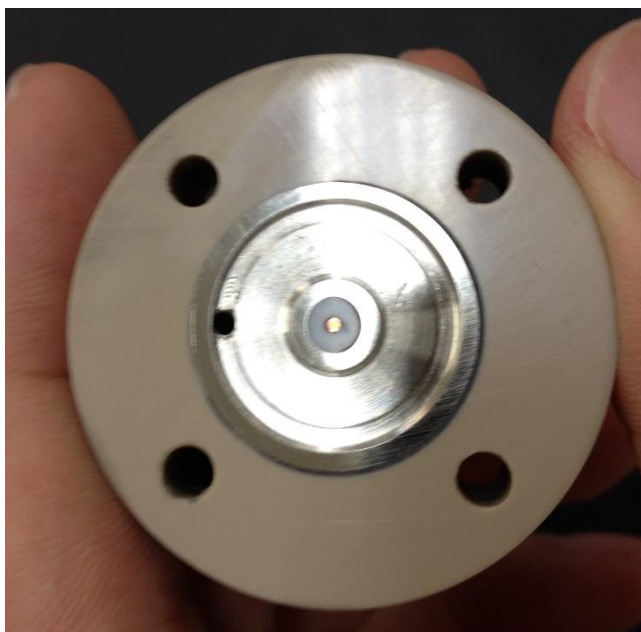


Figura 39 Célula com eletrodo de trabalho de 1 mm de diâmetro.

Após a otimização do pulso de potencial e tamanho do eletrodo de trabalho na célula de fluxo passa-se ao estudo em fluxo dos aminoácidos. Inicialmente é necessário determinar a viabilidade do uso do bronze, se diferente do cobre ele não

sofeteria com corrosão ao longo da medida. Como demonstrado na Figura 40 há 4 concentrações crescentes de uma solução contendo valina, isoleucina e leucina. As concentrações utilizadas na Figura 40 são, em azul $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $1,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de valina, leucina e isoleucina respectivamente. Em verde: $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ de valina, leucina e isoleucina respectivamente. Em vermelho: $3,75 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $3,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,75 \text{ mol L}^{-1}$ de valina, leucina e isoleucina respectivamente. Em amarelo: $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $4,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e $5,0 \text{ mol L}^{-1}$ de valina, leucina e isoleucina respectivamente. Nas condições empregadas no teste em relação ao e fase móvel e detecção amperométrica pulsada, diferente do cobre puro, o eletrodo de bronze TM 620 resistiu as injeções ao longo de mais de 4000 segundos, sem apresentar problemas. Isto pode ser percebido pela clara manutenção da linha de base bem como a sensibilidade ao aumento da concentração da amostra. Assim, o uso de ligas supera o uso de somente um metal puro.

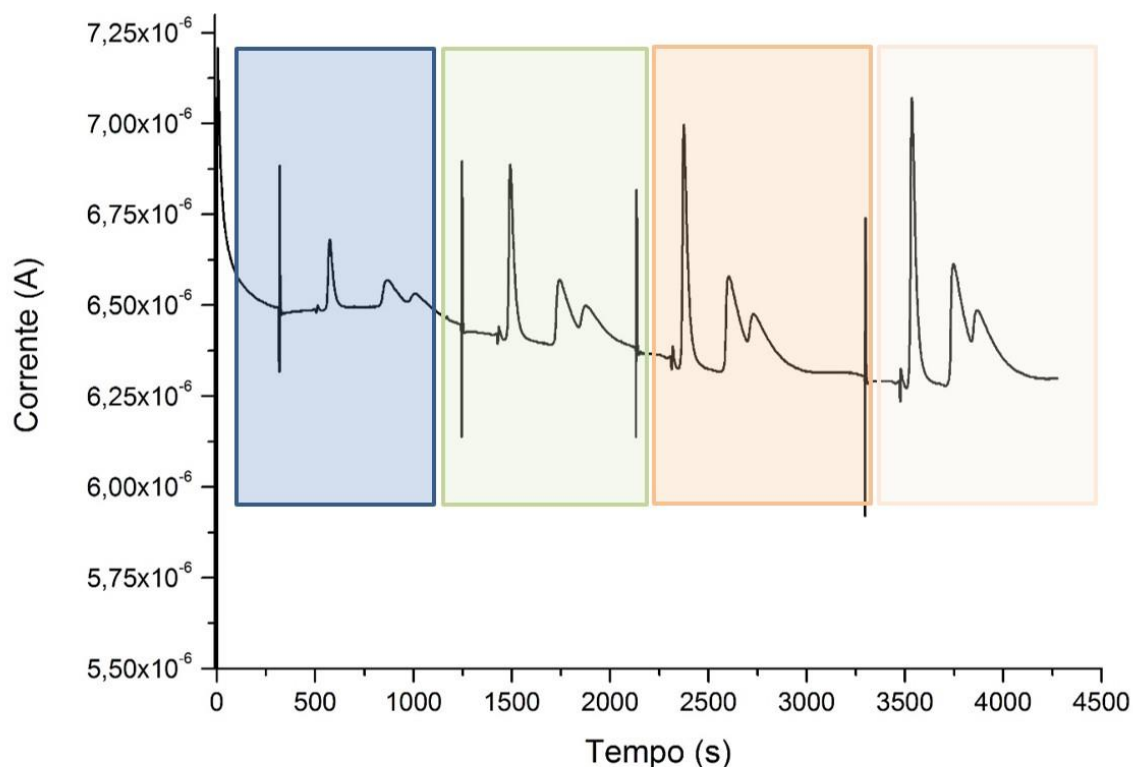


Figura 40 Cromatogramas obtidos em sequência com concentração crescente dos componentes da amostra. Vazão $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, fase móvel hidróxido de sódio $0,15$

mol L⁻¹ com acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹. Detecção amperométrica pulsada sobre eletrodo de bronze de 1 mm de diâmetro. As concentrações utilizadas são, em azul 1,0 10⁻³ mol L⁻¹, 1,0 10⁻² mol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ de valina, leucina e isoleucina respectivamente. Em verde: 2,5 10⁻³ mol L⁻¹, 2,0 10⁻² mol L⁻¹ e 2,5 mol L⁻¹ de valina, leucina e isoleucina respectivamente. Em vermelho: 3,75 10⁻³ mol L⁻¹, 3,0 10⁻² mol L⁻¹ e 3,75 mol L⁻¹ de valina, leucina e isoleucina respectivamente. Em amarelo: 5,0 10⁻³ mol L⁻¹, 4,0 10⁻² mol L⁻¹ e 5,0 mol L⁻¹ de valina, leucina e isoleucina respectivamente.

V.5 Robustez do sistema.

Nesta etapa foram estudados alguns parâmetros para ver como influenciariam a concentração da fase móvel, temperatura e vazão. Quando a fase móvel foi ligeiramente alterada, passando a ser composta por 0,13mol L⁻¹ de hidróxido de sódio, através da diluição da solução utilizada, o sistema teve um comportamento onde o coeficiente de variação da média dos picos de valina foi de 13,5%. Isto pode ser atribuído ao fato do óxido precisar de certas condições de pH para ser formado e com a otimização do pulso para as condições de pH da fase móvel a influência do pH se mostrou relevante. Comprovando esta afirmação, tem-se a variação quando há aumento da concentração de hidróxido de sódio na fase móvel, neste caso para 0,16 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio. O coeficiente de variação reduziu para 6,14% em relação à média dos picos. No estudo referente a temperatura da sala, com uma variação de 2 graus a menos o coeficiente de variação entre os picos e a média em condições normais ficou em 5,9%. Na situação inversa, com o aumento de dois graus o coeficiente de variação entre os picos e a média em condições normais ficou em 4,9%. Quando a vazão foi diminuída em 5%, de 1 mL.min⁻¹ para 0,95 mL.min⁻¹, simulando uma bomba com alteração, o coeficiente de variação foi de 10,03 % frente a média em condições normais. Isso pode ser explicado pela menor vazão promover uma maior difusão dos componentes na fase móvel e como consequência um achatamento dos picos.

Foi passado então para a investigação da estabilidade do sistema. Nesta etapa o experimento foi planejado para que houvesse o entendimento de como seria a variação da intensidade dos picos de valina ao longo de um grande número de sucessivas injeções. Quando consideramos a metodologia aplicada, temos que em

uma situação onde 25 injeções foram realizadas o equipamento foi desligado e novamente mais 25 injeções foram realizadas a variação dentre as médias de um dia para o outro foi de 0,8% para a concentração de $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Contudo, quando manteve-se o equipamento com o fluxo ligado e a célula eletroquímica desligada a variação entre os dias aumentou para 18,7%. Isso pode ser explicado pela ausência de controle no crescimento do óxido de cobre sobre o eletrodo. No caso do sistema desligado o crescimento foi baixo entre os dias, contudo no caso do eletrodo no qual a fase móvel passou por toda a noite antes da segunda série de injeções, houve um crescimento não controlado do óxido de cobre II que afetou de forma significativa a resposta.

V.6. Análise da amostra.

Nesta etapa do trabalho foi desenvolvida a metodologia para a análise de valina em suplementos alimentares. A valina tem uma atividade interessante no organismo, uma vez que tem a capacidade de evitar o catabolismo muscular, logo promove o anabolismo. Sendo ela disponível em vários suplementos alimentares do tipo BCAA (*Branched Chain Amino Acids* ou Aminoácidos de Cadeia Ramificada), que contêm valina, isoleucina e leucina. Para a análise desta amostra primeiramente obteve-se uma curva de calibração com todos os aminoácidos presentes na amostra. A curva de calibração está apresentada na Figura 41. Para a obtenção desta curva e da subsequente análise da amostra os parâmetros utilizados são os otimizados nos testes de robustez e reprodutibilidade. Nestes parâmetros há a fase móvel otimizada com $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de sódio e $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de acetato de sódio, temperatura do sistema em 32°C , vazão de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Obtivemos para a curva de calibração a seguinte equação:

$$\text{Concentração de valina na amostra} = \frac{\text{Área do pico} - 5,6471 \cdot 10^{-6}}{3,83904 \cdot 10^{-4}}$$

Para esta equação temos $R = 0,996$ com sensibilidade de $382 \mu\text{A L/mol}$ de valina.

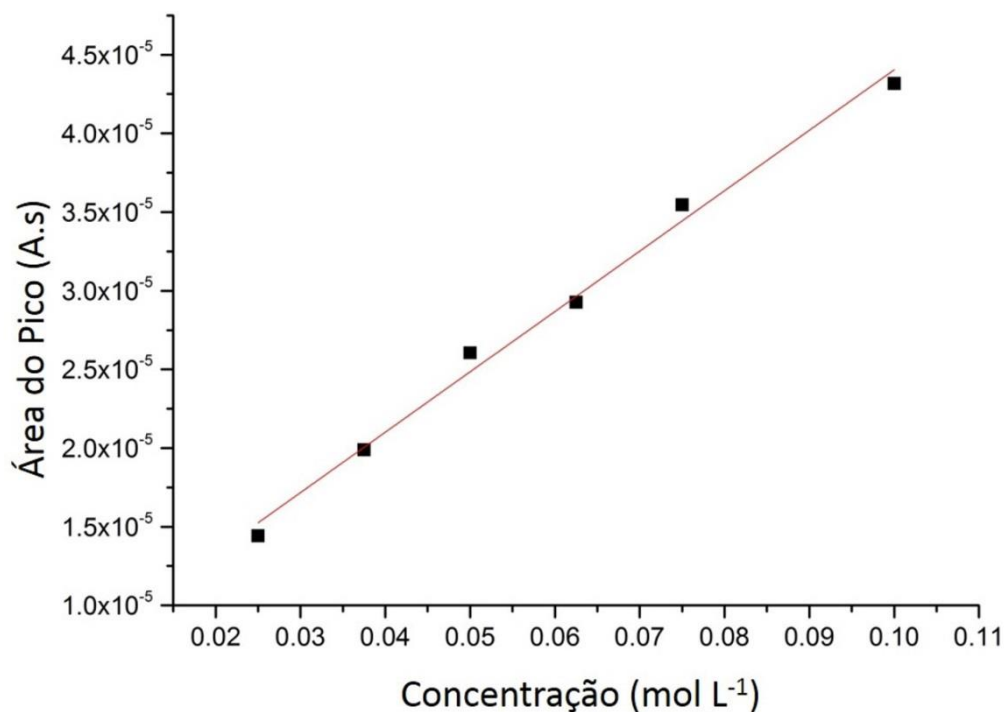


Figura 41 Curva de calibração para a valina.

A análise da amostra foi realizada com os parâmetros apresentados na seção de materiais e métodos. Está apresentado na Figura 42 o cromatograma obtido para a amostra de BCAA. Nele está claro o pico correspondente a valina que tem tempo de retenção de 7,5 minutos. Os aminoácidos que possuem picos de retenção em tempos próximos são a isoleucina e a leucina. Foi encontrado o resultado de 123 ± 2 mg por comprimido. Segundo o fabricante do suplemento este tem 125 mg de valina por cápsula.

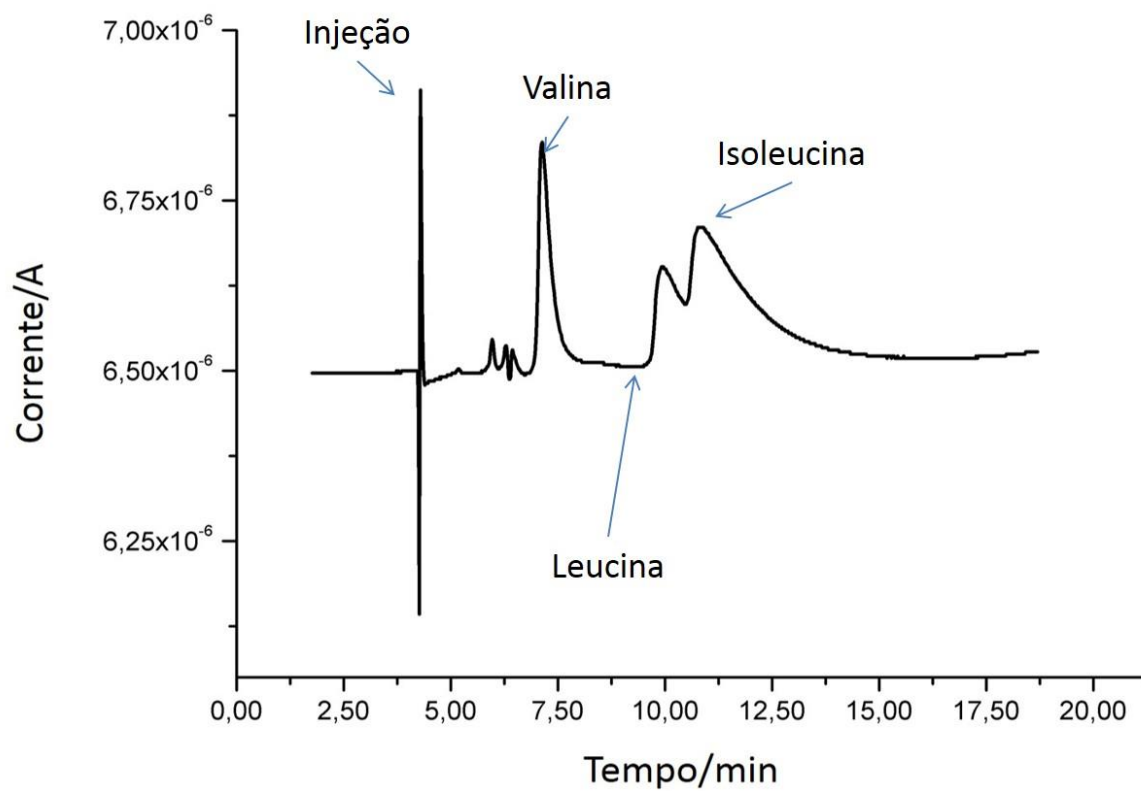


Figura 42 Cromatograma de uma amostra de BCAA. Vazão 1 mL min^{-1} , fase móvel hidróxido de sódio $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ com acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Detecção amperométrica pulsada sobre eletrodo de bronze de 1 mm de diâmetro.

VI. Resultados e discussão SERS

VI.1 Fabricação do substrato

A primeira parte deste trabalho consistiu na preparação da cela para obtenção dos substratos SSV. Para tal, a preparação do substrato pode ser dividida em três partes, a fabricação da cela fina, preparação do molde com nano partículas e finalmente a deposição do metal de interesse.

VI.1.1 Preparação da cela fina.

Primeiramente uma lâmina de microscópio foi coberta como uma camada de cromo de aproximadamente 10 nm, seguida de uma camada de ouro de 200 nm e então foi cortada com um cortador com ponta de diamante em 8 pedaços, sendo a superfície do ouro limpa com solução piranha. Um espaçador, feito de Parafilm®, foi cortado na forma de um trapézio invertido e utilizado para a construção da cela que é coberta com uma lamínula. O esquema está apresentado na Figura 43. O sistema possui 3 camadas, que foram aquecidas, em chapa quente a 60°C, para que ocorresse a promoção da aderência entre elas e assim obter a cela fina.

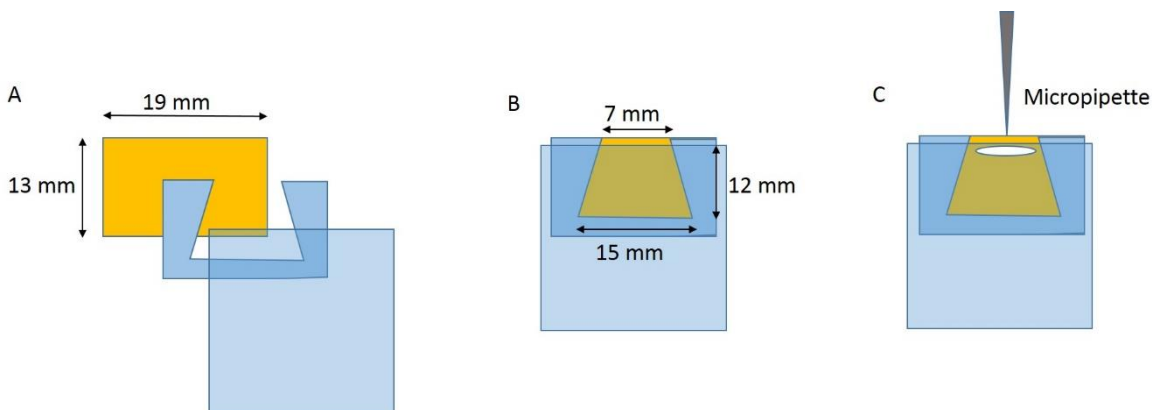


Figura 43 Esquema para preparação da célula para deposição das nanopartículas.

VI. 1.2 – Deposição das nanopartículas.

Com a cela fina preparada, passou-se para o segundo passo que envolve a concentração da solução comercial de nano partículas e a sua deposição sobre a superfície do ouro na cela final. Primeiramente a solução comercial de partículas,

com 700 nm de diâmetro e um coeficiente de variação menor que 2%, com concentração de 1% foi elevada a 1,8%, para que o empacotamento das partículas seja melhor sobre a superfície do ouro. Essa concentração leva a um aumento de partículas por volume de solução, logo quando depositados na cela fina, um empacotamento mais coesivo é obtido. Para realizar a concentração das partículas um simples passo de centrifugação a $628,31 \text{ rad.s}^{-1}$ por 15 minutos foi realizado. Após a formação do precipitado o excesso de solvente é retirado e as partículas são ressuspensas.

Da solução a 1,8% de esferas de 700 nm, $1,0 \times 10^{-6} \text{ mL}$, são cuidadosamente adicionados a cela fina. Entre cada adição o sistema é cuidadosamente agitado para auxiliar o empacotamento das partículas. Por fim o sistema é incubado por 48 horas a 14°C em um ângulo de 20° . Na Figura 44 está representada a imagem final da cela fina com as partículas após a incubação de 48 horas.

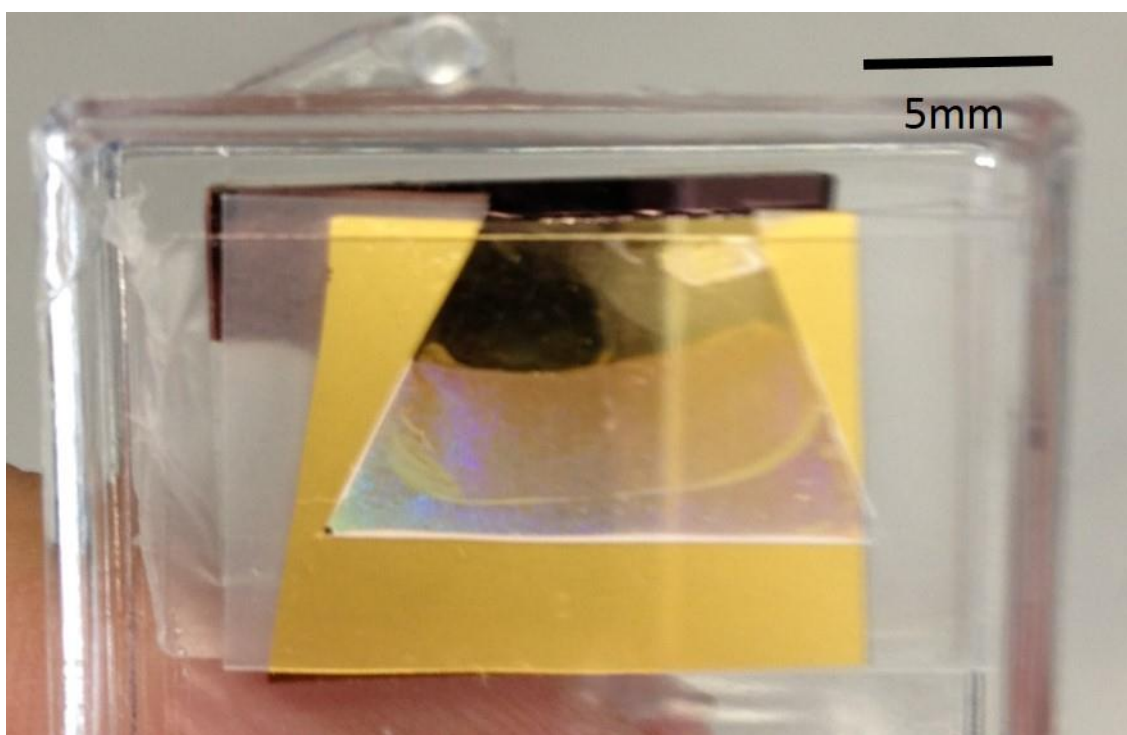


Figura 44 Compartimento fino preparado com o filme de nanopartículas formado.

VI. 1.3 Eletrodeposição do cobre.

O passo final do processo de fabricação do substrato para SERS é a deposição do metal de interesse. Para este procedimento a lamínula que protege o arranjo de nano partículas deve ser removida. Este procedimento foi realizado através do aquecimento para o amolecimento do Parafilm®. Após a fusão do Parafilm® com o auxílio de pinças a lamínula foi removida, expondo assim as nano partículas. O próximo passo consistiu na delimitação da área onde se desejava realizar a eletrodeposição. Isto foi feito simplesmente cobrindo a área onde não se desejava depositar com esmalte a base de poliacrilamida.

Com a área eletroativa definida podemos passar então para a deposição do metal, cuja as condições serão tratadas em detalhes mais à frente. Após a deposição do metal as nano partículas de poliestireno foram dissolvidas, através da imersão do substrato em DMF por 4 horas. Esta etapa pode ser demonstrada através da ilustração na Figura 45.

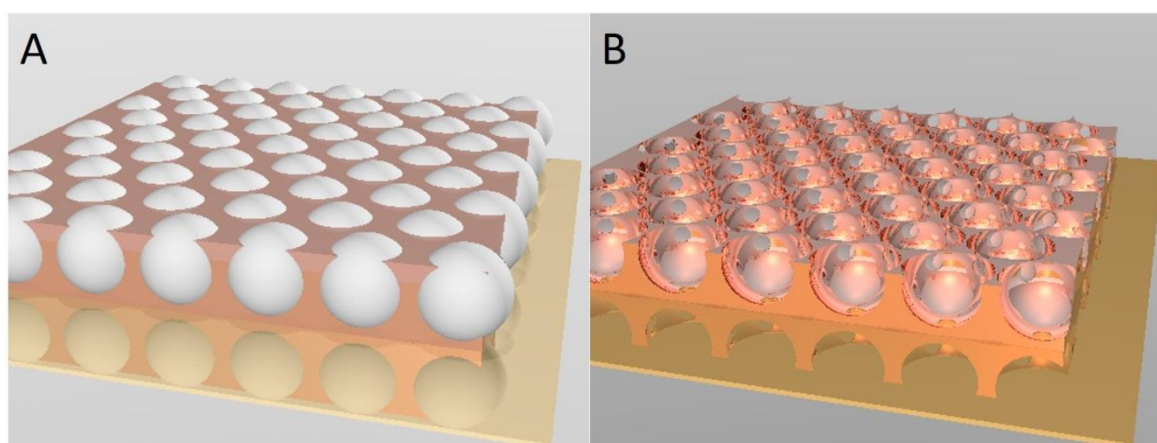


Figura 45 – Ilustração gráfica dos filme após eletrodeposição de cobre (A) e dissolução das nanopartículas (B).

VI. 2 Eletrodeposição de cobre.

A eletrodeposição de cobre será discutida em detalhes nesta parte, pois sua otimização foi crucial para o sucesso do projeto. Pois para a obtenção de bons

espectros de SERS, um substrato brilhante e pouco rugoso tem que ser preparado. Portanto, para atingir estas condições, parâmetros como potencial aplicado na eletrodeposição e banho de eletrodeposição tiveram que ser otimizados.

VI.2.1 Potencial aplicado para eletrodeposição de cobre.

Um fator crucial para o controle da eletrodeposição de cobre é o potencial aplicado. Cobre é um dos metais de mais fácil eletrodeposição com centenas de metodologias possíveis de serem aplicadas para este fim. Contudo para preparar os substratos de forma simples e reprodutível o potencial aplicado na deposição teve que seguir os critérios a serem apresentados. A deposição teria que ser rápida para que uma série de pontos de nucleação fossem gerados, obtendo assim pequenos grãos, porém não rápida demais a ponto da camada ter um crescimento desordenado. Para tanto, o potencial de deposição não poderia ser muito diferente daquele valor obtido para o potencial de circuito aberto (PCA). Contudo, deve-se levar em consideração o tempo total para a eletrodeposição do cobre, tempos muito longos levariam a formação de uma camada espessa de óxido de cobre na superfície do metal depositado. Para este sistema em especial, tendo o substrato com as nano partículas como eletrodo de trabalho, eletrodo de Ag|AgCl em KCl saturado como eletrodo de referência e uma grade de platina como eletrodo auxiliar o potencial de circuito aberto ficou em torno de 0,0 V.

Uma faixa de potenciais foi escolhida, a cada ponto um decréscimo de 50 mV era realizado, sendo o ponto inicial o PCA. A solução escolhida para os primeiros testes foi uma solução de 0,1 mol L⁻¹ de sulfato de cobre penta hidratado. No potencial de -0.05 vs. Ag|AgCl em KCl saturado, não ocorreu deposição em 15 minutos de experimento. Com um segundo decréscimo de potencial de 50 mV a deposição ocorreu, e após 4 minutos já era possível visualmente identificar uma camada de cobre depositada na superfície. Como apresentado na Figura 46, há a figura de microscopia eletrônica de varredura do filme com a estrutura proposta. Contudo há ainda grãos de cobre na superfície o que dificulta que o substrato tenha baixa rugosidade. Isso ocorre devido a deposição ocorrer preferencialmente em

certas áreas do eletrodo. Uma forma de contornar esta questão é a utilização de aditivos no banho para que previnam esta deposição inespecífica de cobre.

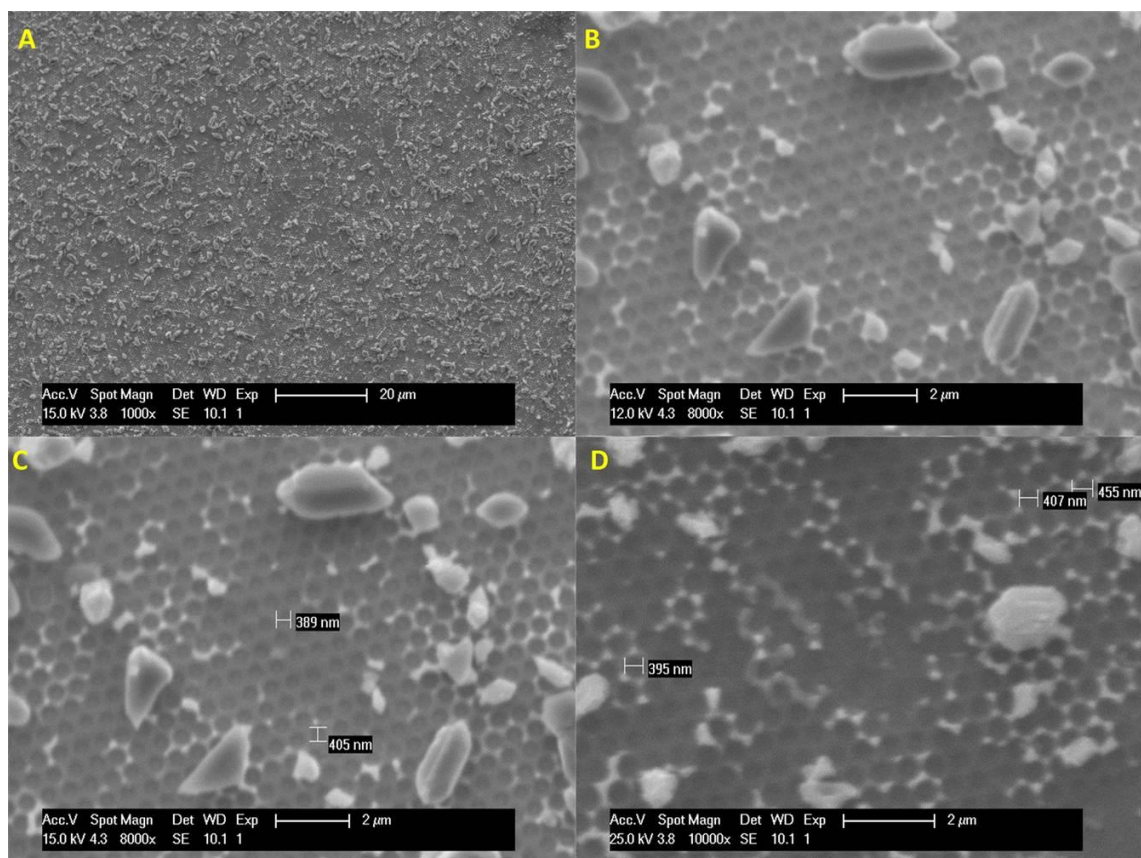


Figura 46 Imagem de microscopia eletrônica de varredura do substrato de cobre após a eletrodeposição a partir da solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de sulfato de cobre. Em A vê-se a imagem com 1000x de aumento, B 8000x, C 8000x com medida do tamanho da cavidade formado e em D 10000x com as medidas de tamanho das cavidades formadas.

VI.2.2 – Solução de eletrodeposição para o cobre.

A solução utilizada para a eletrodeposição de cobre, proposto neste trabalho, consiste no uso de uma solução de sulfato de cobre penta hidratado na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Contudo, devido a qualidade do material obtido, a aplicação de aditivos se fez necessária para melhorar a qualidade do substrato obtido. Como aditivos na solução de eletrodeposição foram utilizados polietileno glicol (PEG) e cloreto de potássio KCl. O PEG tem a propriedade de inibir a deposição de cobre, o que parece ir contra as intenções neste momento do trabalho,

contudo a sua adição controla a deposição e ajuda na obtenção de uma superfície pouco rugosa e brilhante. O cloreto de potássio entra como uma fonte de cloreto que em sinergia com o PEG reduz a taxa de deposição do cobre. Apresentado na Figura 47 e na Figura 48 estão os substratos depositados nestas condições, através das imagens fica claro a melhoria na qualidade dos substratos obtidos.

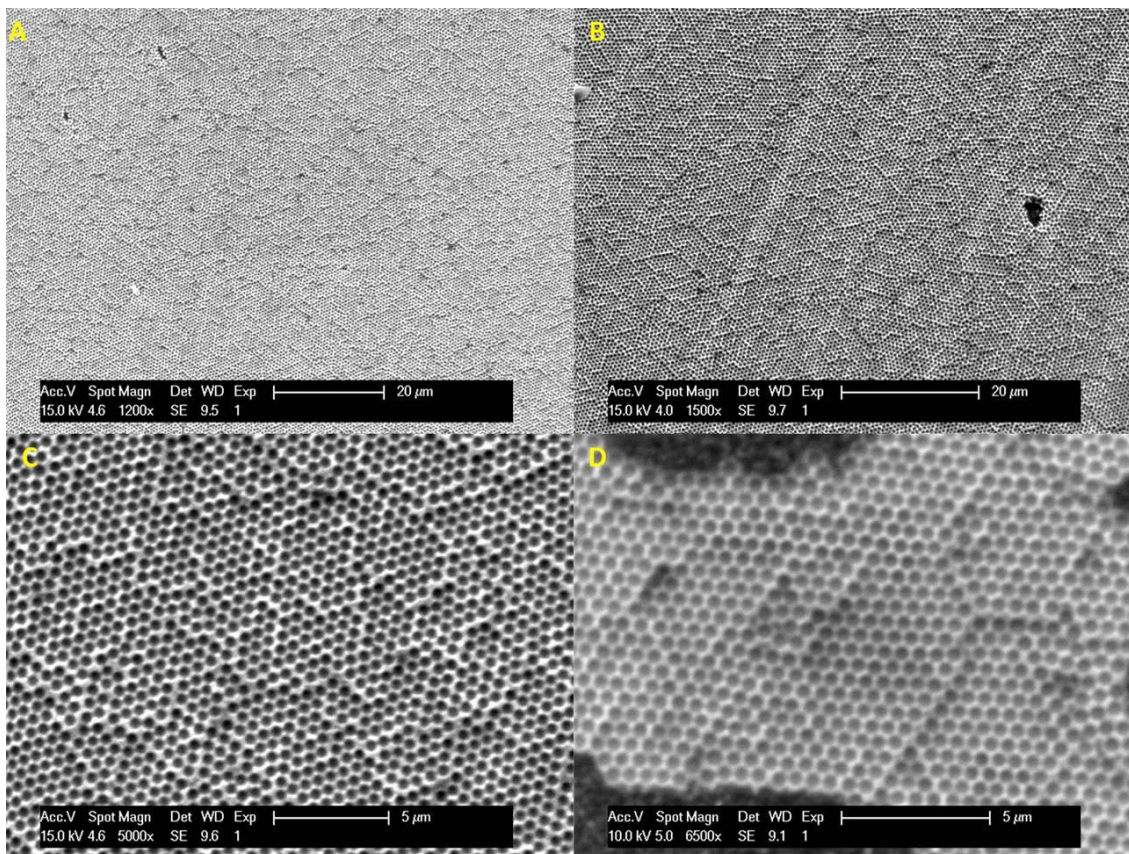


Figura 47 Imagem de microscopia eletrônica de varredura do substrato de cobre após a eletrodeposição a partir da solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de sulfato de cobre com PEG e KCl. Em A vê-se a imagem com 1200x de aumento, B 1500x, C 5000x e em D 6500x.

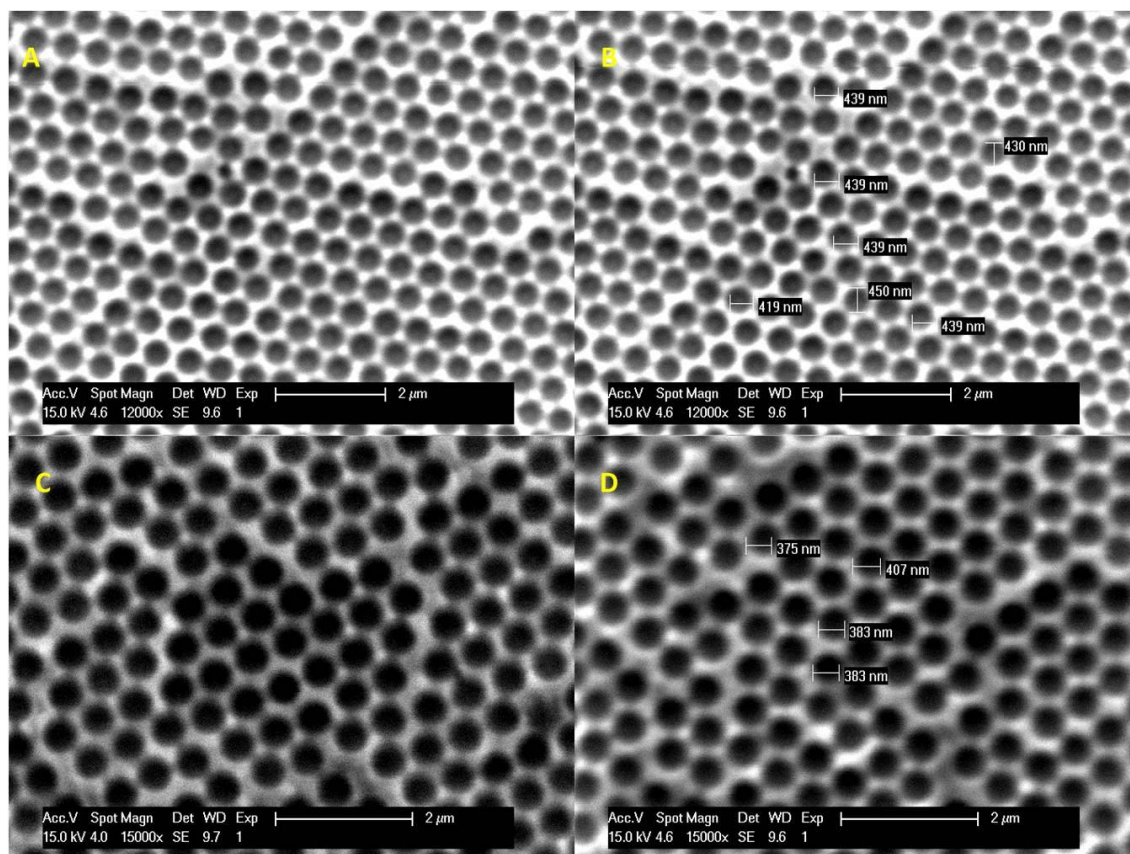


Figura 48 Imagem de microscopia eletrônica de varredura do substrato de cobre após a eletrodeposição a partir da solução de $0,1\text{mol L}^{-1}$ de sulfato de cobre com PEG e KCl. Em A vê-se a imagem com 12000x de aumento, B 12000x com medida de tamanho das cavidades, C 15000x e em D 15000x com medida do tamanho da cavidade.

VI. 3. Caracterização do Substrato

VI.3.1. Profundidade das cavidades e fator de aumento.

Após a obtenção de um substrato SSV de boa qualidade o trabalho continuou no sentido de avaliar a profundidade do poro com a magnitude do sinal de Raman obtido e sua reprodutibilidade. Primeiramente um espectro Raman do substrato foi obtido, como apresentado na Figura 49 Em continuidade ao trabalho, diferentes tempos de deposição foram utilizados para variar o tamanho das cavidades geradas. A partir da metodologia apresentada sete regiões foram obtidas onde o cobre foi depositado sobre as partículas em diferentes alturas. A Figura 50

apresenta o resultado dos espectros obtidos para as sete diferentes regiões utilizando benzenotiol como sonda.

O espectro SERS obtido para cada região demonstra que as diferentes condições do filme obtidos impactam o sinal SERS. Como pode ser observado nas regiões 1, 3 e 6 há um baixo sinal de linha base. Contudo a região 2, obteve-se sinal com melhor relação sinal ruído. Esses resultados estão de acordo com o que é visto nas imagens de microscopia eletrônica. Está apresentado nas Figura 51, Figura 52, Figura 53 e Figura 54 o efeito de aumento no tempo de deposição. Com o aumento do tempo, blocos de cobre acabam sendo depositados na superfície, levando a formação de rugosidades. Mesmo que nestas condições seja possível obter o sinal de SERS, devido a irregularidade da superfície a reprodutibilidade da mesma ficará comprometida. Sendo assim, para a continuidade do estudo a superfície que corresponde a região de número 2 foi escolhida, aquela cuja a deposição de cobre levou 300 segundos.

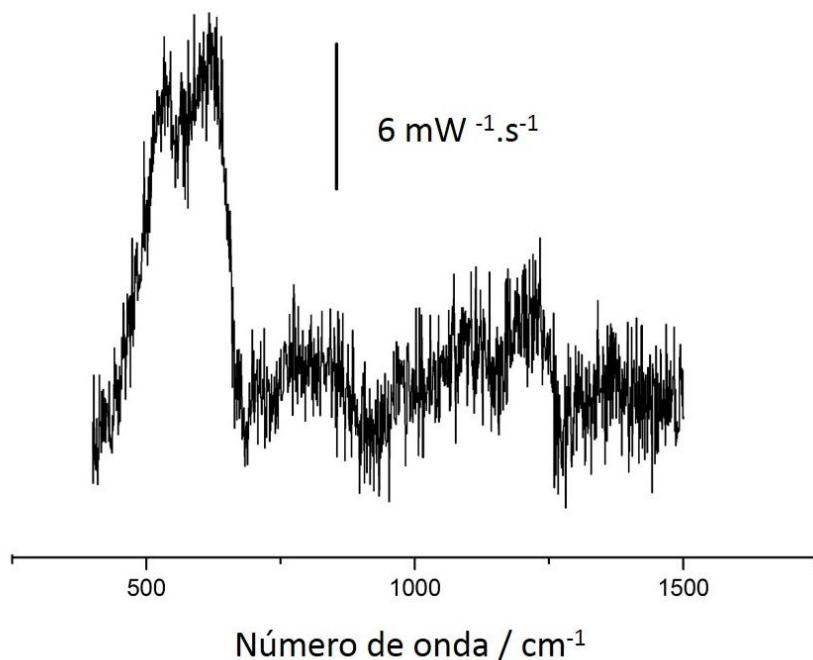


Figura 49 Espectro Raman do substrato de cobre puro. Tempo de aquisição de 10 segundos. Laser de 633 nm com potencial de 3mW.

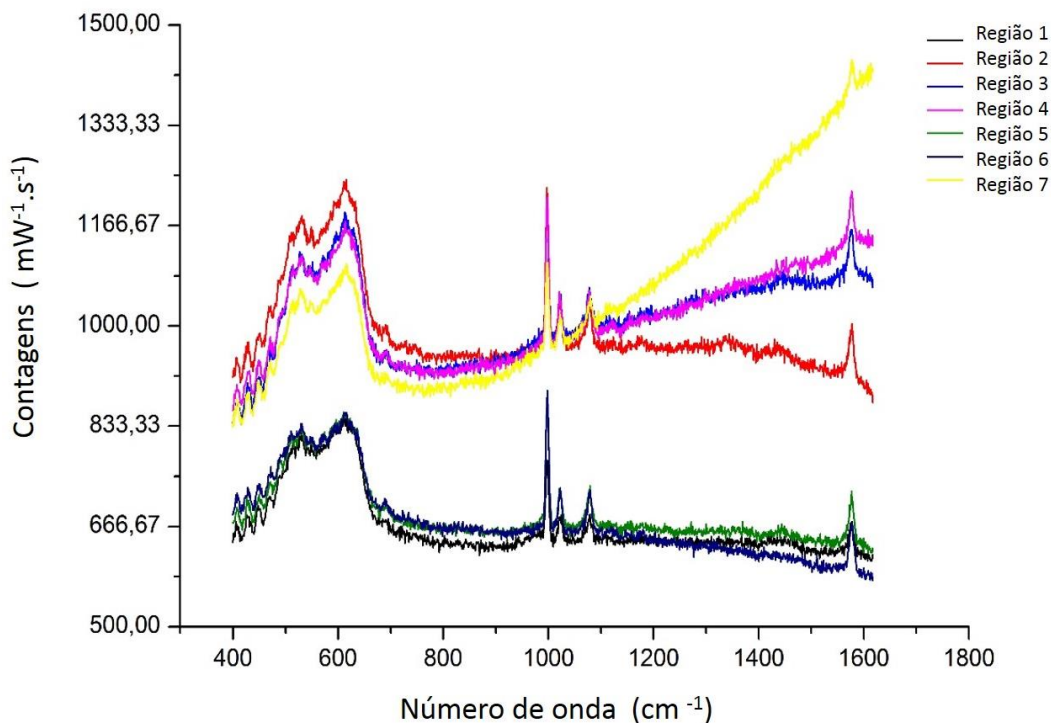


Figura 50 Espectros Raman obtidos para benzenotiol sobre o substrato SSV de cobre. 10 segundos de acumulação com um laser de 633 nm com potência de 10 mW.

Como demonstrado na Figura 50 o sinal de SERS varia conforme a topografia do eletrodo. Portanto a condição otimizada para a obtenção do substrato é a seguinte: Solução de eletrodeposição contendo sulfato de cobre penta hidratado $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 1 mL por litro de PEG e $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de potássio. O potencial de deposição foi de -100 mV vs. Ag|AgCl em KCl saturado. O que sobre as partículas de 700 nm origina um substrato com cavidades com diâmetro aproximado de 450 nm. Este diâmetro foi calculado através das imagens de microscopia eletrônica de varredura e a profundidade obtida foi de aproximadamente 300 nm.

Outro parâmetro interessante a ser abordado é o tamanho da cavidade formada. Como apresentado por Cintra et. al (41), há uma direta relação entre a profundidade da cavidade e o efeito SERS. Com partículas de tamanho diferentes, diferentes cavidades serão geradas. Portanto diferentes períodos de deposição levarão a diferenças no tamanho da cavidade. Como apresentado nas Figura 51 e

Figura 52 o tamanho da cavidade varia pouco em função do tempo de deposição, mas isto está relacionada a deposição preferencial em sítios de nucleação. A consequência desta deposição preferencial é a formação de filmes não uniformes, como apresentado nas Figura 53 e Figura 54.

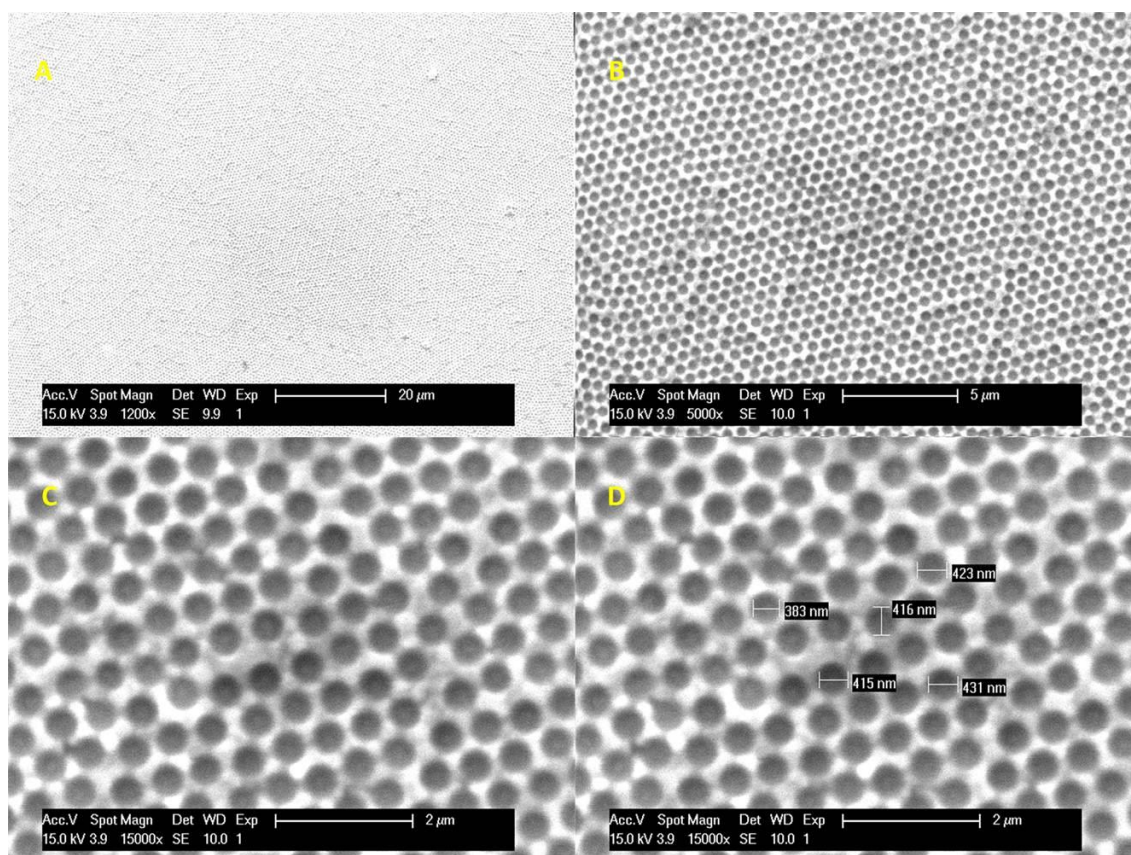


Figura 51 Imagem de microscopia eletrônica de varredura do substrato de cobre após a eletrodeposição a partir da solução de $0,1\text{mol L}^{-1}$ de sulfato de cobre com PEG e KCl. Em A vê-se a imagem com 1200x de aumento, B 1500x, C 5000x e em D 6500x.

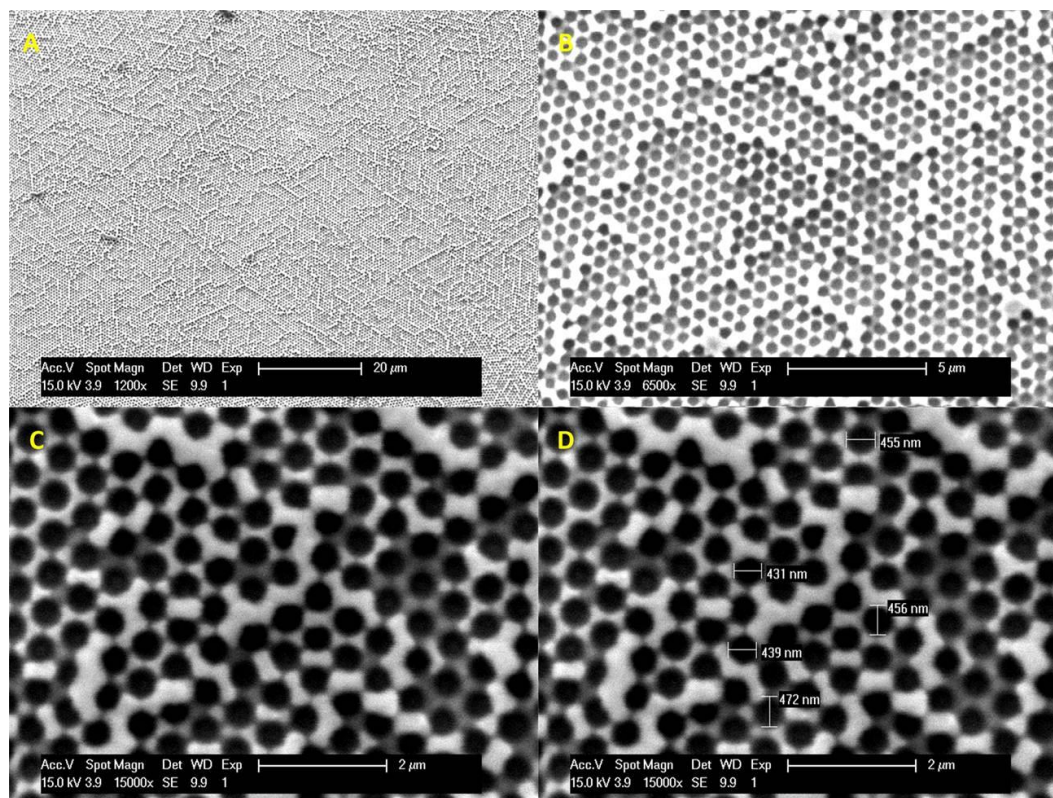


Figura 52 Imagem de microscopia eletrônica de varredura do substrato de cobre, referente a região 3, após a eletrodeposição a partir da solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de sulfato de cobre com PEG e KCl. Em A vê-se a imagem com 1200x de aumento, B 5000x, C 15000x e em 15000x com medida do tamanho das cavidades obtidas.

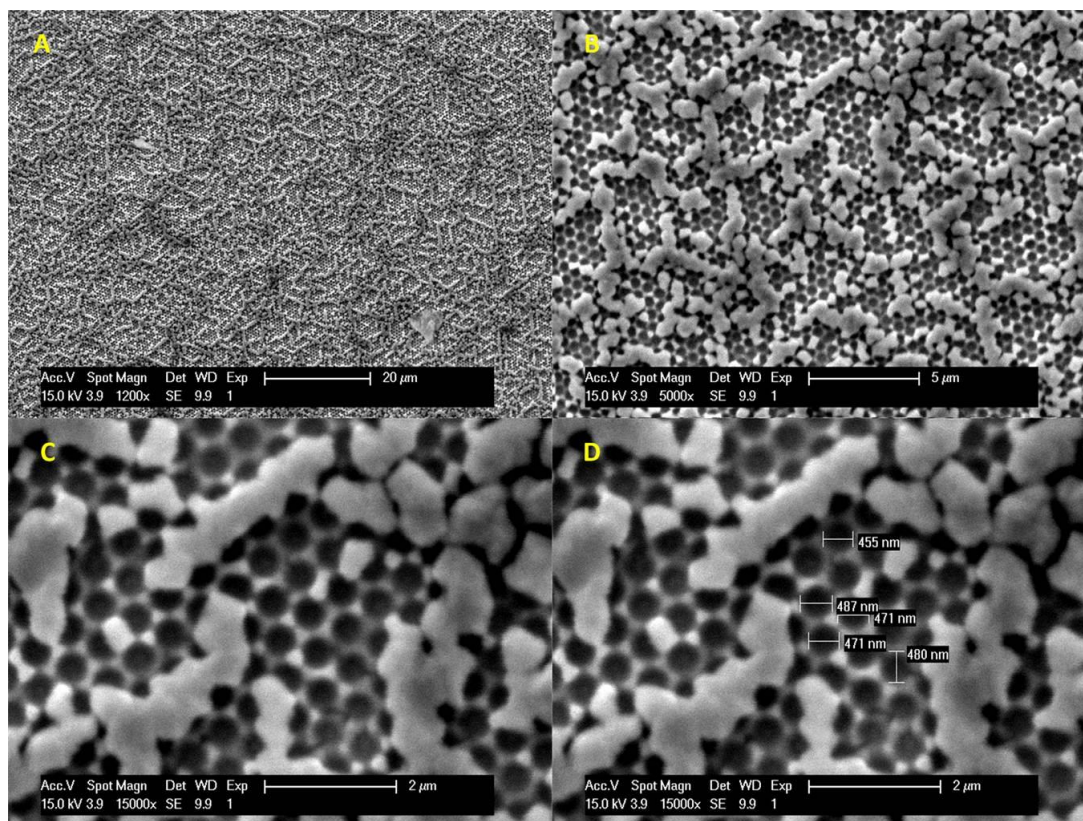


Figura 53 Imagem de microscopia eletrônica de varredura do substrato de cobre, referente a região 5, após a eletrodeposição a partir da solução de $0,1\text{mol L}^{-1}$ de sulfato de cobre com PEG e KCl. Em A vê-se a imagem com 1200x de aumento, B 5000x, C 15000x e em 15000x com medida do tamanho das cavidades obtidas.

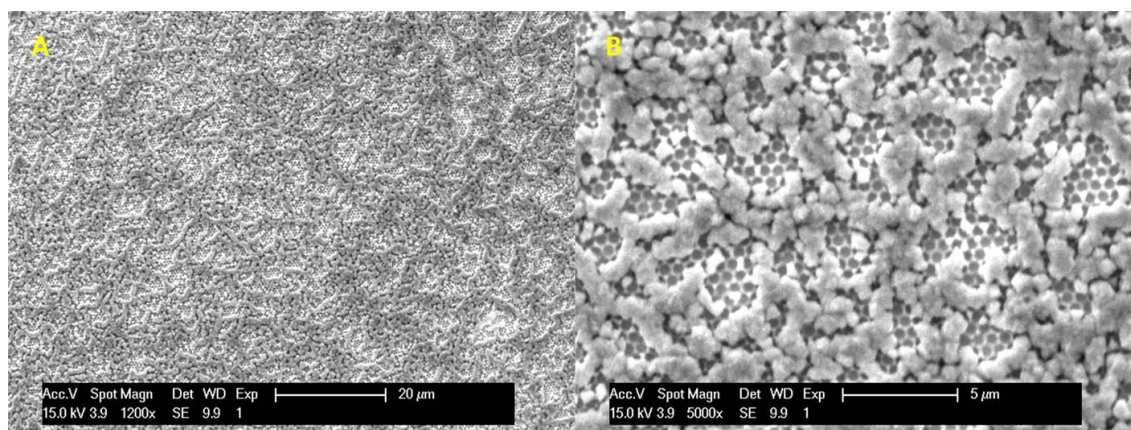


Figura 54 Imagem de microscopia eletrônica de varredura do substrato de cobre, referente a região 7, após a eletrodeposição a partir da solução de $0,1\text{mol L}^{-1}$ de sulfato de cobre com PEG e KCl. Em A vê-se a imagem com 1200x de aumento, B 5000x.

VI.3.2 Avaliação do fator de aumento.

A Figura 55 apresenta a estrutura da molécula de benzenotiol. Esta molécula é uma sonda excelente para a medida de SERS, devido a suas características. Dentre estas características temos o grupo tiol que interage com o metal do substrato de forma muito forte e ajuda a alinhar o anel benzênico perpendicular à superfície. Esta orientação beneficia a medida, já que os modos ressonantes do anel benzênico geram sinais intensos no espectro SERS obtido.

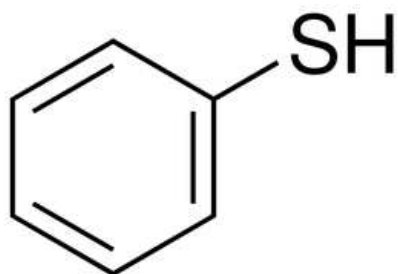


Figura 55 molécula de benzenotiol.

O fator de aumento para o substrato de cobre foi calculado com base no trabalho de Adbelsalam et al. (34) onde o fator obtido para o cobre é 10 vezes menor que aquele obtido para o mesmo tipo de substrato, porém em ouro. Isso se deve ao fato que, mesmo esperado uma intensidade maior do sinal para o cobre (35), a camada de óxido de cobre, por mais fina que seja, interfere nas propriedades ópticas do material.

A atribuição dos picos para o benzenotiol está apresentado na Tabela 3 e seguem o trabalho de Abdelsalam et al. (34). Os picos largos que aparecem na região de 400 cm^{-1} a 600 cm^{-1} , podem ser atribuídos aos sinais dos óxidos de cobre II e seus sub picos como em 616 e 513 cm^{-1} (61).

Tabela 3 Atribuição de picos para o benzenotiol, conforme o trabalho de Abdelsalam et al. (34)

Número de onda/cm ⁻¹	Atribuição
998	a ₁ v(C-C-C)
1022	a ₁ v(C-H)
1079	a ₁ v(C-C-C) e v(C-S)
1579	a ₁ v(C-C-C)

VI. 4 –Medidas SERS de aminoácidos em substratos SSV de cobre.

VI.4.1 Aminoácidos aromáticos.

Para avaliar a possibilidade de aplicação dos substratos SSV para investigação dos aminoácidos, foram testados aminoácidos aromáticos. Estes aminoácidos foram escolhidos, pois as vibrações do anel aromático geram sinais intensos de Raman, facilitando assim a interpretação destes sinais. O primeiro aminoácido avaliado foi o triptofano, o qual a molécula é apresentada na Figura 56. A molécula de triptofano possui um anel aromático o que gera uma grande seção de Raman, ajudando na obtenção de um espectro com picos intensos e claros.

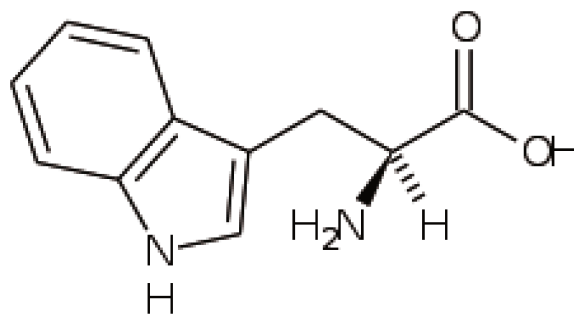


Figura 56 molécula do triptofano.

A primeira condição testada para a obtenção dos espectros dos aminoácidos envolveu a medida em diferentes potenciais. Sendo o perfil de potenciais apresentado na Figura 57. Inicialmente foi escolhido o potencial de circuito aberto. Porém, como apresentado na Figura 58, nenhum sinal foi obtido, além daqueles que correspondem ao óxido de cobre II (61). O potencial então foi deslocado a valores mais positivos promovendo a formação do complexo cobre II aminoácido. Este passo foi realizado com o intuito de observar mudanças no espectro que corresponderiam a formação do complexo. Porém nesta condição nenhum sinal foi obtido. Por fim o potencial foi deslocado a valores negativos, onde a camada de óxido de cobre II seria reduzida. Nesta condição foi possível a obtenção do espectro Raman do aminoácido sobre o substrato SSV de cobre.

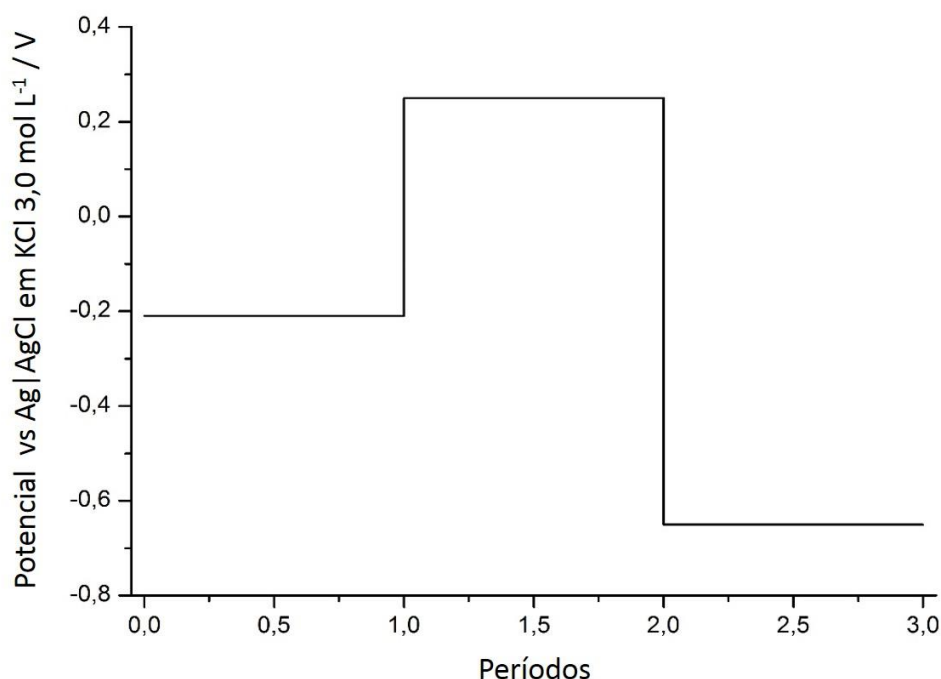


Figura 57 Degraus de potencial usados para a obtenção do espectro do triptofano no substrato SSV de cobre.

O potencial escolhido para permitir que os espectros Raman fossem obtidos foi de -0,65 V vs Ag|AgCl em KCl saturado. Neste potencial o espectro dos aminoácidos foi coletado e foi possível ver o surgimento de picos. Isso significa que

nestas condições é possível ver a interação entre os aminoácidos e o substrato de cobre. Isto pode ser confirmado, visto que o sinal SERS só surge a partir da interação da molécula com a superfície do substrato, pois se o sinal fosse proveniente somente da molécula em solução diferentes modos vibracionais seriam excitados. Além disto, a concentração das moléculas em solução, neste caso $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de triptofano em hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, é muito baixa para obter um sinal proveniente da solução. Portanto, pode-se concluir que é possível obter um sinal da interação dos aminoácidos com cobre, mesmo em baixas concentrações, desde que o experimento seja realizado sob controle potencioestático. Na Tabela 4 está a atribuição de picos para o triptofano.

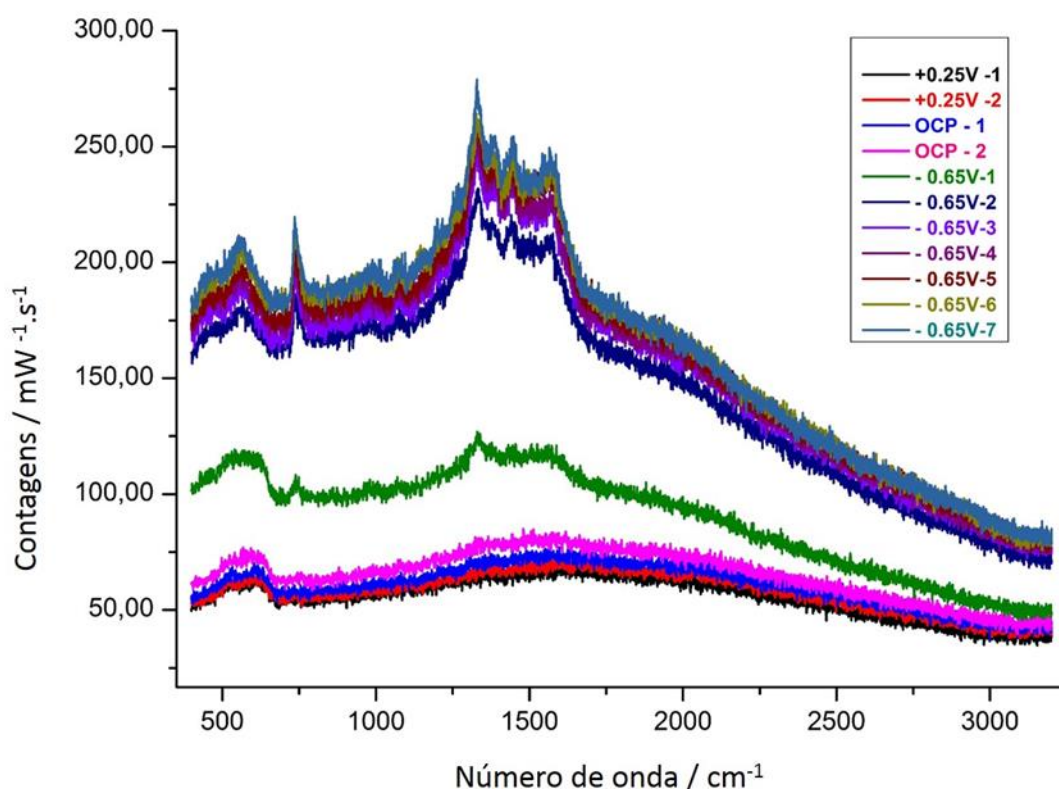


Figura 58 Espectros obtidos para o triptofano em substrato SSV de cobre. Tempo de aquisição de 10 segundos com laser de 633 nm, potencial aplicado no eletrodo é dado no inserto do gráfico com valores expressos em função do eletrodo de referência de Ag|AgCl em KCl saturado. Concentração de triptofano de $7,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 4 Atribuição de picos para ao triptofano.

Número de onda/ cm ⁻¹	Atribuição	Ref. (62) número de onda/ cm ⁻¹
465	$\nu_{R,r}$	462
1071	γNH_3^+ , $\beta\text{H(C)}$	1066
1324	$\beta\text{H(C)}$, ωCH_2	1321
1378	ωCH_2 , βCH	1367
1426	$\nu(r)$ $\nu(R)$	1418
1508	N/A	
1574	$\nu(R)$, $\nu(r)$	1564

VI.4.2 Aminoácidos não aromáticos.

Acima vimos que foi possível obter espectros de SERS de aminoácidos interagindo com o cobre. Neste ponto do trabalho irá demonstrar-se que o sistema proposto também propicia a obtenção de espectros de moléculas com baixas seções de Raman. Nesta etapa foi estudada a obtenção de espectros de serina e glicina, as quais suas estruturas estão apresentadas na Figura 59.

Chegou-se aqui a um ponto chave do trabalho. A glicina é o aminoácido estruturalmente mais simples de todos, o que sugere que as interações entre ela e o cobre serão causadas pela estrutura fundamental dos aminoácidos e não por seus grupos R. Além disto, tem-se que o espectro obtido mostra uma clara amplificação dos poucos modos vibracionais presentes para esta molécula, provando que a técnica é viável para ser aplicada a todos os aminoácidos.

A serina é um aminoácido cuja eletroquímica é muito interessante. Devido a hidroxila no grupo R, ele pode ter um comportamento de oxido redução único. Portanto é de grande interesse entender a interação desta molécula com o eletrodo de cobre.

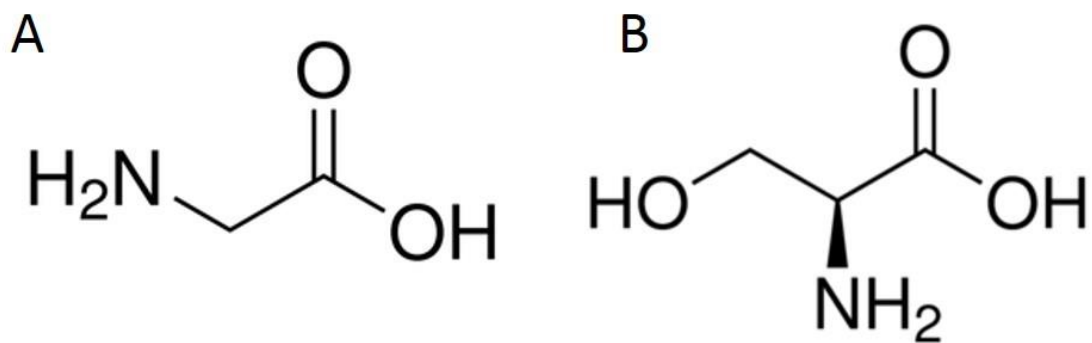


Figura 59 A) glicina B) serina.

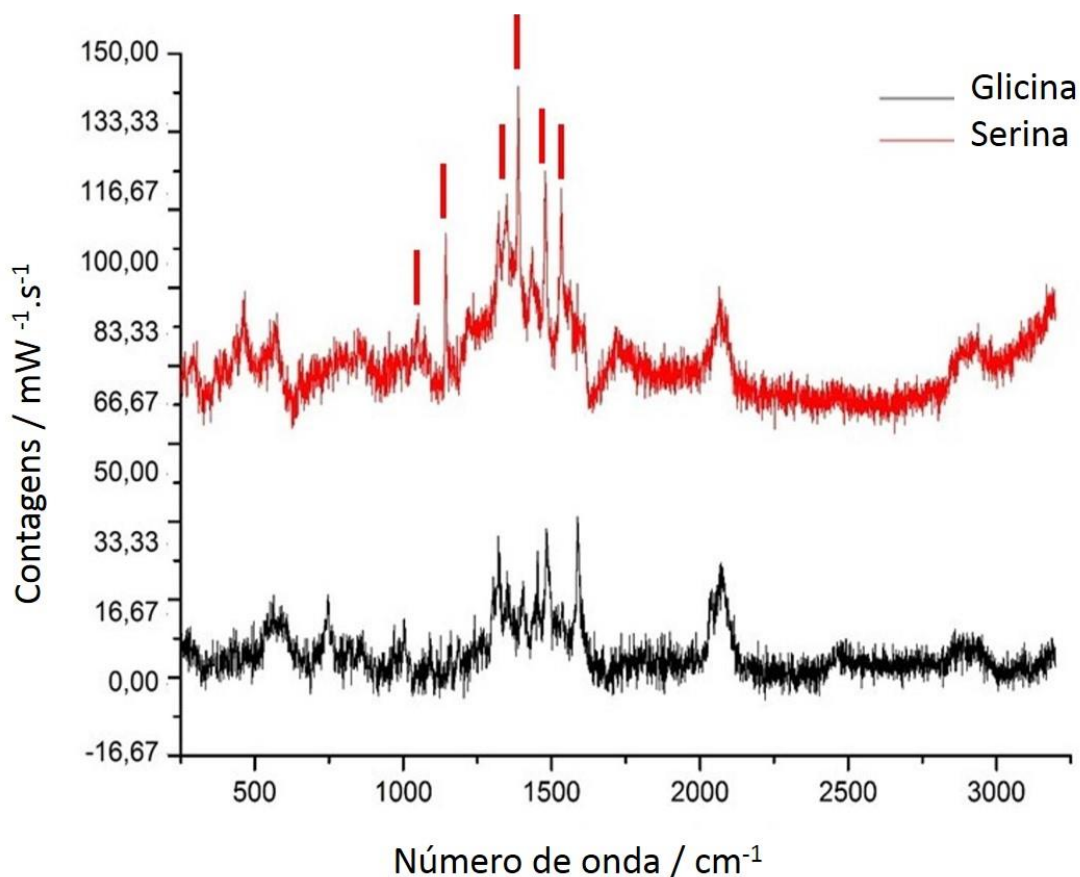


Figura 60 Espectros obtidos para glicina e serina sobre o substrato SSV de cobre. Tempo de aquisição de 10 segundos com laser de 633 nm, potencial aplicado sobre o eletrodo de trabalho de -0,65 V vs Ag|AgCl em KCl saturado. Concentração de glicina $9,8 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ e serina $7,5 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ em hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹.

Como apresentado no trabalho de Zhu et al. (63), algumas modos vibracionais podem ser correlacionados, porém sem atribuições de picos. Contudo cabe chamar a atenção ao pico que aparece na região de 1327 cm^{-1} . Este pico é atribuído no trabalho de Zhu como um marcador da glicina e está presente nos espectros obtidos neste trabalho. Portanto é possível concluir que a glicina interage com o eletrodo de cobre proposto.

Tabela 5 Atribuição de picos para serina.

Número de onda / cm^{-1}	Atribuição	Referência(64) número de onda / cm^{-1}
1145	N/A	
1324	N/A	
1348	$\delta\text{CH} + \delta$ estrutural.	1354
1388	$\delta\text{COH} + \omega\text{CH}_2$ wagg.+ δ estrutural.	1422
1478	ζCH_2	1464
1532	N/A	

Os resultados obtidos com a glicina e a serina foram muito encorajadores, pois se os aminoácidos mais básicos apresentam sinal, este sistema é capaz de responder a todos os aminoácidos. Podendo no futuro ser utilizado para elucidar o mecanismo de interação entre os aminoácidos e o cobre, ponto de grande discussão na literatura.

VII – Conclusões

Os estudos desenvolvidos neste trabalho permitiram que objetivos pretendidos fossem atingidos. Primeiramente, que o estudo de materiais alternativos é de grande interesse para a eletroanalítica. Isso se deve por que há uma série de limitações nos materiais hoje em uso, seja frente ao custo ou a falta especificidade. Nesta busca de novos materiais, muitas vezes questões simples passam despercebidas. No caso deste trabalho, pôde-se demonstrar que a eficiência do uso de eletrodos de ouro para a detecção de aminoácidos é baixa. Isso se deve ao fato que o mecanismo de óxido-redução dos aminoácidos sobre o eletrodo ouro tem ligação direta com o grupo R dos aminoácidos.

No sentido de encontrar uma alternativa que explorasse melhor as propriedades dos aminoácidos partiu-se para a utilização de eletrodos de cobre. O cobre puro mostrou-se um desafio considerável, devido a sua baixa resistência a processos de corrosão nas condições experimentais. Como alternativa adotou-se a utilização deste metal em ligas metálicas. Esta alternativa é de grande interesse ao campo da eletroanalítica, pois mostra uma alternativa ao uso dos metais de forma isolada. O uso das ligas permite o controle das propriedades de interesse dos eletrodos desenvolvidos, com um aumento significativo da resistência a processos corrosivos.

Considera-se como passo determinante para o sucesso na utilização de ligas de cobre na eletroquímica, entender o comportamento das moléculas alvo sobre o eletrodo desenvolvido. O estudo cauteloso dos mecanismos de reações deve ser realizado garantindo a eficiência dos novos materiais frente ao metal puro. Pode-se concluir que esta etapa foi realizada com sucesso no presente trabalho, no qual foi determinado que o mecanismo que rege a óxido-redução dos aminoácidos sobre o eletrodo de bronze é aquele mesmo que rege sobre o eletrodo de cobre.

Outro ponto de destaque neste trabalho, frente a investigação dos mecanismos de reação entre os aminoácidos e o cobre, é o desenvolvimento de um substrato em cobre para a obtenção do sinal Raman com efeito de superfície. Muito

se discute sobre a possibilidade do uso de cobre para estudos de SERS. Porém, este é o primeiro trabalho desenvolvido de forma a planejar um substrato para obter o sinal de SERS de forma reprodutível e com baixo tempo de aquisição e poucas acumulações. Isto demonstra que um bom planejamento do substrato permite a realizações de análises de forma otimizada. O sucesso deste trabalho pode ser medido pela capacidade de observar as interações entre aminoácidos simples como a glicina e a serina com o substrato planejado. Mostrando que um bom planejamento e um estudo cauteloso levam a algo inovador.

Por fim, ao longo deste trabalho muito se discutiu sobre as propriedades das ligas serem benéficas ao sistema. Em particular, no caso da liga de cobre utilizada, comprovadamente houve melhora no desempenho do sistema, tornando-o mais resistente a corrosão. Assim, pode-se concluir que o uso da liga de cobre, além da semelhança em mecanismos, trouxe avanços no quesito aplicabilidade do sistema proposto.

VIII Referências

1. Boyle J. Lehninger principles of biochemistry (4th ed.): Nelson, D., and Cox, M. Biochemistry and Molecular Biology Education. 2005;33(1):74-5.
2. de Carvalho Castro e Silva C, Breitzkreitz MC, Santhiago M, Corrêa CC, Kubota LT. Construction of a new functional platform by grafting poly(4-vinylpyridine) in multi-walled carbon nanotubes for complexing copper ions aiming the amperometric detection of l-cysteine. *Electrochimica Acta*. 2012;71(0):150-8.
3. Luo PF, Zhang FZ, Baldwin RP. Constant potential amperometric detection of underivatized amino-acids and peptides at a copper electrode. *Analytical Chemistry*. 1991;63(17):1702-7.
4. Munier RL, Thommega.C, Sarrazin G. Systematic analytical procedures for mixtures of aminoacids by chromatography and electrophoresis-chromatography on thin-layer cellulose powder. *Bulletin De La Societe Chimique De France*. 1967(10):3971-&.
5. Sentier L, Marchal J, Boudrant J, Germain P. Thin-layer chromatographic method for the simultaneous determination of physiological aromatic-amino-acids. *Journal of Chromatography*. 1991;547(1-2):531-7.
6. Moore S, Stein WH. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins - an improved system. *Journal of Biological Chemistry*. 1951;192(2):663-81.
7. Moore S, Spackman DH, Stein WH. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins - an improved system. *Analytical Chemistry*. 1958;30(7):1185-90.
8. Spackman DH, Stein WH, Moore S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Analytical Chemistry*. 1958;30(7):1190-206.
9. Fung YS, Mo SY. Determination of amino-acids and proteins by dual-electrode detection in a flow system. *Analytical Chemistry*. 1995;67(6):1121-4.
10. Zhou J, Lunte SM. Direct determination of amino-acids by capillary electrophoresis electrochemistry using a copper microelectrode and zwitterionic buffers. *Electrophoresis*. 1995;16(4):498-503.
11. Hamilton PB. Ion exchange chromatography of amino acids - a single column, high resolving, fully automatic procedure. *Analytical Chemistry*. 1963;35(13):2055-&.
12. Fountoulakis M, Lahm HW. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A*. 1998;826(2):109-34.
13. Hanko VP, Rohrer JS. Determination of amino acids in cell culture and fermentation broth media using anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *Analytical Biochemistry*. 2004;324(1):29-38.
14. ; Hitachi Ltd (Hita-C), assignee. Colorimetric determin. of aminoacid cpds. - by Ninhydrin method, using light of fixed wavelength of 400-420 nanometres patent JP80004255-B; JP50156981-A. JP80004255-B 29 Jan 1980 198008 JP50156981-A 18 Dec 1975 198008.
15. Mikkelsen SR, Cortón E. Frontmatter. *Bioanalytical Chemistry*: John Wiley & Sons, Inc.; 2004. p. i-xvii.

16. Yemm EW, Cocking EC. The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst*. 1955;80(948):209-13.
17. Fritz JS, Gjerde DT. Resins and Columns. *Ion Chromatography: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*; 2009. p. 37-68.
18. Fritz JS, Gjerde DT. Detectors. *Ion Chromatography: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*; 2009. p. 69-103.
19. Casella IG, Gatta M, Desimoni E. Applications of a copper-modified gold electrode for amperometric detection of polar aliphatic compounds by anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1998;814(1-2):63-70.
20. Chen C-K, Liu K-T, Chiu T-C, Chang H-T. Separation of amino acids and amines by capillary electrophoresis using poly(ethylene oxide) solution containing cetyltrimethylammonium bromide. *Journal of Chromatography A*. 2009;1216(44):7576-81.
21. Johnson DC, Lacourse WR. Liquid-chromatography with pulsed electrochemical detection at gold and platinum-electrodes. *Analytical Chemistry*. 1990;62(10):A589-A97.
22. Nagy L, Nagy G, Hajos P. Copper electrode based amperometric detector cell for sugar and organic acid measurements. *Sensors and Actuators B-Chemical*. 2001;76(1-3):494-9.
23. Luo PF, Zhang FZ, Baldwin RP. Comparison of metallic electrodes for constant-potential amperometric detection of carbohydrates, amino-acids and related-compounds in flow systems. *Analytica Chimica Acta*. 1991;244(2):169-78.
24. An Improved Gradient Method for the AAA-Direct™ Separation of Amino Acids and Carbohydrates in Complex Sample Matrices. [Internet]. 2006 [cited Maio 2014]. Available from: http://www.dionex.com/en-us/webdocs/40396-AU152_LPN1768-R2.pdf.
25. Hampson NA, Macdonald Ki, Lee JB. Oxidations at copper electrodes .4. Oxidation of alpha-amino acids. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1972;34(1):91-&.
26. Gupta T. Deposition Technologies of Materials for Cu-Interconnects 2009. 223-65 p.
27. Desch CH, Whyte S. The micro-chemistry of corrosion - Part I - Some copper-zinc alloys. *Journal of the Institute of Metals*. 1913;10:304-28.
28. Lee GB. The corrosion of water-jackets of copper blast-furnaces. *Transactions of the American Institute of Mining and Metallurgical Engineers*. 1907;38:877-84.
29. Rhead EL. Notes on some probable causes of the corrosion of copper and brass. *Journal of the Institute of Metals*. 1909;2:73-97.
30. Uthemann. The defence of copper and its alloys against corrosion by seawater. *Zeitschrift Des Vereines Deutscher Ingenieure*. 1905;49:733-6.
31. Chao RS, Khanna RK, Lippincott ER. Theoretical and experimental resonance Raman intensities for the manganate ion. *Journal of Raman Spectroscopy*. 1975;3(2-3):121-31.
32. Fleischmann M, Hendra PJ, McQuillan AJ. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters*. 1974;26(2):163-6.

33. Deckert-Gaudig T, Deckert V. Tip-enhanced Raman scattering studies of histidine on novel silver substrates. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2009;40(10):1446-51.
34. Abdelsalam ME, Bartlett PN, Baumberg JJ, Cintra S, Kelf TA, Russell AE. Electrochemical SERS at a structured gold surface. *Electrochemistry Communications*. 2005;7(7):740-4.
35. Zeman EJ, Schatz GC. An accurate electromagnetic theory study of surface enhancement factors for silver, gold, copper, lithium, sodium, aluminum, gallium, indium, zinc, and cadmium. *The Journal of Physical Chemistry*. 1987;91(3):634-43.
36. Dasary SSR, Singh AK, Senapati D, Yu H, Ray PC. Gold Nanoparticle Based Label-Free SERS Probe for Ultrasensitive and Selective Detection of Trinitrotoluene. *Journal of the American Chemical Society*. 2009;131(38):13806-12.
37. Alvarez-Puebla RA, Agarwal A, Manna P, Khanal BP, Aldeanueva-Potel P, Carbo-Argibay E, et al. Gold nanorods 3D-supercrystals as surface enhanced Raman scattering spectroscopy substrates for the rapid detection of scrambled prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(20):8157-61.
38. Wang Z, Wu H, Wang C, Xu S, Cui Y. Gold aggregates- and quantum dots-embedded nanospheres: Switchable dual-mode image probes for living cells. *Journal of Materials Chemistry*. 2011;21(12):4307-13.
39. Bartlett PN, Baumberg JJ, Coyle S, Abdelsalam ME. Optical properties of nanostructured metal films. *Faraday Discussions*. 2004;125:117-32.
40. Baumberg JJ, Kelf TA, Sugawara Y, Cintra S, Abdelsalam ME, Bartlett PN, et al. Angle-resolved surface-enhanced Raman scattering on metallic nanostructured plasmonic crystals. *Nano Letters*. 2005;5(11):2262-7.
41. Cintra S, Abdelsalam ME, Bartlett PN, Baumberg JJ, Kelf TA, Sugawara Y, et al. Sculpted substrates for SERS. *Faraday Discussions*. 2006;132:191-9.
42. Szyrwił L, Pap JS, Malinka W, Szewczuk Z, Kotynia A, Brasun J. Interactions of anti-Parkinson drug benserazide with Zn(II), Cu(II), Fe(II) ions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013;76:36-43.
43. Warnes SL, Caves V, Keevil CW. Mechanism of copper surface toxicity in *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* involves immediate membrane depolarization followed by slower rate of DNA destruction which differs from that observed for Gram-positive bacteria. *Environmental Microbiology*. 2012;14(7):1730-43.
44. Heli H, Hajjizadeh M, Jabbari A, Moosavi-Movahedi AA. Fine steps of electrocatalytic oxidation and sensitive detection of some amino acids on copper nanoparticles. *Analytical Biochemistry*. 2009;388(1):81-90.
45. Liu Y, Xu L. Electrochemical sensor for tryptophan determination based on copper-cobalt hexacyanoferrate film modified graphite electrode. *Sensors*. 2007;7(10):2446-57.
46. Razmi H, Nasiri H, Mohammad-Rezaei R. Amperometric determination of L-tyrosine by an enzymeless sensor based on a carbon ceramic electrode modified with copper oxide nanoparticles. *Microchimica Acta*. 2011;173(1-2):59-64.
47. Conato C, Contino A, Maccarrone G, Magri A, Remelli M, Tabbi G. Copper(II) complexes with L-lysine and L-ornithine: is the side-chain involved in the

- coordination? A thermodynamic and spectroscopic study. *Thermochimica Acta*. 2000;362(1-2):13-23.
48. Cuevas A, Viera I, Torre MH, Kremer E, Baran EJ. Solubility and lipophilicity tests of copper (II) complexes of the essential aminoacids. *Afinidad*. 1998;55(475):183-5.
 49. Ilavarasi R, Rao MNS, Udupa MR. Synthesis and characterization of copper(II) complexes of adenine and aminoacids. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Chemical Sciences*. 1997;109(2):79-87.
 50. Rosu T, Negoiu M, Carcu V. Mixed-ligand complexes. Ternary copper(II) complexes with aminoacids. *Revue Roumaine De Chimie*. 2006;51(5):391-6.
 51. Brown GM, Hope GA. SERS Study of the adsorption of gelatin at a copper electrode in sulfuric-acid solution. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1995;397(1-2):293-300.
 52. Guo-Liang C, Heng L, Jiang-Hong L, Li W, Jian-Zhang Z, Zhong-Hua L. SERS and EQCM studies on the effect of allyl thiourea on copper dissolution and deposition in aqueous sulfuric acid. *Journal of Applied Electrochemistry*. 2009;38(11):1501-8.
 53. Martusevicius S, Niaura G, Talaikyte Z, Razumas V. Adsorption of L-histidine on copper surface as evidenced by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*. 1996;10(2):271-80.
 54. Mahajan S, Cole RM, Soares BF, Pelfrey SH, Russell AE, Baumberg JJ, et al. Relating SERS Intensity to Specific Plasmon Modes on Sphere Segment Void Surfaces. *Journal of Physical Chemistry C*. 2009;113(21):9284-9.
 55. Abdelsalam M, Bartlett PN, Russell AE, Baumberg JJ, Calvo EJ, Tognalli NG, et al. Quantitative electrochemical SERS of flavin at a structured silver surface. *Langmuir*. 2008;24(13):7018-23.
 56. Abdelsalam ME, Mahajan S, Bartlett PN, Baumberg JJ, Russell AE. SERS at structured palladium and platinum surfaces. *Journal of the American Chemical Society*. 2007;129(23):7399-406.
 57. 2012. Available from: <http://www.shockmetals.com.br/espec/cqui/bronze>
 58. Zen JM, Hsu CT, Kumar AS, Lyuu HJ, Lin KY. Amino acid analysis using disposable copper nanoparticle plated electrodes. *Analyst*. 2004;129(9):841-5.
 59. Skoog DAW, Donald M.; Hollar, James F.; Crouch, Stanley R. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Eighth edition: Brooks/Cole; 2004. 1124 p.
 60. Torto N, Ruzgas T, Gorton L. Electrochemical oxidation of mono- and disaccharides at fresh as well as oxidized copper electrodes in alkaline media. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1999;464(2):252-8.
 61. Gan ZH, Yu GQ, Tay BK, Tan CM, Zhao ZW, Fu YQ. Preparation and characterization of copper oxide thin films deposited by filtered cathodic vacuum arc. *Journal of Physics D-Applied Physics*. 2004;37(1):81-5.
 62. Chuang C-H, Chen Y-T. Raman scattering of L-tryptophan enhanced by surface plasmon of silver nanoparticles: vibrational assignment and structural determination. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2009;40(2):150-6.
 63. Zhu G, Zhu X, Fan Q, Wan X. Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2011;78(3):1187-95.
 64. Quesada-Moreno MM, Aviles-Moreno JR, Marquez-Garcia AA, Partal-Urena F, Gonzalez JJL. L-Serine in aqueous solutions at different pH: Conformational

preferences and vibrational spectra of cationic, anionic and zwitterionic species.
Journal of Molecular Structure. 2013;1046:136-46.

IX - Perspectivas Futuras

As perspectivas futuras deste trabalho podem ser direcionadas a aplicação deste material em sistemas de fluxo. Para tal, alguns parâmetros ainda devem ser determinados, tais como a sensibilidade individual de cada aminoácido. Aliado ao desenvolvimento de uma nova célula de fluxo para o cromatógrafo a fim de aprimorar a sensibilidade do sistema. O projeto contaria com as condições de operação do sistema em particular, sendo assim possível se beneficiar da aplicação das ligas de cobre. Outro ponto de destaque, viria da aplicação do substrato para SERS, desenvolvido para estudar de forma mais profunda a interação entre aminoácidos e cobre, bem como entre cobre e outras moléculas de interesse. As informações provenientes da interação entre a molécula e o cobre, obtida com o uso da espectroeletroquímica, poderiam trazer direcionamentos de para onde seguir com o desenvolvimento.