



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP

INSTITUTO DE QUÍMICA – IQ

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR BIOMIMÉTICO  
EMPREGANDO MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS DE  
TIÓIS SOBRE ELETRODOS DE OURO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

RAFAELA FERNANDA CARVALHAL

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Co-orientador: Prof. Dr. Renato Sanches Freire

**CAMPINAS  
JULHO / 2005**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA  
UNICAMP**

C253d      Carvalho, Rafaela Fernanda.  
Desenvolvimento de sensor biomimético empregando monocamadas auto-organizadas de tióis sobre eletrodos de ouro / Rafaela Fernanda Carvalho. -- Campinas, SP: [s.n], 2005.

Orientador: Lauro Tatsuo Kubota.

Dissertação – Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Química.

1. Monocamadas auto-organizadas. 2. Ácido ascórbico.  
3. Eletrodos de ouro. 4. Pré-tratamento de superfícies. I.  
Kubota, Lauro Tatsuo. II. Instituto de Química. III. Título.

**Título em inglês:** Biomimetic sensor development applying thiol self-assembled monolayer on polycrystalline gold electrodes

**Palavras-chaves em inglês:** Self-assembled monolayer, Ascorbic acid, Surface pretreatment, Gold electrodes

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Mestre em Química na área de Química Analítica

**Banca examinadora:** Zeki Naal, Lauro Tatsuo Kubota, Edvaldo Sabadini, Renato Sanches Freire (co-orientador)

**Data de defesa:** 29/07/2005

*Aos meus pais Maria Ely e Éldio, irmãos Ricardo e Renan e avós Ziláh e Maria por estarem ao meu lado em todos os momentos...*

*Ao meu Marcos, pelo carinho, amor e compreensão...*

*... dedico.*

---

## AGRADECIMENTOS

- ✓ Ao Prof. Dr. Lauro T. Kubota, pela confiança, dedicação e estímulo, que com profissionalismo e amizade ensinou-me a enfrentar os desafios e a procurar soluções inteligentes para a realização deste trabalho;
- ✓ Ao Prof. Renato S. Freire, pela co-orientação desta dissertação, apoio, otimismo e confiança dispensados mesmo antes de me conhecer;
- ✓ Aos amigos, Possari, César, Jequié, Corintiano, Altair, Adriano, Paulo, Sérgio, Bárbara, Borete, Gilppis, Reinaldo, Pink, Jez, Alaécio e Virgulino que foram companheiros solidários e pacientes nessa fase de aprendizado e estudo;
- ✓ À Renata Kelly Mendes, grande amiga e pesquisadora, pelo carisma que tornava o ambiente de trabalho mais alegre e prazeroso;
- ✓ A todos os funcionários do Instituto de Química que colaboraram em muito para a realização deste trabalho;
- ✓ À FAPESP pelo apoio financeiro;

Muito obrigada.

---

## Rafaela Fernanda Carvalho

---

### 1. Formação Acadêmica

---

#### Graduação

Química; habilitações: Bacharelado e Tecnológica  
Universidade Estadual de Londrina - UEL, 1999-2003

---

### 2. Produção científica

---

#### 2.1. Iniciação científica

Comparação de Métodos na Determinação de Nitrato do Tecido Vegetal, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, 110488/01-6, Instituto Agrônomo do Paraná, Mario Miyazawa, 03/2001 a 02/2002.

Desenvolvimento de Sistema Digestor para Tecido Vegetal em Forno de Microondas, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, 110488/01-6, Instituto Agrônomo do Paraná, Mario Miyazawa, 03/2002 a 02/2003.

#### 2.2. Resumo do trabalho científico apresentado em congresso

Emprego do complexo  $[(\text{phen})_2\text{Cu}-\text{OH}-\text{Cu}(\text{phen})_2](\text{ClO}_4)_3$  como catalisador biomimético à *tirosinase* no desenvolvimento de um sensor, CARVALHAL, R. F., Possari, R., Freire, R. S., Kubota, 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas. Anais da reunião anual da SBQ, 2005.

Eletrodos de ouro policristalino: estudo comparativo de técnicas de pré-tratamento de superfície para limpeza de eletrodos, CARVALHAL, R. F., Freire, R. S., Kubota, L. T., 27ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Salvador. Anais da 27ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004.

Redução dessortiva de monocamadas auto-organizadas de tióis em eletrodos de ouro policristalino, CARVALHAL, R. F., Freire, R. S., Kubota, L. T., XIV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2004, Teresópolis. Anais do XIV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2004. (Apresentação oral, 10 min)

Modelagem do comportamento voltamétrico de um eletrodo de ouro quimicamente modificado com MPA e Cloreto de dipiridil cobre(II), Braga, J. W. B. B., CARVALHAL, R. F., Poppi, R. J., Bruns, R. E., Freire, R. S., Kubota, L. T., 3ª Escola de Verão em Químiometria na PUC-Rio, 2004, Rio de Janeiro. CD da 3ª Escola de Verão em Químiometria na PUC-Rio, 2004.

Sensor biomimético para ácido ascórbico preparado com SAM de MPA e complexo de cobre(II) sobre eletrodo de ouro policristalino, CARVALHAL, R. F., Sotomayor, M. D. P. T., Kubota, L. T., Freire, R. S. XII Encontro de Química da Região Sul, 2004, Guarapuava. Anais do XII Encontro de Química da Região Sul, 2004.

Digestão de Tecidos Vegetais em Forno de Microondas Doméstico, CARVALHAL, R. F., Miyazawa, M., Pavan, M. A., 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2003, Poços de Caldas. Anais da reunião anual da SBQ, 2003.

Desenvolvimento de sistema digestor para tecido vegetal em forno de microondas, CARVALHAL, R. F., Miyazawa, M., Pavan, M. A., X Seminário do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC, 2001, Londrina. Anais do X Seminário do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC. (Apresentação oral, 15 min.)

Comparação de métodos na determinação de nitrato do tecido vegetal, CARVALHAL, R. F., Miyazawa, M., Pavan, M. A., IX Seminário do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC, 2001, Londrina. Anais do IX Seminário do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC. (Apresentação oral, 15 min.)

Semimicro digestão de amostras de tecido vegetal em forno de microondas doméstico, Grassi, V., CARVALHAL, R. F., Miyazawa, M., Pavan, M. A. 11<sup>o</sup> Encontro Nacional de Química Analítica, 2001, Campinas. Anais do 11<sup>o</sup> Encontro Nacional de Química Analítica.

Comparação de redutores na determinação de nitrato do tecido vegetal, CARVALHAL, R. F., Miyazawa, M., Pavan, M. A., XXVIII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 2001, Londrina. Anais do XXVIII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo.

Comparação de métodos na determinação de nitrato do tecido vegetal, CARVALHAL, R. F., Miyazawa, M., Pavan, M. A., IX Encontro de Química da Região Sul, 2001, Londrina. Anais do IX Encontro de Química da Região Sul.

Teor de nitrato nas folhas de alface produzidas em diferentes métodos de cultivo, CARVALHAL, R. F., Miyazawa, M., Pavan, M. A., IX Encontro de Química da Região Sul, 2001, Londrina. Anais do IX Encontro de Química da Região Sul.

Preparo de amostras para determinação de metais pesados disponíveis do solo, Miyazawa, M., CARVALHAL, R. F., Oliveira, E. L., Pavan, M. A., 23<sup>a</sup> Reunião Brasileira de Manejo e Conservação do Solo e de Água, 2000, Ilhéus. Anais da 23<sup>a</sup> Reunião Brasileira de Manejo e Conservação do Solo e de Água.

### 2.3. Publicação

#### 2.3.1. Artigo no prelo

CARVALHAL, R. F., Freire, R. S., Kubota, L. T., Polycrystalline gold electrodes: A comparative study of surface pretreatment procedures used for cleaning and thiol self-assembled monolayer formation, *Electroanalysis*, 17 (2005) 1251.

#### 2.3.2. Artigos submetidos

CARVALHAL, R. F., Possari, R., Kubota, L. T., Kinetic of adsorption/re-organization of self-assembled monolayers on polycrystalline gold evaluated by electrochemical reductive desorption, *Electrochemistry Communications*.

CARVALHAL, R. F., Possari, R., Kubota, L. T., Electrochemical detection of cysteine in a flow system based on reductive desorption of thiols from gold, *Analytica Chimica Acta*.

Mendes, R. K., CARVALHAL, R. F., Kubota, L. T., A comparative electrochemical and SPR studies of different thiols self-assembled monolayers on gold, *Electrochimica Acta*.

## 3. Atividades Administrativas

---

Representante Discente da Pós- Graduação no Conselho do Departamento de Química Analítica – IQ/UNICAMP (Mandatos de 2004 a 2005).

## RESUMO

### “DESENVOLVIMENTO DE SENSOR BIOMIMÉTICO PARA ÁCIDO ÁSCÓRBICO EMPREGANDO MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS DE TIÓIS SOBRE ELETRODOS DE OURO”

**Autor: Rafaela Fernanda Carvalhal**

**Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota**

**Co-orientador: Prof. Dr. Renato Sanches Freire**

**Palavras chave: SAM, MPA, nanotecnologia, cobre, vitamina C.**

Esta dissertação descreve o estudo e uso de sistemas auto-organizados como elemento base na modificação de eletrodos de ouro policristalino para a construção de um sensor biomimético. Realizou-se uma comparação e avaliação dos procedimentos mais comuns utilizados no pré-tratamento de superfícies de ouro, com o escopo de verificar o efeito das condições de pré-tratamento eletródico na formação da SAM que seria utilizada como agente imobilizador das espécies biomiméticas no desenvolvimento do sensor. A estratégia que leva a formação de SAM de tióis com recobrimento satisfatório sobre eletrodos de ouro policristalino é aquela que proporciona uma superfície limpa, com baixa rugosidade e menor quantidade de óxidos e foi obtida a partir da seguinte estratégia: polimento mecânico manual, seguido do tratamento químico com solução piranha ácida (10 min. de imersão), em seguida o eletrodo foi polido eletroquimicamente e, por fim, foi imerso em álcool etílico por 30 min. Foi construído um sensor biomimético a ascorbato oxidase, para a determinação de vitamina C em comprimidos, a partir da modificação de um eletrodo de ouro policristalino com uma SAM de ácido 3-mercaptopropiônico, sobre a qual foi feita a imobilização de ligantes etilenodiamina com posterior complexação de cobre pelos ligantes. O sensor apresentou um limite de resposta linear entre 1,0 e 20,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com um limite de detecção de 0,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e um tempo de resposta de 0,5 s. Apresentou tempo de vida útil de até 3 dias depois de iniciado o seu uso, sendo possível cerca de 40 determinações sem decréscimo significativo na resposta do sensor. Foram analisadas amostras de fármacos; os resultados obtidos foram estatisticamente iguais ao nível de 95 %, quando comparados com o método de titulométrico convencional com iodo.

---

## ABSTRACT

### “ASCORBIC ACID BIOMIMETIC SENSOR DEVELOPMENT EMPLOYING THIOL SELF-ASSEMBLED MONOLAYERS ON POLYCRYSTALLINE GOLD ELECTRODES”

**Author: Rafaela Fernanda Carvalhal**

**Supervisor: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota**

**Co-supervisor: Prof. Dr. Renato Sanches Freire**

**Keywords: SAM, MPA, nanotechnology, copper and vitamin C.**

This work describes the study and the application of modified gold electrodes with self-assembled systems to the construction of a biomimetic sensor. It was realized a comparison and an evaluation of the most used pretreatment procedures employed to prepare the gold electrode surface in order to establish which pretreatment procedure is more suited to generate a well packed self-assembled monolayer (SAM) that will be used to anchor biomimetic species to sensor development. The strategy that leads to the formation of a thiol SAM with great surface coverage upon polycrystalline gold surfaces is the one that promotes a clean surface without gold oxides and with low roughness. It was achieved by the following protocol: a mechanical polishing, followed by an oxidant treatment with “Piranha” solution for 10 min. After that the electrode was electrochemically polished by scanning the potential between gold redox potentials, and at the end, the electrode were immersed in ethanol for 30 minutes. It was built up a sensor that imitates the catalytic mechanism of ascorbate oxidase to the oxidation of ascorbic acid. It was formed by a gold electrode modified with a SAM of 3-mercaptopropionic acid in which was immobilized ethylenediamine ligands, whose had complexed copper ions. The sensor had shown a linear response range between  $1.0 \text{ e } 20.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , with a detection limit of  $0.1 \mu\text{mol L}^{-1}$  and a response time of 0.5 s. The sensor presented a storage time of approximately 3 days after its use had been initiated, and it was possible to perform 40 determinations without any considerable loss of the signal. It was performed the analysis of vitamin C in pharmaceuticals formulations with the developed sensor and the results were compared to the iodometric titrimetry and the results from the two methods were not significantly different (judged by t-test at 95 % of confident level).

---

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xvi
ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xvii
APRESENTAÇÃO.....	xix
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO .....	01
<b>I.1 Modificação de superfícies com monocamadas auto-organizadas de tióis, 2;</b> I.1.1 Interação adsorvente-substrato, 3; I.1.2 O substrato e a caracterização da superfície modificada com SAM, 5; I.1.3 A adsorção de tióis sobre substratos metálicos, 7; I.1.4 Preparação de substratos metálicos para a adsorção de SAM; 8; I.1.5 Cinética de adsorção de tióis sobre ouro; 10; I.1.5 Redução dessortiva de SAM de tióis, 11; I.1.6 Aplicação de superfícies modificadas com SAM, 12; <b>I.2 Superfícies quimicamente modificadas e a eletroanalítica, 13; I.3 Mimetização de sistemas biológicos, 14;</b> I.3.1 Sensores biomiméticos, 19; <b>I.4 Objetivos, 19.</b>	
CAPÍTULO II – PRÉ-TRATAMENTO DE ELETRODOS DE OURO POLICRISTALINO PARA A FORMAÇÃO DE SAM DE TIÓIS.....	21
<b>II.1 Resumo, 22; II.2 Introdução, 22; II.3 Metodologia experimental 23;</b> II.3.1 Equipamentos e reagentes 23; II.3.2 Procedimentos de pré-tratamento mecânico, químico e eletroquímico dos eletrodos, 24; II.3.3 Determinação da área eletroquímica superficial (ESA) de eletrodos de ouro, 24; II.3.4 Formação e remoção da SAM sobre a superfície eletródica, 24; II.3.5 Eletroquímica de sondas redox sob eletrodos de ouro, 26; <b>II.4 Resultados e Discussão, 26;</b> II.4.1 Área eletroquímica superficial em função do pré-tratamento eletródico, 26; II.4.2 Comportamento voltamétrico do hexacianoferrato (II/III) e sulfato de ferro amoniacal (II/III) sobre superfícies de ouro, 30; II.4.3 Efeito do pré-tratamento eletródico na formação de monocamadas auto-organizada de tióis, 31; <b>II.5 Conclusão, 38.</b>	

---

CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR PREPARADO COM SAM DE MPA E COMPLEXO DE COBRE (II) COMO CATALISADOR BIOMIMETICO À **ASCORBATO OXIDASE** PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCORBICO EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS.....40

**III.1 Resumo, 41; III. 2 Introdução, 41; III. 3 Metodologia experimental, 44;** III.3.1 Reagentes e preparo de soluções, 44; III.3.1.1 Soluções Tampão, 44; III.3.1.2 Solução de MPA, 44; III.3.1.3 Solução de Ácido Ascórbico, 45; III.3.1.4 Solução de EDC, 45; III.3.1.5 Solução de Sulfato de Cobre, 45; III.3.1.6 Solução de Ligante Etilenodiamina, 45; III.3.1.7 Solução Piranha ácida, 46; III.3.2 Equipamentos, 46; III.3.3 Procedimento Experimental, 47; III.3.3.1 Pré-tratamento do Eletrodo de Ouro Policristalino, 47; III.3.4 Construção do Sensor Biomimético, 47; III.3.4.1 Formação da SAM de MPA sobre o Ouro, 47; III.3.4.2 Imobilização do ligante Etilenodiamina sobre a SAM de MPA, 47; III.3.4.3 Complexação de íons cobre, 48; III.3.4.4 Acondicionamento do Sensor Construído, 48; III.3.4.5 Otimização das Concentrações das Soluções utilizadas na construção do sensor, 48; III.3.4.6 Otimização do pH das Soluções utilizadas na Construção do sensor, 49; III.3.5 Caracterização Eletroquímica do Sensor em Desenvolvimento,49; III.3.5.1 Dessorção Redutiva da SAM de MPA como forma de caracterização do sensor, 49; III.3.5.2 Avaliação do Potencial Formal do Sensor proposto e de Diferentes EQMs, 49; III.3.5.3 Efeito do Eletrólito de suporte, 50; III.3.5.4 Efeito do pH da Solução, 50; III.3.5.5 Efeito da Concentração de Eletrólito, 50III.3.5.6 Efeito Catalítico, 50; III.3.5.7 Curva Analítica para Ácido Ascórbico, 51; III.3.5.8 Método da titulação iodométrica, 51; III.3.5.9 Teste de efeito catalítico da superfície biomimética sobre solução de ácido ascórbico, 51; **III.4 Resultados e Discussão, 52; III.5 Conclusão, 69.**

CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES GERAIS.....70

CAPÍTULO V – PERSPECTIVAS FUTURAS.....72

CAPÍTULO VI – BIBLIOGRAFIA.....77

---

## INDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Diagrama esquemático de uma monocamada ideal de alcanotiol formada sobre uma superfície de ouro. Os elementos que compõem a SAM estão em destaque.

**Figura 2.** ESA de eletrodos de ouro policristalino após a aplicação de diferentes pré-tratamentos. Procedimentos indicados na Figura. M, limpeza mecânica, C, limpeza química e E, representa a limpeza eletroquímica. O RDS é indicado sobre as barras ( $n = 3$ ). Figura inserida: voltamograma de um eletrodo de trabalho após o tratamento M com pico de redução em destaque. Fosfato de sódio,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7.0,  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

**Figura 3.** Voltamogramas cíclicos de eletrodos de ouro policristalino que receberam pré-tratamento mecânico (M) e eletrodos que receberam pré-tratamento mecânico e químico (M+C) em meio ácido. Os voltamogramas se referem ao primeiro ciclo voltamétrico e foram realizados em  $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ,  $50 \text{ mVs}^{-1}$ , em solução saturada com  $\text{N}_2$ .

**Figura 4.** Voltamogramas cíclicos de eletrodos de ouro policristalino em  $1,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2$  em solução  $0,01 \text{ molL}^{-1}$  de  $\text{HClO}_4$ ,  $50 \text{ mVs}^{-1}$  após diferentes procedimentos de pré-tratamento de superfície.

**Figura 5.** Voltamogramas cíclicos de eletrodos de ouro policristalino limpos ou revestidos com MPA que receberam pré-tratamento M ou M+C+E. Condições experimentais: solução  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  em  $0,1 \text{ KCl mol L}^{-1}$  pH 8,  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

**Figura 6.** Voltamograma cíclico de um eletrodo policristalino modificado com SAM de MPA em solução de  $\text{KOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $20 \text{ mV s}^{-1}$ . A SAM foi formada a partir de uma solução etanólica de MPA a  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , sobre eletrodo de ouro que foi pré-tratado com M+C+E seguido de imersão em etanol por 30 min.

**Figura 7.** Voltamogramas de pulso diferencial de eletrodos de ouro modificados com SAM de MPA em solução de  $\text{KOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $20 \text{ mVs}^{-1}$ , amplitude de pulso de  $25 \text{ mV}$ .

O tempo de formação da SAM: 2 horas, em solução contendo  $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de MPA. Legenda: MPA (solvente da solução utilizada na formação da SAM)/Au (pré-tratamento).

**Figura 8.** Vista esquemática da estrutura do sítio ativo da ascorbato oxidase [33].

**Figura 9.** Esquema de célula de três eletrodos utilizada nas medidas eletroquímicas. a = entrada de ar; b = saída de ar; c = eletrodo de referência – ECS (1); d = eletrodo de trabalho (2); e= adição de soluções com micropipeta; f= eletrodo auxiliar – espiral de platina (3).

**Figura 10.** Representação esquemática das etapas de construção do sensor biomimético proposto: (a) Formação da SAM; (b) Ativação dos grupos carboxílicos da SAM; (c) Reação com Etilenodiamina que resulta na formação de uma ligação amida; (d) Reação de complexação de íons cobre pelos ligantes imobilizados sobre a SAM. Os grupos  $R_1$  e  $R_2$  representam um radical etila e o grupo  $-[(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_3)_2]\text{HCl}^-$ , respectivamente.

**Figura 11.** Dessorção redutiva de monocamadas de MPA que passaram por modificações químicas (ou não) durante as etapas de construção do sensor em estudo. Foi realizada uma varredura de potencial sobre o eletrodo de ouro limpo para efeito de comparação. Voltamogramas cíclicos realizados em solução de KOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

**Figura 12.** Gráficos cúbicos das respostas  $\Delta E_p$ ,  $I_{pa}$ ,  $I_{pa}/I_{pc}$  e  $(I_a^{2a} - I_a^{10a})$  para o planejamento fatorial  $2^3$ . A Figura (c) indica a posição dos fatores.

**Figura 13.** Gráficos das respostas  $\Delta E_p$ ,  $I_{pa}$ ,  $I_{pa}/I_{pc}$  e  $(I_a^{2a} - I_a^{10a})$  para o planejamento fatorial  $2^2$ .

**Figura 14.** Voltamograma cíclico do perfil do EQM estudado nas condições otimizadas. Tampão Pipes  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

**Figura 15.** Voltamograma cíclico do perfil do EQM estudado em diferentes velocidades de varredura. Tampão PIPES  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.

**Figura 16.** Gráfico da Corrente de pico anódica e catódica versus a velocidade de varredura, Condições experimentais: Tampão Pipes  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . Figura inserida: gráfico de  $I_{pa}$  e  $I_{pc}$  em função da raiz da velocidade de varredura, Tampão PIPES  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.

**Figura 17.** Resposta do EQM em estudo em relação ao pH da solução. Tampão PIPES  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . O sinal da corrente anódica está em módulo com a finalidade de facilitar a compreensão.

**Figura 18.** Influência do pH da solução no potencial formal ( $E^{\circ}$ ) para o EQM em estudo. Condições experimentais idênticas às da Figura 14.

**Figura 19.** Resposta relativa do EQM estudado em diferentes eletrólitos de suporte. Concentração do eletrólito de suporte  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

**Figura 20.** Estabilidade do EQM construído em diferentes eletrólitos de suporte em função do número de ciclos voltamétricos. Medidas realizadas a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ , concentração do eletrólito de suporte  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.

**Figura 21.** Resposta do EQM em estudo em relação à concentração de eletrólito. Tampão PIPES, pH 7,0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

**Figura 22.** Voltamogramas cíclicos obtidos sobre eletrodo de ouro policristalino a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ , em tampão PIPES  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7: e após adição de  $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  a) eletrodo quimicamente modificado com SAM de MPA, etilenodiamina e cobre (II). b) eletrodo limpo.

**Figura 23.** Gráfico Eletroquímico de Lineweaver-Burk para o sensor biomimético desenvolvido. O gráfico foi baseado na resposta de corrente correspondente à variação

---

de concentração de ácido ascórbico adicionado em solução tampão PIPES 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 até a completa saturação do eletrodo.

**Figura 24.** Curva analítica para ácido ascórbico obtida por amperometria com o sensor biomimético desenvolvido. Tampão PIPES, pH 7,0 a 10 mV s<sup>-1</sup>. E<sub>app</sub>: 205 mV.

---

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1.** Dados do planejamento fatorial A.

**Tabela 2.** Dados do planejamento fatorial B.

**Tabela 3.** Valores de  $E^0$  para diferentes complexos formados na superfície de eletrodos de ouro policristalino. Medidas Voltamétricas realizadas em tampão PIPES  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

**Tabela 4.** Valores de resposta de  $\Delta E_p$ ,  $I_{pa}$ ,  $I_{pa}/I_{pc}$  e  $(I_a^{2a} - I_a^{10a})$  para o planejamento fatorial  $2^3$ . Condições: tampão PIPES  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

**Tabela 5.** Valores de resposta de  $\Delta E_p$ ,  $I_{pa}$ ,  $I_{pa}/I_{pc}$  e  $(I_a^{2a} - I_a^{10a})$  para o planejamento fatorial  $2^2$ . Condições: tampão PIPES  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

**Tabela 6.** Resultados obtidos na análise de amostras farmacêuticas de vitamina C com o sensor biomimético desenvolvido.

## ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\Delta E_p$	variação de potencial de pico anódico e catódico
$\Gamma_{3MPA}$	Superfície recoberta pela monocamada auto-organizada de 3MPA
3MPA	ácido 3-mercaptopropiônico, do inglês 3-mercaptopropionic acid
AsA	ácido ascórbico, do inglês ascorbic acid
Bpy*	2,2'-dipiridil, do inglês 2,2'-bipyridine
CG	Cromatografia a gás, do inglês gas chromatography
CV*	Voltametria cíclica, do inglês cyclic voltammetry
DIEN	dietilenotriamina, do inglês diethylenetriamine
DPV*	Voltametria de pulso diferencial, do inglês differential pulse voltammetry
$E_{app}$	Potencial aplicado
ECS	eletrodo de calomelano saturado
EDC*	(1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida)
En	$NH_2(CH_2)_2NH_2$ , ligante etilenodiamina
EQM	eletrodo quimicamente modificado
ESA*	Área eletroquímica superficial, do inglês electrochemical surface área.
HEPES*	ácido n-[2-hidroxietil]piperazina-n-'2-etanosulfônico, do inglês, (n-[2-hydroxyethyl] piperazine-n-'2-ethanesulfonic acid]
HPLC*	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês high-performance liquid chromatography
$I_{pa}$	corrente de pico anódico
$I_{pc}$	corrente de pico catódico
IUPAC*	União internacional de química pura e aplicada, do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
m	coeficiente angular da regressão linear de uma curva de calibração
min.	minuto
MM	massa molar
MX	1,3 dialdeído benzeno, do inglês 1,3 benzene dialdehyde or isophthalaldehyde
NHS*	N-hidroxi succinimida, do inglês N-hydroxyssuccinimide
PA	para análise
Phen*	1,10-fenantrolina, do inglês 1,10 phenanthroline
PIPES *	ácido piperazina -1,4bis(2-etanosulfônico), do inglês, piperazine 1,4bis(2-ethanesulfonic acid]
$Q_{Au/\alpha\text{ oxide}}$	Carga relacionada à redução de óxidos de ouro presentes na superfície eletródica

---

Q <sup>Std</sup>	Carga de referencia relacionada a redução de oxigênio sobre ouro policristalino
R	coeficiente de correlação
RSD*	Desvio padrão relativo, do inglês relative standard deviation
s	sinal do ruído
SAM*	monocamada auto-organizada, do inglês self assembled monolayer
TRIS*	tris(hidroxi metil) amino metano, do inglês, tris(hydroxymethyl)aminomethane

\*As siglas de tradição internacional foram mantidas em inglês.

---

## APRESENTAÇÃO

O desenvolvimento deste trabalho deu-se pela necessidade de investigar as potencialidades da utilização de sistemas auto-organizados, a partir de uma estratégia biomimética, na construção de uma ferramenta analítica com características vantajosas em relação àquelas existentes objetivando-se a determinação de compostos de interesse farmacológico.

Este trabalho foi dividido em capítulos para melhor exposição, discussão e compreensão dos conteúdos pelo leitor. No primeiro capítulo, encontra-se uma introdução a respeito de monocamadas auto-organizadas de tióis, biomimetização e sensores biomiméticos.

No segundo capítulo, será descrito o estudo das condições de pré-tratamento da superfície áurea eletródica para a formação de monocamadas auto-organizadas de tióis. Este estudo mostrou-se essencial à obtenção de controle e repetibilidade durante a construção do sensor e para os estudos relacionados a quimiosorção de compostos tiolados sobre ouro. Reservando-se o terceiro capítulo ao desenvolvimento de um sensor biomimético à enzima ascorbato oxidase para a determinação de vitamina C em amostras de fármacos. Os últimos capítulos trazem uma conclusão geral e as perspectivas do trabalho.

# **CAPÍTULO I**

---

## **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

## **I.1 Modificação de superfícies com monocamadas auto-organizadas de tióis**

As interações entre moléculas e superfícies são alguns dos aspectos mais empolgantes e mais bem estudados da ciência de superfícies. A magnitude destas interações depende da natureza química da ligação, variando desde as mais fracas como, por exemplo, a existente entre alcanotióis adsorvidos sobre ouro até interações muito fortes, capazes de quebras de ligações moleculares, bem como a existente entre etileno e platina [1].

Uma das interações mais marcantes consiste na auto-organização espontânea de átomos ou moléculas em arranjos ordenados sobre superfícies. O conceito de moléculas organizadas com alto grau de ordenamento sobre determinados substratos não é novo, contudo, no contexto da química de superfícies, o tema tem chamado a atenção, principalmente, nos últimos vinte anos, no que tange ao estudo e à aplicação tecnológica de monocamadas moleculares auto-organizadas sobre superfícies metálicas. No entanto, ainda hoje são realizados desde estudos relacionados à investigação da organização fundamental e a química envolvida nestes sistemas, até trabalhos que examinam a robustez e a aplicabilidade destes na modificação das propriedades físicas e químicas de superfícies.

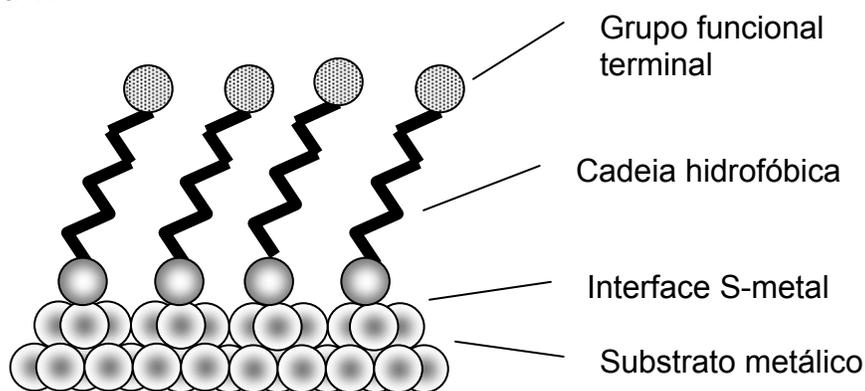
Monocamadas auto-organizadas (SAM, do inglês self-assembled monolayers) são ordenamentos orgânicos formados por meio da adsorção dos seus constituintes moleculares dispersos, inicialmente, em solução líquida ou fase gasosa sobre superfícies de sólidos, arranjos regulares de sólidos ou líquidos (no caso de mercúrio ou outro metal líquido ou liga). Os adsorbatos se organizam espontaneamente e, às vezes, epitaxialmente (segundo o arranjo cristalino do substrato), em estruturas cristalinas ou semi-cristalinas [2]. No entanto, o grau de organização depende da natureza da interação química entre átomos do substrato e do adsorbato, bem como do tipo e força da interação intermolecular entre as moléculas do adsorbato. A estabilidade da monocamada formada é diretamente proporcional à intensidade destas forças de ligação e interação.

### I.1.1 A interação adsorvente-substrato

Sistemas quimioadsorvidos incluem a auto-organização de trialquil, tricloro, ou trialcoxilanos em superfícies de dióxido de silício [3-5], ácidos carboxílicos adsorvidos sobre superfícies de prata e óxidos de alumínio [6-7] e n-alcanotióis quimioadsorvidos em superfícies de ouro [8-11], para mencionar alguns poucos exemplos. As SAM são classificadas de acordo com o mecanismo utilizado na sua fixação sobre o substrato e existem basicamente três técnicas de fixação. A silanização [12-14], a técnica de Langmuir-Blodget [15-16] e a adsorção irreversível de moléculas anfóteras funcionalizadas sobre superfícies metálicas ordenadas.

Particularmente, as SAM mais bem estudadas são aquelas formadas sobre metais de transição, como ouro, prata, cobre, paládio e mercúrio, a partir de moléculas que tenham um grupo cabeça rico em elétrons, como S, O e N e, comumente, grupos de cadeias alquílicas. Nestes casos, a afinidade entre a superfície e o grupo cabeça, é forte o suficiente para formar tanto ligações covalentes quanto iônicas que, em geral, possuem magnitude maior que  $41,8 \text{ kJ mol}^{-1}$  e também interações laterais entre moléculas adjacentes onde as energias envolvidas são consideradas  $< 41,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ , devido a forças de van der Waals que são suficientes para manter o arranjo da SAM [1]. O conjunto destas interações confere à monocamada uma estabilidade muito maior que unidades individualmente adsorvidas.

Um esquema de uma SAM de n-alcanotióis sobre uma superfície de ouro é mostrada na Figura 1.



**Figura 1.** Diagrama esquemático de uma monocamada ideal de alcanotiol formada sobre uma superfície de ouro. Os elementos que compõe a SAM estão em destaque.

---

A área seccional ocupada por uma cadeia alquílica é de  $18,4 \text{ \AA}^2$  e é ligeiramente menor que a área ocupada pelo grupo tiol adsorvido sobre a superfície de Au(111) que é de  $21,7 \text{ \AA}^2$  [17]. Então, as cadeias alquílicas devem, necessariamente, se dispor inclinadas em um determinado ângulo para obter o empacotamento ótimo, como é ilustrado na Figura 1. Se, por exemplo, os grupos metilênicos de um n-alcanotiol forem substituídos por grupos  $-\text{CF}_2$ , a área requerida por estas cadeias aumenta para  $27 \text{ \AA}^2$  e, neste caso, o empacotamento será mais influenciado pela disposição das cadeias do que pelo espaço ocupado pelo grupo adsorvido no substrato. Haverá menor inclinação das cadeias e menor ocasião para desordens relacionadas a disparidades no ângulo de inclinação, gerando uma SAM mais impenetrável [17].

Considerando que a variação no contato eletrônico entre o adsorbato e o substrato metálico controla, principalmente, a força das interações no interior do filme fino, a manipulação estrutural dos monômeros formadores da SAM afetará a capacidade intrínseca de auto-ordenamento e também a condutividade eletrônica do filme. Contudo, o grupo funcional terminal de uma SAM é também responsável por parte das propriedades macroscópicas exibidas pelo filme, como caráter hidrofóbico/hidrofílico, propriedades adesivas, reatividade e capacidade de realizar reações com grupos funcionais expostos (grupos carboxílicos, quinonas, aminas, anidridos). A mudança dos grupos expostos à interface filme/ar é crítica para a determinação e designação das forças de interações das moléculas proximais ou espécies químicas de interesse, no caso, de aplicações tecnológicas das SAM. Estes grupos funcionais terminais podem ser modificados após a monocamada ser disposta sobre determinada superfície e a incorporação de outros grupos como cromóforos, grupos eletroativos ou outras moléculas possibilita estudos nas áreas de desenvolvimento de sensores, transferência eletrônica, reconhecimento molecular, adesão de células ou adsorção de polímeros e outros. Alcanotióis com grupos terminais sensíveis à variação de pH como  $-\text{COOH}$  e  $-\text{NH}_2$  permitem o controle da densidade de carga da superfície da SAM conforme o pH da solução onde são imersas. Estas superfícies carregadas têm sido usadas para a imobilização eletrostática de enzimas em biossensores [18-19] e como modelos de estudo de equilíbrio ácido-base em superfícies [20].

Inicialmente, os estudos se concentraram na investigação das propriedades de impedimento das monocamadas de tióis. Verificou-se que mesmo monocamadas de alcanotióis são eletroativas [21-22], no entanto, atualmente credita-se a derivatização (grupos funcionais ou subunidades adicionadas à estrutura do monômero organosulfurado) a possibilidade de conferir mais propriedades além daquelas de impedimento. Estas subunidades podem causar determinado impedimento estérico e diminuição das forças intermoleculares de van der Waals e, conseqüentemente, quebra do empacotamento organizado das moléculas sobre a superfície metálica. A composição dos componentes moleculares de uma SAM determina a composição atômica perpendicular à superfície, portanto, a possibilidade de arquitetar e conceber o desenho molecular da superfície com controle posicional, confere as SAM grande interesse tecnológico, já que, a presença de moléculas quimicamente ligadas à superfície em estudo, confere propriedades físicas e químicas diferenciadas daquelas exibidas pela interface do substrato bruto. A estabilidade de monocamadas auto-organizadas (SAM) formadas sobre eletrodos sólidos está intimamente relacionada com a intensidade das interações intermoleculares entre os monômeros da camada, portanto, SAM de cadeia curta, em geral, são menos estáveis que as de cadeia longa ( $\text{HSC}_n\text{CH}_3$ ;  $n > 3$  e 5) [23].

### **I.1.2 O substrato e a caracterização da superfície modificada com SAM**

Os avanços substanciais que muitas técnicas de caracterização receberam nos últimos vinte anos foram decisivos para o esclarecimento de estruturas e mecanismos envolvidos em muitos sistemas auto-organizados. O desenvolvimento das microscopias de varredura (AFM, STM, etc) foram de grande valia para a complementação de estudos espectroscópicos na caracterização ao nível molecular de SAM. Mais recentemente, métodos que envolvem o fenômeno da difração surgiram como uma alternativa inovadora à caracterização destas superfícies exibindo a estrutura em duas dimensões. A maioria destas técnicas é adequada para a análise de SAM formadas sobre superfícies de ouro monocristalino. Técnicas eletroquímicas e a espectroscopia de impedância eletroquímica e de plasmons de superfície tem sido mais utilizadas para caracterizar estruturas sobre ouro policristalino e na maioria das vezes determinando propriedades gerais do filme fino como espessura, resistência à transferência de elétrons, capacitância, recobrimento, eletroatividade.

A superfície sobre a qual a SAM é formada é geralmente referida como substrato. Os substratos variam desde superfícies planas (placas metálicas, eletrodos, faces cristalinas) até nanoestruturas muito curvadas (colóides, nanocristais, nanotubos). Substratos planos são muito utilizados para a caracterização da relação estrutura-propriedades da SAM porque são mais convenientes, fáceis de preparar e mais compatíveis com as técnicas de análise de superfície como a espectroscopia de reflexão-absorção no infravermelho (RAIRS, sigla do nome em inglês)[24], espectroscopia Raman [25], espectroscopia de foto elétrons excitados por raio-x (XPS, sigla do nome em inglês)[26-28], espectroscopia de alta resolução de perda de energia de elétrons (HREELS) [27], espalhamento de átomos de hélio [29], difração de raio-x [29], goniometria [30], elipsometria óptica [28], ressonância de plasmon de superfície (SPR, sigla do nome em inglês)[25,31], Espectrometria de massas [28], microscopia de varredura (SPM) [28], microbalança de cristal de quartzo (QCM, sigla do nome em inglês [9-10], eletroquímica [22,33-42].

Outras estruturas nanometálicas, como as nanopartículas, podem comportar a formação de SAM sobre suas superfícies e estes sistemas têm sido estudados por microscopia eletrônica [43], SPM [44-45], espectroscopia de estrutura fina de absorção de raios-x (EXAFS, sigla do nome em inglês) [46-47], espectroscopia de alta resolução da borda de absorção de raios-x (XANES, sigla do nome em inglês) [46-47], espectroscopia de infravermelho [48-49], espectroscopia UV-Vis [50], calorimetria diferencial de varredura (DSC, sigla do nome em inglês) [48-51], espectroscopia de massas, cromatografia líquida de alta resolução (HPLC, sigla do nome em inglês) [53], eletroquímica [54] e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR, sigla do nome em inglês) [48]. Um critério importante para a escolha do tipo de substrato e do protocolo de pré-tratamento da superfície é a aplicação final da superfície modificada com a SAM. O Ouro policristalino tem sido amplamente utilizado como base em litografia, construção de sensores e estudos eletroquímicos e biológicos devido ao fato de muitos materiais se aderirem bem a este substrato e ser economicamente mais viável que o substrato monocristalino.

Dentre outros metais, o ouro tem sido mais empregado como substrato para a construção de SAM. As razões são históricas e devido ao fato de monocamadas bem empacotadas serem obtidas sob este metal. Além disso, o ouro é um metal fácil de ser obtido na forma de colóide ou filme fino (eletrodeposição, deposição física ou química

de vapores do metal á vácuo - filmes de ouro depositados sobre vidro ou sílica apresentam grande tendência a cristalinidade de Au(111) e são essencialmente 100 % Au(111) quando o substrato é mica [22,55-56]); é um metal razoavelmente inerte (não oxida em temperaturas inferiores ao seu ponto de fusão, não reage com O<sub>2</sub> atmosférico e nem com a maioria das espécies químicas); é substrato comumente utilizado em técnicas analíticas e espectroscópicas como SPR, QCM, RAIRS e elipsometria; é apto a estudos biológicos já que células podem aderir à superfície áurea sem riscos de toxidez a sua estrutura; e é fácil de ser cravejado por meio de técnicas litográficas. A prata é o segundo metal mais utilizado para estudos de formação de SAM de tio-compostos, mas é um material facilmente oxidável e tóxico às células. O cobre é um material muito interessante do ponto de vista tecnológico, porque ocorre, usualmente, como condutor eletrônico, no entanto, é ainda mais susceptível que a prata à oxidação. O paládio é bastante adequado à formação de SAM, e na verdade, em muitas aplicações apresenta resultados superiores àqueles encontrados com o ouro. Apresenta propriedades interessantes como rugosidade até 3 vezes menor que a do ouro na construção de filmes finos, propriedades catalíticas frente a alguns substratos, biocompatibilidade e apresenta custo similar ao do ouro [2].

### **I.1.3 A adsorção de tióis sobre substratos metálicos**

A formação de monocamadas auto-organizadas é realizada a partir do contato de uma superfície metálica, com uma solução da espécie tiolada de interesse dispersa em fase gasosa ou líquida. O processo dinâmico de formação da SAM em fase gasosa é mais bem descrito que em fase líquida, e isto se deve à menor complexidade do sistema. Em fase gasosa, verificou-se que a primeira etapa de adsorção ocorre com baixo recobrimento molecular, onde a ligação S-H ainda permanece sobre o substrato metálico. Em seguida, os tióis são convertidos a tiolatos e o hidrogênio, provavelmente, é perdido devido a um processo de recombinação, na forma de H<sub>2</sub>. Posteriormente, há fases intermediárias que precedem a fase de crescimento da monocamada. A formação de monocamadas a partir de soluções líquidas parece seguir uma progressão cinética qualitativa segundo o modelo de Langmuir, porém, no aspecto quantitativo, a adsorção de Langmuir parece ser imprecisa na descrição do fenômeno. Acredita-se que a evolução estrutural verificada durante a formação da SAM em fase gasosa também ocorra em fase líquida, no entanto, as etapas de menor recobrimento ainda não foram

---

demonstradas. O efeito hidrofóbico também pode contribuir para formação de monocamadas auto-organizadas na superfície de sólidos, principalmente, no que tange ao equilíbrio termodinâmico de todo o processo, pois, a variação de entropia durante a adsorção e a formação de uma monocamada implica, entre outros aspectos, em uma redução de entropia em relação ao soluto em solução aquosa.

Em geral, considera-se que as SAM apresentam poucas imperfeições. Na verdade, estes sistemas são, substancialmente, mais complicados que arranjos altamente ordenados, os quais, são, usualmente, utilizados na descrição de sistemas auto-organizados, como exibido na Figura 1. As causas das imperfeições encontradas nas SAM são de origem intrínseca e extrínseca: fatores externos, como a limpeza e os métodos de preparação do substrato são responsáveis por alguns defeitos, mas certas imperfeições existem pelo simples fato de que sistemas auto-organizados são sistemas dinâmicos com complexos comportamentos de fase.

Esforços na tentativa de se obter a monocamada mais impenetrável e com menos defeitos sobre superfícies de ouro estimularam o estudo de diversos fatores durante o processo de formação: morfologia do substrato, limpeza, pureza do adsorvente, solvente de deposição, concentração da solução de adsorvente, tempo de deposição e outras variáveis mais específicas, relativas ao procedimento específico de formação da SAM. Infelizmente, não há fórmulas definidas para a obtenção de monocamadas “perfeitas”. Folkers et al. [57] afirmaram que considerações a respeito de monocamadas preparadas segundo um determinado protocolo não são, necessariamente, válidas para SAM construídas a partir de protocolos diferentes, uma vez que a presença de impurezas e irregularidades superficiais como vales, picos e terraços entre planos regulares, influenciam mais nas propriedades eletroquímicas do eletrodo modificado, do que o grau de cristalinidade do substrato [17]. Alguns trabalhos na literatura mostraram que monocamadas de tióis formadas sobre ouro policristalino apresentam características superiores àquelas formadas sobre superfícies de sílica ou mica, sob as quais, ouro foi depositado por evaporação. Creager et al. [58] and Guo et al [59] demonstraram que monocamadas formadas sobre ouro policristalino são mais impenetráveis à sondas redox em solução, que aquelas formadas sobre superfícies monocristalinas.

### **I.1.4 Preparação de substratos metálicos para a adsorção de SAM**

Um grande número de pré-tratamentos térmicos [60-61], mecânicos [62-63] e (eletro)químicos [60-66] de superfícies de eletrodos de ouro têm sido descritos na literatura e são, comumente, aplicadas antes da derivatização da superfície metálica, devido ao grau de reatividade e limpeza que a nova superfície exposta adquire. Entretanto, especialmente para aplicações práticas na área de derivatização de superfícies, somente uma avaliação mínima da atividade da superfície de ouro obtida é, comumente, realizada após o procedimento de pré-tratamento. Os procedimentos mais utilizados para a adequação do substrato à formação de SAM compreendem algumas etapas: inicialmente, se aplica um polimento mecânico com papel de polimento, alumina ou pó de diamante, seguido de um tratamento fortemente oxidante. O tratamento oxidativo consiste em expor a superfície eletródica à ação de espécies reativas de oxigênio provenientes de radiação UV, plasma de oxigênio ou soluções fortemente oxidantes. Estes tratamentos removem os materiais orgânicos contaminantes adsorvidos e formam uma camada de óxidos de ouro sobre a superfície do metal [67-70]. Quando o objetivo é remover uma fina camada de óxido de ouro ou remover materiais inorgânicos adsorvidos, a superfície é tratada com água régia [71-72]. Dependendo da finalidade, a fina camada de óxidos formada sobre a superfície durante estas etapas pode ser quimicamente reduzida com álcoois, sendo, especialmente, utilizado o álcool etílico [62,67-69]. Após estes procedimentos, em geral, tratamentos térmicos ou eletroquímicos são aplicados com o objetivo de diminuir a rugosidade e/ou ativar a superfície eletródica [73-74].

A formação da SAM é fortemente dependente de fatores relacionados à propriedades de superfície do substrato e isto tem sido foco de muitos estudos devido ao fato da ligação Au-S, que é responsável pelo estabelecimento inicial da SAM, ser formada tanto sobre superfícies de ouro oxidadas [67,69,75], quanto reduzidas [22,76,69,67]. O papel de cada espécie química na formação de monocamadas não é, completamente, compreendido, e contraditoriamente, a quimiosorção da SAM é realizada a partir de soluções alcoólicas (com característica redutora) sobre superfícies oxidadas de ouro. Esta etapa extremamente importante na modificação de superfícies com SAM precisa ser esclarecida de forma a permitir um maior controle das propriedades do filme obtido.

O Ouro monocristalino ainda é a forma cristalina mais empregada em investigações a respeito dos processos de adsorção de tióis [71-73,67-69,78]. Ron e Rubinstein [67-68] descreveram a aplicação de um protocolo de pré-tratamento usando UV/ozônio (ou plasma de oxigênio) e imersão da superfície áurea em etanol para posterior estudo de formação de monocamadas de tióis. Foram relatados alguns efeitos do tratamento oxidativo sobre a SAM quimioadsorvida como, por exemplo, a existência de uma camada estável de óxido de ouro, trapeada entre o substrato e a monocamada de dodecil mercaptana estudada. Medidas elipsométricas e de ângulo de contato foram utilizadas neste estudo, no entanto, não foi possível obter resultados conclusivos a respeito de efeitos do pré-tratamento sobre a estrutura, orientação e espessura da SAM obtida.

Atualmente, o uso de eletrodos de ouro policristalino para propósitos analíticos tem chamado muita atenção devido, principalmente, à facilidade de manuseio e custo mais acessível. Dentre os diversos procedimentos de limpeza e preparação da superfície de ouro policristalino, alguns tem sido extensivamente utilizados nos últimos anos [70,79-87]. No entanto, nenhum estudo sistemático compilando as características superficiais obtidas com estes protocolos mais empregados está disponível na literatura.

### **I.1.5 Cinética de adsorção de tióis sobre ouro**

Embora diversas técnicas sejam empregadas para a investigação da cinética de adsorção de alcanotióis sobre ouro, os métodos eletroquímicos não têm sido freqüentemente utilizados para este fim [33]. Há um consenso geral de que a formação de SAM de tióis ocorre em duas etapas, segundo um processo adsortivo do tipo de Langmuir: inicialmente uma quimiosorção caótica, seguida de uma etapa organizacional dependente do tempo [33, 68, 88-93]. Em um dos trabalhos mais antigos sobre o tema, Karpovich e Blanchard [93] estimaram a taxa de formação de monocamadas de n-alcanotióis de cadeia longa sobre ouro policristalino em tempo real, utilizando gravimetria com QCM. Observaram a rápida formação da monocamada de 1-octadecanotiol da ordem de 0,5 s e, a partir de dados de QCM, demonstraram que o equilíbrio de massa sobre o eletrodo de ouro é atingido em, aproximadamente, 1 minuto. Ao contrário do que acontece com o equilíbrio estrutural das cadeias alifáticas, que se estende por muito mais tempo de acordo com dados de espectroscopia de

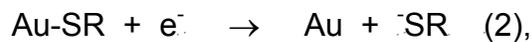
infravermelho. Existe na literatura grande divergência a respeito das constantes de formação determinadas experimentalmente, pois os valores variam, consideravelmente, quando a mesma técnica é empregada na determinação e, enormemente, quando resultados de técnicas diferentes são comparados.

Algumas propriedades das monocamadas auto-organizadas podem ser monitoradas em função do tempo de modo a permitir a determinação da cinética de crescimento ou de formação da SAM. Subramanian e Lakshminarayanan [33] estudaram a cinética de adsorção de n-alcanotioóis sobre ouro, baseados na capacitância interfacial da superfície modificada, calculada por meio da espectroscopia de impedância eletroquímica. Kubota e colaboradores [92], por sua vez, estudaram a cinética de adsorção de uma SAM de ácido mercaptoundecanóico em discos de ouro por meio de SPR acompanhando a variação da constante dielétrica do filme. Uma outra técnica eletroquímica que apresenta grande potencial para ser utilizada neste tipo de estudo é a dessorção eletroquímica de monocamadas auto-organizadas. Especialmente, porque além das medidas diretas de recobrimento da superfície pela SAM, é possível também, monitorar outros fenômenos eletroquímicos que podem estar, simultaneamente, ocorrendo com a SAM como, por exemplo, rearranjos.

### **I.1.5 Redução dessortiva de SAM de tióis**

Em 1991, Widrig et al. [22] estudaram, sistematicamente, o fenômeno da dessorção de tióis de eletrodos de ouro e prata e propuseram a sua utilização para a caracterização de monocamadas. Tióis se dessorvem de uma superfície metálica quando sobre esta superfície são aplicados potenciais, suficientemente, negativos. O fenômeno é, em geral, conduzido em soluções aquosas ou etanólicas, contendo eletrólitos de suporte em meio com pH básico ou neutro. Após a dessorção, tanto o tiolato, quanto a superfície exposta de ouro se solvatam. Parte do tiolato solvatado se difunde da superfície, enquanto parte pode ser readsorvido se o potencial aplicado retornar para valores positivos. Em alguns casos, o processo de readsorção pode ser verificado pelo aparecimento de um pico anódico, mas geralmente este pico não é observado. O potencial de dessorção depende do tamanho da cadeia carbônica da mercaptana, da cristalinidade da superfície e de grupos funcionais terminais, enquanto que, a área sobre o pico de dessorção independe destes fatores [17]. A reprodutibilidade dos resultados depende da cristalinidade do ouro utilizado como

eletrodo e das condições de pré-tratamento de superfície. Weisshaar e Porter [21] verificaram que filmes de ouro evaporados sobre sílica (111) exibem múltiplos picos de dessorção, área total não reprodutível e recobrimento aparente, em média, metade do valor encontrado para superfícies de ouro (111). No entanto, as SAM formadas reagem identicamente sobre ambas superfícies em outros aspectos como a capacitância, ângulo de contato e espectro de absorção no infravermelho. O processo físico-químico envolvido na adsorção (1) e dessorção eletroquímica (2) de tióis (HSR) está representado nas seguintes equações:



onde, Au representa o adsorvente, HSR e  $\text{SR}^-$  são as espécies do adsorbato livres em solução e Au-SR é forma quimioadsorvida do adsorbato. A dessorção de monocamadas inicia-se a partir dos monômeros localizados nas regiões de defeitos e imperfeições da monocamada. Após a redução eletroquímica, acredita-se que há uma etapa de formação de estruturas micelares e aglomerados com os tiolatos dessorvidos, parte destas estruturas se difundem e outra parte, permanece próxima à superfície eletródica.

### **I.1.6 Aplicação de superfícies modificadas com SAM**

As monocamadas são nanoestruturas com grande número de propriedades úteis e aplicações. A aplicação das SAM atingiu diversas áreas como a biologia celular e bioquímica (suporte para adesão celular, investigação de sinais intracelulares, mimetização de estruturas biológicas como canais iônicos e membranas, estudo de processos relacionados interações ligante-receptor, estudos de adesão e mobilidade celular), a cristalografia e a eletrônica molecular (substratos para o crescimento de cristais e nanocristais, controle da orientação de cristais iônicos, alinhamento de cristais líquidos, impressão por microcontato) e a eletroquímica (estudos sobre prevenção de corrosão, litografia em escala nanométrica, desenvolvimento de sensores eletroquímicos para compostos orgânicos e inorgânicos) [2,1,17].

Uma característica que se destaca em estruturas com escala nanométrica é que, tipicamente, apresentam grande porcentagem de seus átomos constituintes expostos. O volume de um objeto decresce mais rapidamente que a sua área superficial à medida que o tamanho do corpo diminui. Este comportamento, no caso mais extremo, gera uma estrutura onde, aproximadamente, todo átomo constituinte é interfacial [2]. Monocamadas são especialmente adequadas para a nanociência e tecnologia porque: (i) são de fácil preparo, pois não necessitam de ambientes com ultra-vácuo ou outro equipamento específico na sua preparação; (ii) se estabelecem sobre objetos de todos os tamanhos e são componentes essenciais à estabilização e adição de grupos funcionais na preparação de objetos em escala nanométrica como filmes finos, nanofios, colóides e outras estruturas; (iii) conseguem fazer um contato do ambiente externo com as propriedades ópticas (índice de refração, frequência de plasmon de superfície) e elétricas (resposta de corrente versus potencial, eletroatividade) de estruturas metálicas; (iv) permitem correlacionar estruturas a nível molecular à fenômenos interfaciais macroscópicos como molhabilidade, adesão e fricção.

## **I.2 Superfícies quimicamente modificadas e a eletroanalítica**

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos é uma das áreas de maior e mais rápido crescimento dentro da química analítica, principalmente, devido aos desafios impostos pelas necessidades analíticas da indústria nos seus diversos ramos, no controle e vigilância ambiental e investigações bioanalíticas. Inicialmente, utilizaram-se para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos, eletrodos base compostos por metais ou ligas, grafite ou metais líquidos. Tais eletrodos eram úteis para a determinação de algumas espécies químicas de interesse, mas apresentavam dificuldade de discriminar entre compostos alvos que possuíam características redox similares, e sofriam com a passivação gradual de sua superfície, que é consequência principal da adsorção dos produtos da própria reação de óxido-redução utilizada na detecção, ou ainda, dos sub-produtos destas reações que podem se polimerizar e se depositar sobre a superfície dos eletrodos [11,94].

Com o objetivo de minimizar os problemas acima descritos surgiram os eletrodos modificados. A denominação eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi inicialmente utilizada na década de 1970 para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas

---

convenientemente imobilizadas na superfície desses dispositivos [95]. O principal objetivo dessa modificação é manipular e controlar, conforme a finalidade da modificação, as propriedades físico-químicas da superfície eletródica, de forma a alterar a reatividade e seletividade do sensor base, favorecendo assim, características que podem contornar, efetivamente, muitos dos problemas apresentados pelos sensores eletroquímicos tradicionais, como a sensibilidade ou seletividade [11,95].

Na busca de maior seletividade e eficiência na transferência eletrônica voltada para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos nasceram os biossensores, definidos como um dispositivo que incorpora um elemento biológico de reconhecimento intimamente conectado a um transdutor [96]. Este componente biológico pode ser um microrganismo, um anticorpo, oligonucleotídeos, enzimas ou qualquer outra biomolécula que possa interagir seletivamente com substratos alvos [97]. As enzimas e os transdutores amperométricos são, respectivamente, os componentes biológicos e transdutores mais comumente usados na confecção de biossensores [98-99]. O grande interesse por este tipo de dispositivo deve-se à combinação da alta seletividade das enzimas em reconhecer compostos alvos com o acompanhamento direto da reação biocatalítica através de um sinal de corrente [98], o que permite a determinação de vários compostos de interesse de forma rápida, simples e direta.

O acoplamento eletrônico entre estas enzimas e o eletrodo nos biossensores pode ser realizado por meio de diferentes mecanismos: (i) pela eletroatividade do substrato ou produto enzimático (biossensores de primeira geração [100]); (ii) pelo auxílio de mediadores, livres em solução ou imobilizados juntamente com a enzima (biossensores de segunda geração [98]); e finalmente (iii) pela transferência eletrônica direta entre a superfície do eletrodo e o centro ativo da enzima (biossensores de terceira geração [101]). Várias estratégias de imobilização de enzimas na superfície de eletrodos como a ligação covalente, a ligação covalente cruzada com glutaraldeído, a adsorção, a oclusão em matrizes poliméricas e adsorção são relatadas na literatura [102-103]. Uma nova alternativa tem sido relatada recentemente envolve a utilização de SAM [104-106]. A imobilização do elemento biológico empregando-se monocamadas auto-organizadas permite um maior controle da distância e orientação do centro de óxido-redução em relação à superfície do eletrodo, facilitando a construção e o desempenho dos três diferentes tipos de biossensores [107].

### I.3 Mimetização de sistemas biológicos

As propriedades dos sistemas biológicos, tanto do ponto de vista da reatividade quanto dos mecanismos de reação, e principalmente em relação à atividade catalítica frente a reações de oxidação e redução têm estimulado o estudo de substâncias redox de origem não-biológica capazes de mimetizar a atividade catalítica dos primeiros [108, 109]. Neste sentido, foi introduzida uma inovação no campo dos biossensores, pois se vislumbrou a possibilidade das vantagens que poderiam advir da utilização de compostos biomiméticos.

Sabe-se que os fatores que aumentam a distância entre o centro redox da enzima e o eletrodo diminuem a eficiência dos biossensores [110]. Na maioria das enzimas, a barreira limitante mais crítica em relação à distância enzima-eletrodo é a densa camada protéica ao redor do sítio ativo da enzima [97]. Então, a redução ou eliminação desta capa protéica responsável pela estrutura tridimensional da enzima pode ser realizada por meio da modificação das biomoléculas ou empregando-se complexos metálicos que imitem a estrutura do centro redox da enzima de interesse. A princípio, estes sensores biomiméticos devem ser tão ou mais sensíveis e estáveis quanto a versão que utiliza o componente biológico na íntegra.

Sabe-se que as enzimas são estruturas complexas existentes em organismos vivos, que possuem grupos catalíticos e muitas vezes requerem de cofatores específicos ou coenzimas para desempenhar a catálise bioquímica. Esta catálise enzimática altamente efetiva, existente na natureza, tem inspirado muitos pesquisadores como aconteceu com Cram [111], um dos pioneiros a perceber que as estruturas enzimáticas poderiam ser substituídas por modelos mais simples. Cram estudou estruturas hospedeiras (host) de criptanos que se ligavam seletivamente a moléculas hóspedes (guest).

Com a finalidade de sintetizar enzimas artificiais muitas configurações têm sido propostas, uma vez que a idealização do uso de modelos enzimáticos não está diretamente relacionada com a estrutura das enzimas naturais, mas sim com estruturas capazes de realizar catálises de espécies importantes. Têm-se partido desde a modificação de coenzimas ou cofatores naturais de enzimas [112-113], até a síntese de compostos que se apresentam como modelos enzimáticos [114-115]. As enzimas também podem ser imitadas fazendo uso de estruturas supramoleculares, que podem

---

executar os mesmos processos realizados pelas enzimas, sem seguir estritamente o caminho pelo qual as enzimas realmente o fazem [116].

O importante papel de íons cobre para sistemas biológicos é reconhecido há muito tempo. Cobre é um componente essencial para os organismos vivos, isto pode ser atestado pelo grande número de proteínas que possuem íons cobre em sua estrutura, como por exemplo, as transportadoras de elétrons (plastocianina, azurina, pseudoazurina), as transportadoras de dióxigênio (hemocianina), as oxigenases (tirosinase, dopamina  $\beta$ -hidroxilase, fenilalanina hidroxilase etc), as oxidases (galactose oxidase, amina oxidase, ascorbato oxidase, lacase, citocromo-c oxidase), as redutases (nitrito redutase etc), algumas proteínas que causam desproporcionamento (superóxido dismutase) e outras de função ainda desconhecida como a umecianina e a estelacianina [117]. Na última década esforços têm sido realizados para entender como funcionam as enzimas dependentes de cobre que utilizam oxigênio para a funcionalização de substratos orgânicos. Baseado nas propriedades espectroscópicas, principalmente aquelas determinadas através de ressonância eletrônica paramagnética, os sítios ativos destas cuproproteínas eram classificadas em três grupos, tipo I, II e III. Contudo, graças ao grande número de informações estruturais recentes a respeito do sítio ativo destas proteínas novas classificações estão surgindo, com até 7 classes distintas descritas [117].

Com base na ampla informação existente na literatura a respeito das enzimas dependentes de cobre, alguns autores têm desenvolvido sensores quimicamente modificados, onde toda a estrutura enzimática pode ser substituída por um complexo de cobre mais simples [115-118]. No trabalho desenvolvido por Hasebe et al. [115], foi usado o complexo de poli-histidina cobre como espécie catalisadora na construção de um sensor biomimético com transdução amperométrica para ascorbato. Concluiu-se que o catalisador conseguiu imitar o sítio ativo da referida enzima devido ao perfil de resposta que seguiu a cinética de Michaelis – Menten.

Muitos complexos dinucleares de cobre com diferentes tipos de ligantes têm sido preparados e caracterizados de forma a se entender as relações entre a geometria ao redor dos sítios de íons cobre, o modo de coordenação com ligantes de oxigênio, a reatividade e suas propriedades espectroscópicas [119-121]. Um trabalho em especial, realizado por Rockcliffe e Martell [119] descreve a síntese, caracterização e utilização de complexos de cobre (I) e (II) formados a partir de ligantes macrocíclicos análogos ao

sítio ativo da enzima tirosinase. No trabalho citado também foi atestada a atividade mimética destes compostos em relação à oxidação de compostos fenólicos.

Em 1972 foi publicado o primeiro artigo de revisão sobre o que havia sido descrito na literatura até então sobre a química biomimética [122]. Neste artigo foi definida por Ronald Breslow: como o ramo da química orgânica que tenta imitar reações químicas naturais e processos enzimáticos de forma a melhorar o desempenho da química orgânica. Esta primeira definição é muito subjetiva e restrita ao desenvolvimento de novas rotas sintéticas inspiradas em processos enzimáticos. No entanto, isso não significava imitar um sistema enzimático em específico, mas ver nas enzimas exemplos de catalisadores polifuncionais que se ligam aos seus substratos a partir de geometrias bem definidas.

Existem enzimas que são capazes de realizar a reação de hidrólise de seus substratos com rapidez incomparável, no entanto, este tipo de reação é fácil de se reproduzir no âmbito laboratorial. Muito mais inacessível é o que a natureza faz, por exemplo, na transformação de ácido esteárico, especificadamente, em ácido oléico que consiste em introduzir uma dupla ligação no meio de uma cadeia de carbonos homogênea sem a necessidade de ativar nenhum dos átomos de carbono da cadeia com grupos funcionais específicos [122]. Portanto, uma síntese biomimética deveria, a princípio, tentar desenvolver “reagentes rígidos” no sentido da orientação dos reagentes e do substrato em uma geometria bem definida, com ataque em local específico formando um complexo reagente-substrato [123]. Como exemplo pode-se citar a funcionalização seletiva de esteróis por meio da técnica biomimética [122-124]. O objetivo dos autores era incluir uma dupla ligação no composto coleste-3 $\alpha$ -ol entre os carbonos 14 e 15. Partindo do princípio que seria necessário utilizar um reagente rígido, selecionaram ácidos benzofenólicos de cadeias carbônicas de diferentes tamanhos dado que estes compostos são foto-excitáveis (ao seu estado tripleto), desta forma, capazes de atacar grupos metilênicos. Ao atacar um hidrogênio em particular do colesterol, o átomo de oxigênio do estado tripleto da benzofenona fica unido ao substrato na forma de um di-radical. Esta espécie intermediária pode entrar em colapso e formar uma nova ligação C-C, ou realizar a transferência de hidreto para formar uma nova dupla ligação no substrato e um grupo carbonílico reduzido na benzofenona. Depois de uma etapa de hidrólise, o ácido benzofenólico é recuperado. Foi verificado

---

que utilizando o ácido benzofenoacético ocorreu um ataque seletivo ao carbono 14, produzindo o coleste-14-enol com 55 % de rendimento.

Depois deste primeiro passo, o desenvolvimento da química biomimética continuou ligado a química orgânica, mas voltado à utilização de cicloamiloses, ou como são mais conhecidas, as ciclodextrinas. O conceito de química biomimética foi redefinido por Kurganov e Topchieva [125] e ficou mais abrangente: “ciência que utiliza os princípios da organização bioquímica para construir sistemas artificiais que apresentem propriedades próprias de sistemas químicos naturais”. Se observamos uma enzima verificaremos que a força que a une a um determinado substrato é, entre outras, devido ao efeito hidrofóbico. As ciclodextrinas apresentam a propriedade interessante de que elas são solúveis em água, mas possuem uma cavidade que é hidrofóbica, tal qual as enzimas [123,126]. Em particular, as ciclohexamiloses se ligam muito bem com derivados benzênicos, enquanto que as cicloheptamiloses apresentam cavidades maiores que dão mais flexibilidade à formação do complexo reagente-substrato e a diferentes constantes de ligação. Neste sentido a idéia de biomimetização está ligada a idéia de reações direcionadas. Em complexos formados entre ciclodextrinas e anéis aromáticos, como por exemplo, o anisol, a posição orto seria protegida enquanto que a para seria acessível. Neste caso seria possível alcançar uma substituição seletiva aromática [122].

A primeira enzima artificial foi descrita em 1970, formada a partir de um dímero de ciclodextrina [127]. Foram inicialmente dispostas de forma oclusiva, posteriormente de forma aversa e apresentavam somente seletividade geométrica entre compostos angulares e lineares, respectivamente. Anos mais tarde, um dímero de ciclodextrina foi ligado através de uma ponte de enxofre, este composto apresentou seletividade de ligação para moléculas de colesterol. Posteriormente, ao se formar dímeros de ciclodextrinas usando 2,2'dipiridil como ligante [128], foi possível incorporar um metal entre as unidades de ciclodextrinas. Ao se complexar  $\text{Cu}^{++}$ , verificou-se que a hidrólise de um éster realizada pelo composto é cerca de 200.000 vezes mais rápida que hidrólise em meio aquoso. Quando o ligante empregado foi piridina 2-carboxaldeído [129,127], a catálise foi da ordem de 1.700.000 vezes mais rápida que em meio aquoso.

Enzimas são catalisadores eficientes. Não é incomum para uma enzima o aumento da velocidade de uma determinada reação por um fator de 10 bilhões de vezes [130]. Uma vez que as moléculas podem constituir fortes e seletivos sítios de

ligação para algum substrato, podem ser modificadas com o intuito de construir catalisadores que imitem enzimas, bem como servir de modelo para compreender e explicar mecanismos catalíticos e composição estrutural de moléculas biológicas complexas. O mecanismo de ação da enzima urease, por exemplo, foi proposto com base em estudos realizados com complexos mononucleares de níquel [131]. Concomitante ao desenvolvimento de catalisadores biomiméticos com base nas ciclodextrinas, também se empregaram complexos metálicos para a mesma finalidade.

### **I.3.1 Sensores biomiméticos**

Nos últimos 5 anos, a química biomimética se difundiu e criou vertentes em muitos ramos da ciência e, especialmente, a química eletroanalítica concebeu grandes inovações graças ao desenvolvimento de elementos biomiméticos aplicados no desenvolvimento de sensores. Um dos avanços mais recentes e inovadores consiste na criação de sensores biomiméticos [126, 132-133, 135-136]. Um sensor biomimético pode ser definido como um dispositivo que incorpora um elemento de reconhecimento intimamente conectado a um transdutor. E este elemento de reconhecimento imita em algum aspecto determinado sistema biológico e é baseado em sistemas químicos mais simples. Os elementos mais amplamente usados tem sido: (i) polímeros impressos [132, 134], que imitam receptores naturais, como os anticorpos; (ii) complexos metálicos [133, 135-136], que imitam sítios ativos enzimáticos; (iii) ciclodextrinas modificadas [126], que imitam sítios de ligação enzimáticos; (iv) monocamadas moleculares [137], que imitam membranas celulares.

### **I.4 Objetivos**

Objetivando construir ou melhorar o desempenho de sensores baseados nas propriedades eletrocatalíticas de biomoléculas específicas, a técnica de modificação de superfícies por meio de estruturas auto-organizadas pode ser utilizada para investigar com mais precisão e clareza as características biomiméticas e eletroquímicas de compostos inorgânicos ou organometálicos com características promissoras. Ao unir a linha de pesquisa que realiza modificações de eletrodos com SAMs com a que emprega materiais biomiméticos, espera-se o desenvolvimento de um sensor mais robusto e sensível para a análise de amostras de interesse farmacológico e/ou ambiental, sem

---

perdas significativas na seletividade. O presente trabalho tem como objetivo explorar as propriedades eletrocatalíticas de complexos metálicos de cobre no desenvolvimento de um sensor (para substâncias de interesse farmacológico) biomimético à catálise de um sistema enzimático em específico como a ascorbato oxidase, empregando eletrodos de ouro modificados com SAM de ácido 3-mercaptopropiônico.

## **CAPÍTULO II**

---

### **AVALIAÇÃO DAS ETAPAS DE PRÉ-TRATAMENTO DA SUPERFÍCIE ELETRÓDICA NA FORMAÇÃO DE MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS**

## II.1 Resumo

A influência da aplicação de diferentes protocolos de pré-tratamento de superfície na resposta eletroquímica de eletrodos de ouro policristalino foi avaliada. O polimento mecânico com alumina (M), a oxidação química com solução piranha  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  (C), o polimento eletroquímico da superfície (seqüência de varreduras de potencial entre  $-0,1$  V e  $1,2$  V vs ECS) (E), redução química da superfície com álcool etílico e combinações específicas entre estes tratamentos foram empregadas de modo a modificar as características da superfície eletródica. A eficiência dos pré-tratamentos propostos foi avaliada com base na resposta eletroquímica obtida para cada protocolo em relação ao par redox sulfato de ferro amoniacal (II/III) e pela formação de monocamadas auto-organizadas de ácido 3-mercaptopropiônico (3MPA) sob os eletrodos de ouro. A aplicação do procedimento (C) permitiu a ativação da superfície áurea, enquanto tanto (C) quanto (E) minimizaram a rugosidade da superfície de ouro e geraram superfícies com maior repetibilidade. A partir do perfil da dessorção eletroquímica da SAM de 3MPA foi possível verificar que a superfície reduzida de ouro ( $\text{Au}^0$ ) é um substrato mais adequado à obtenção de monocamadas bem empacotadas do que superfícies repletas de óxidos de ouro. Observou-se também, por meio de um estudo comparativo utilizando voltametria cíclica (CV) e voltametria de pulso diferencial (DPV), que entre os dois picos de dessorção da SAM de 3MPA, aquele localizado em região de potencial mais negativo corresponde à clivagem da ligação Au-S do tiol dessorvido. Em geral, a melhora das respostas eletroquímica não pode ser exclusivamente atribuída ao aumento da área superficial eletródica, mas também, ao estado químico e físico em que se encontra a superfície eletródica após a aplicação de um protocolo de pré-tratamento e limpeza.

## II.2 Introdução

O uso de eletrodos de ouro policristalino para fins analíticos tem atraído a atenção nos últimos anos devido, principalmente, à praticidade de manuseio destes em relação aos correspondentes em ouro monocristalino. Entre muitos procedimentos utilizados na limpeza e pré-tratamento de eletrodos de ouro monocristalino para a formação de SAMs, alguns tem sido intensivamente utilizados para a adequação de

superfícies de ouro policristalino, no entanto, nenhum estudo sistemático a respeito das propriedades de superfície alcançadas foi realizado. Dentro deste contexto, realizou-se uma comparação e avaliação dos procedimentos mais comuns utilizados no pré-tratamento de superfícies de ouro policristalino.

## II.3 Metodologia experimental

### II.3.1 Equipamentos e reagentes

Os experimentos voltamétricos foram realizados em um potenciostato PGSTAT30 da marca Autolab e o software utilizado para o controle das medidas eletroquímicas foi o GPES 4.9 (Eco Chemie BV, Holanda). Uma célula eletroquímica convencional com três eletrodos foi empregada, sendo o eletrodo de trabalho um eletrodo de ouro policristalino ( $0,071 \text{ cm}^2$ , 99.99 %, Metrohm 6.1204.020, Suíça), um eletrodo helicoidal de platina como o eletrodo indicador, e um eletrodo de calomelano saturado (ECS) como eletrodo de referência. Foi utilizado um banho de ultra-som T-1425 UNIQUE com controle de tempo (UNIQUE, Brasil), o qual apresentava frequência de trabalho de 25 kHz e a potência máxima de 54 W.

Os reagentes utilizados nos experimentos foram: ácido 3-mercaptopropiônico (3MPA) ( $\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ , Aldrich, USA), sulfato de ferro (III) amoniacal ( $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , Ecibra, Brasil), hexacianoferrato (III) de potássio ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , J. T. Baker, USA), hexacianoferrato (II) de potássio ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , J. T. Baker, USA), etanol absoluto ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , Synth, Brasil). Hidróxido de potássio (KOH, Synth, Brasil), ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ , Synth, Brasil), fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ , J. T. Baker, USA) e fosfato de sódio monobásico anidro ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , J. T. Baker, USA) e cloreto de potássio (KCl, Vetec, Brasil) foram utilizados como eletrólitos de suporte. Alumina (suspensão aquosa de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  com tamanho de partícula de 0,3 e 0,5  $\mu\text{m}$ ) foi adquirida da empresa Fortel, Brasil. A solução Piranha ácida era composta por uma mistura na proporção de 3:1 (v/v) de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pureza > 95 %, Synth, Brasil) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30% (m/v), Merck, Alemanha).

Todos os reagentes químicos, exceto se diferentemente descrito, são de grau analítico e foram utilizados sem prévia etapa de purificação. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água deionizada (Sistema Mili-Q de purificação de água, Millipore Inc., USA) com resistividade maior que 18  $\text{M}\Omega/\text{cm}$ .

### **II.3.2 Procedimentos de pré-tratamento mecânico, químico e eletroquímico dos eletrodos**

O procedimento de pré-tratamento mecânico (M) consiste no polimento manual dos eletrodos de ouro, com solução de alumina e flanela macia, até que a superfície polida apresente um aspecto espelhado. Posteriormente, os eletrodos são enxaguados e sonicados em água durante 1 minuto para a remoção de partículas residuais de alumina da superfície eletródica.

O pré-tratamento químico (C) consiste na imersão do eletrodo de ouro em solução Piranha durante 10 minutos. Posteriormente, os eletrodos são enxaguados e sonicados em água durante 1 minuto. A mistura de peróxido de hidrogênio e ácido sulfúrico é extremamente exotérmica e atinge temperaturas próximas a 80 °C nas condições experimentais utilizadas.

O pré-tratamento eletroquímico (E) foi realizado aplicando-se 25 varreduras sucessivas entre os potenciais redox do ouro (no intervalo de 0,1 V a 1,2 V vs ECS) em solução aquosa a 0,5 mol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, em 100 mV s<sup>-1</sup>. Posteriormente, os eletrodos são enxaguados e sonicados em água durante 1 minuto.

Os eletrodos de ouro foram submetidos a protocolos de tratamento compostos por associação dos procedimentos citados acima. Então, tratamentos M, C, M+E, C+E, M+C+E foram avaliados em relação às características físicas e químicas que conferiam à superfície tratada. Em geral, resíduos de contaminantes orgânicos deixados em etapas de limpeza anteriores, são removidas por meio da limpeza eletroquímica, mas se (E) é aplicado exclusivamente e em condições hidroestáticas, a limpeza da superfície não é efetiva. Por esta razão, este procedimento foi aplicado sucedendo os pré-tratamentos M ou C. Todos os experimentos foram realizados ao menos em triplicata.

### **II.3.3 Determinação da área eletroquímica superficial (ESA) de eletrodos de ouro**

A influência de diferentes pré-tratamentos na rugosidade superficial dos eletrodos foi investigada. Com esta finalidade, a medida da adsorção de oxigênio foi escolhida, por ser um método bastante confiável e adequado para obtenção da área microscópica exibida por superfícies de ouro [66,138]. A determinação da área eletroquímica do eletrodo de trabalho foi realizada através da integração da área de pico de redução da curva voltamétrica do ouro, obtidas a 25 °C, entre - 0,1 e +1,2 V, a

50 mVs<sup>-1</sup>, em solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0. A carga necessária para a redução de uma camada de oxigênio quimioadsorvido sobre a superfície de ouro policristalino foi considerada 390 ± 10 μC cm<sup>-2</sup> para efeito de cálculos [66]. Então, ESA é a razão entre a carga relacionada à redução do óxido de ouro da superfície estudada ( $Q_{Au/\alpha\text{ oxide}}$ ) e  $Q^{Std}$ . Geralmente, os valores de ESA podem ser expressos como fator de rugosidade, que é simplesmente o valor de ESA expresso por unidade de área geométrica superficial [66].

### II.3.4 Formação e remoção da SAM sobre a superfície eletródica

Os eletrodos de ouro foram imersos em solução etanólica contendo 10 mmol L<sup>-1</sup> de 3MPA para a formação das monocamadas sob a superfície metálica. Exceto se diferentemente descrito, os eletrodos foram imersos nesta solução durante 10 minutos. Em seguida, foram removidos da solução de tiol, enxaguados com etanol absoluto e água antes de serem utilizados nos estudos. Esta última etapa tem a finalidade de remover moléculas de tiol fisicamente adsorvidas sobre a superfície eletródica.

Foi demonstrado que a redução eletroquímica de n-alcanotióis é um fenômeno que pode ser utilizado para a caracterização de monocamadas de alcanotióis formados sobre metais e que a carga envolvida na dessorção redutiva pode ser empregada como uma medida da quantidade de moléculas adsorvidas sobre a superfície metálica de ouro e prata [22,138-139]. Neste trabalho, a superfície de recobrimento da SAM de 3MPA ( $\Gamma_{3MPA}$ ) foi estimada a partir da área do pico de redução da SAM, considerando que o átomo de enxofre é reduzido através de um mecanismo monoelétrônico.

A dessorção redutiva da SAM de 3MPA foi realizada por meio de voltametria de pulso diferencial. O eletrólito de suporte utilizado foi KOH na concentração de 0,1 mol L<sup>-1</sup>, deaerado com nitrogênio durante 30 minutos antes de cada ensaio. As condições experimentais foram: potencial inicial de + 0,1 V, potencial final de - 1,3 V, velocidade de varredura de 20 mV s<sup>-1</sup>, amplitude de pulso de 25 mV e largura de pulso de 50 ms. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e com objetivo de estabelecer uma correlação entre as medidas obtidas com DPV, ensaios similares nas mesmas condições experimentais foram conduzidos utilizando CV.

### II.3.5 Eletroquímica de sondas redox sob eletrodos de ouro

Fez-se uso de sulfato de ferro amoniacal (II/III) e hexacianoferrato (II/III) de potássio como moléculas sonda do comportamento e reatividade de superfícies de ouro que receberam diferentes pré-tratamentos e sob as quais foram formadas monocamadas de 3MPA. Soluções aquosas contendo  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de sulfato de ferro amoniacal (II/III) foram preparadas em solução a  $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido perclórico. E as soluções de ferrocianeto de potássio (II/III) foram preparadas em KCl,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 8,0 contendo  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  e de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ .

## II.4 Resultados e Discussão

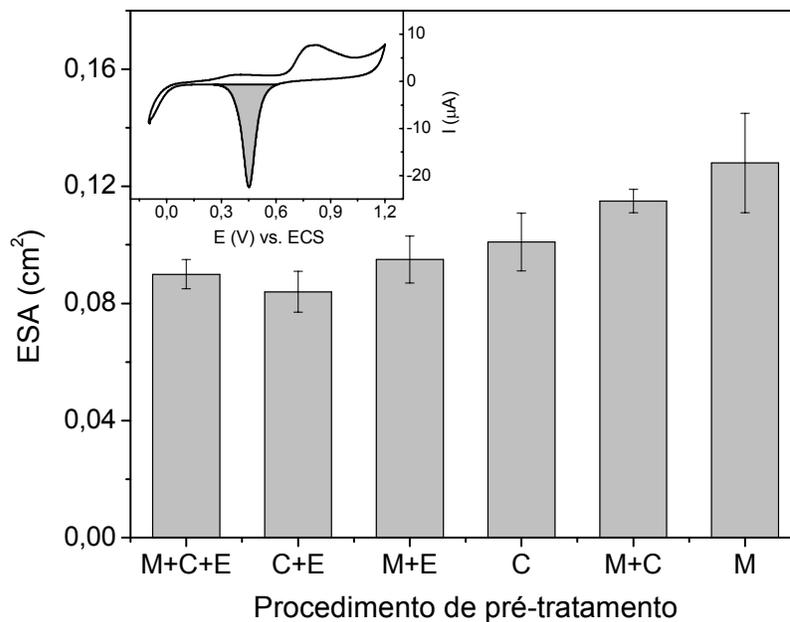
### II.4.1 Área eletroquímica superficial em função do pré-tratamento eletródico

O significado de ESA depende do método utilizado para a medida, especialmente, das propriedades da molécula utilizada como sonda eletroquímica [66,138]. A medida baseada na adsorção de oxigênio da solução é aplicável à platina e ouro, devido a regiões bem estabelecidas de formação e redução de óxidos.

A Figura 2 apresenta os valores de ESA obtidos a partir da aplicação de diferentes procedimentos de pré-tratamento sobre superfícies de eletrodos de ouro. Eletrodos que receberam somente o polimento mecânico apresentaram os valores máximos de ESA, no entanto, com a menor reprodutibilidade também obtida (para o tratamento M o desvio padrão relativo das medidas (RSD) foi 2,5 vezes maior que aquele calculado para os outros protocolos em média). Por outro lado, quando os procedimentos C e/ou E foram aplicados sobre a superfície eletródica, a ESA diminuiu e tornou-se mais reprodutível. Materiais policristalinos apresentam superfície onde a periodicidade da distribuição dos átomos varia de região para região [141-142] e a estrutura pode incluir diferentes defeitos, dependendo do procedimento empregado na preparação da superfície. Deste modo, os resultados observados se devem à formação, durante o polimento mecânico, de degraus, buracos e interrupções bruscas de planos cristalinos regulares, que são responsáveis por uma área microscópica maior que a área geométrica exibida pelo eletrodo.

A partir da informação exibida na Figura 2 foi calculado o fator de rugosidade das superfícies tratadas com diferentes protocolos de pré-tratamento. Foi encontrado para o

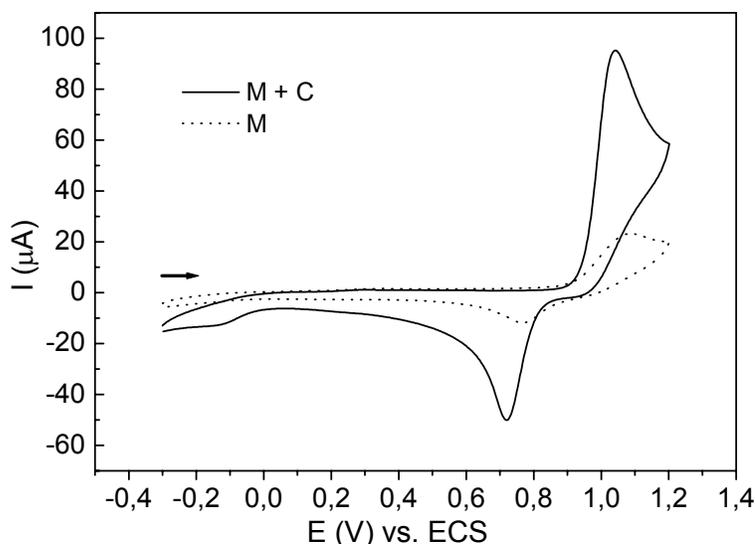
polimento mecânico, um fator de rugosidade de 1,80, 1,62 para (M+C), 1,42 para (C), 1,34 para (M+E), 1,18 para (C+E) e 1,27 para (M+C+E). Pode se notar que a rugosidade microscópica foi notoriamente diminuída por meio da aplicação do procedimento (E). O alisamento da superfície metálica é creditado à formação e remoção dos óxidos de ouro da superfície durante o pré-tratamento eletroquímico. A obtenção de ESA com repetibilidade (observado nas barras verticais da Figura 2) é importante para o desenvolvimento de aparatos analíticos e foi obtida aplicando-se os protocolos de pré-tratamento superficial (M+C) e (M+C+E) sobre a superfície dos eletrodos estudados.



**Figura 2.** ESA de eletrodos de ouro policristalino após a aplicação de diferentes pré-tratamentos. Procedimentos indicados na Figura: M, limpeza mecânica, C, limpeza química e E, representa a limpeza eletroquímica. O RDS é indicado sobre as barras ( $n = 3$ ). Figura inserida: voltamograma de um eletrodo de trabalho após o tratamento M com pico de redução em destaque. Fosfato de sódio,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0,  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

A rugosidade dos eletrodos mecanicamente polidos decresceu por um fator de 1,4 quando foi aplicado o protocolo de pré-tratamento (M+C+E). Hoogvliet et al. [74]

mostraram que esta redução pode chegar a um fator de 2 quando se aplica um tratamento eletroquímico com pulsos de potencial, em condições hidrodinâmicas. Entretanto, foi demonstrado que após este pré-tratamento eletroquímico, a rugosidade da superfície de ouro policristalino obtida é de  $0,62 (\pm 0,01) \text{ mC cm}^{-2}$  e no presente estudo verificou-se o valor de  $0,496 (\pm 0,005) \text{ mC cm}^{-2}$  após o pré-tratamento (M+C+E). Obteve-se, então, no presente estudo uma superfície mais uniforme e reproduzível.



**Figura 3.** Voltamogramas cíclicos de eletrodos de ouro policristalino que receberam pré-tratamento mecânico (M) e eletrodos que receberam pré-tratamento mecânico e químico (M+C) em meio ácido. Os voltamogramas se referem ao primeiro ciclo voltamétrico e foram realizados em  $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ,  $50 \text{ mVs}^{-1}$  em solução saturada com  $\text{N}_2$ .

Voltamogramas cíclicos de eletrodos preparados com pré-tratamento M e M+C obtidos em solução ácida são mostrados na Figura 3. Os eletrodos de ouro que receberam pré-tratamento M apresentam perfil voltamétrico típico [62,64]. A varredura anódica não apresenta corrente faradaica até, aproximadamente, 1,0 V, no entanto, a partir deste potencial é usual encontrar a região de formação de óxido do tipo  $\text{Au}/\alpha$ . Na subsequente varredura catódica, o óxido  $\text{Au}/\alpha$  é reduzido na faixa de potencial de 0,95 V a 0,6 V e, posteriormente, se segue a região de dupla camada elétrica até o final da varredura (-0,3 V).

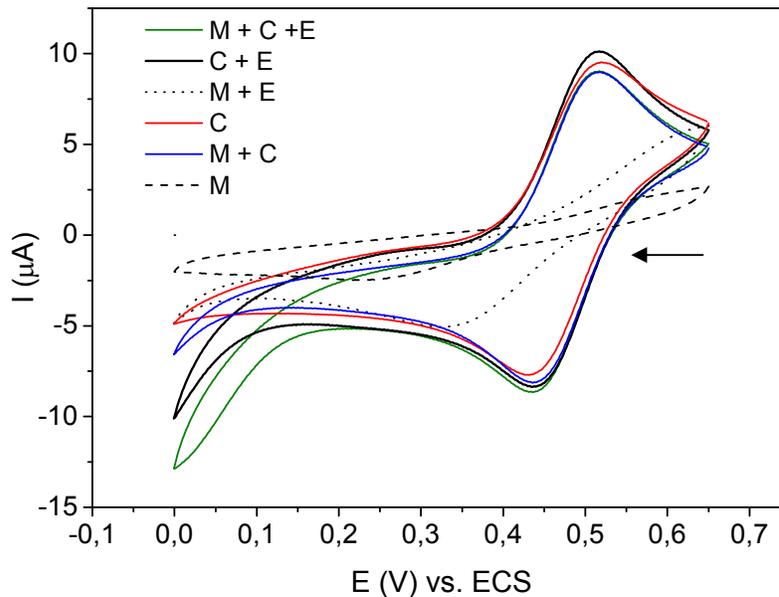
Informações típicas relacionadas à eletroquímica do ouro descreve a existência de duas regiões características no voltamograma do ouro, uma região de predominância da dupla camada elétrica e outra mais relacionada a óxido-redução da espécie  $Au/\alpha$  [143], no entanto, vem sendo descrito recentemente na literatura [60-61] a presença de outra espécie de óxido ou hidróxido (ou  $Au/\beta$ ), uma espécie metaestável que pode ser gerada sobre a superfície áurea, de acordo com o tratamento recebido pela superfície.

Burke and O'Mullane [64] observaram que regimes severos de tratamento catódico ou térmico sob ouro policristalino em soluções ácidas, resultam no aparecimento substancial de respostas faradaicas na região típica da dupla camada elétrica. Um exemplar de um voltamograma cíclico realizado em solução ácida é exibido na Figura 3. Na primeira varredura pode-se verificar a presença de um pico catódico entre 0,5 e 0,9 V e um pequena pico catódica entre - 0,2 e 0,0 V. Não há consenso na literatura sobre a origem deste último pico, em alguns estudos ele é relacionado à presença de óxido do tipo  $Au/\beta$  [64,61] e em outros, é considerado como redução de oxigênio fisicamente trapeado na superfície de ouro [144]. Entretanto, cabe enfatizar que este pico catódico "anômalo" aparece em CV da superfície eletródica de ouro em solução de ácido sulfúrico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , posteriormente à aplicação do tratamento (C), que é fortemente oxidante e ocorre sob alta temperatura.

Quando a ESA dos eletrodos de ouro foi determinada em meio neutro, foi verificado que o polimento mecânico gerava a maior área microscópica de todos os protocolos de pré-tratamento testados (Figura 2). Mas, por outro lado, em voltamogramas cíclicos realizados em meio fortemente ácido (Figura 3), fica evidente que o tratamento (C) gera maior quantidade de óxidos sobre a superfície eletródica que o tratamento (M). Relatos na literatura tem mostrado que o comportamento redox do ouro e soluções ácidas é incomum, especialmente em superfícies ativadas de ouro [61]. Na Figura 3 é possível observar que o eletrodo com tratamento (M) apresenta a menor área relacionada ao processo redox do óxido  $Au/\alpha$ . Contudo, a existência do óxido  $Au/\beta$  e a maior área correspondente à presença do óxido  $Au/\alpha$  é verificada para o eletrodo que recebeu tratamento (C). Conclui-se, então, que maior quantidade e diferentes tipos de óxidos são formados durante o tratamento químico e que em meio fortemente ácido, não somente a camada superficial de óxidos é ativada, mas também sub-camadas

formadas durante o pré-tratamento químico sobre o eletrodo de ouro. Em geral, estes resultados indicam que a composição e a topografia da superfície de ouro muda após os tratamentos químico e eletroquímico.

#### II.4.2 Comportamento voltamétrico do hexacianoferrato (II/III) e sulfato de ferro amoniacal (II/III) sobre superfícies de ouro



**Figura 4.** Voltamogramas cíclicos de eletrodos de ouro policristalino em  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2$  em solução  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{HClO}_4$ ,  $50 \text{ mV s}^{-1}$  após diferentes procedimentos de pré-tratamento de superfície.

Para verificar a influência do estado da superfície na performance dos eletrodos de ouro policristalinos, todos os procedimentos testados anteriormente foram investigados utilizando sulfato de ferro (II/III) amoniacal e hexacianoferrato (II/III) de potássio como sondas em estudos utilizando voltametria cíclica. O estudo com hexacianoferrato (II/III) de potássio em  $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , em pH 4,0, 7,0 e 8,0 sobre as superfícies diferentemente tratadas não mostrou ser eficiente para avaliar a reatividade das superfícies, pois todos os voltamogramas cíclicos apresentaram perfis muito similares: mesmo perfil voltamétrico, sem mudanças no potencial e nas correntes de

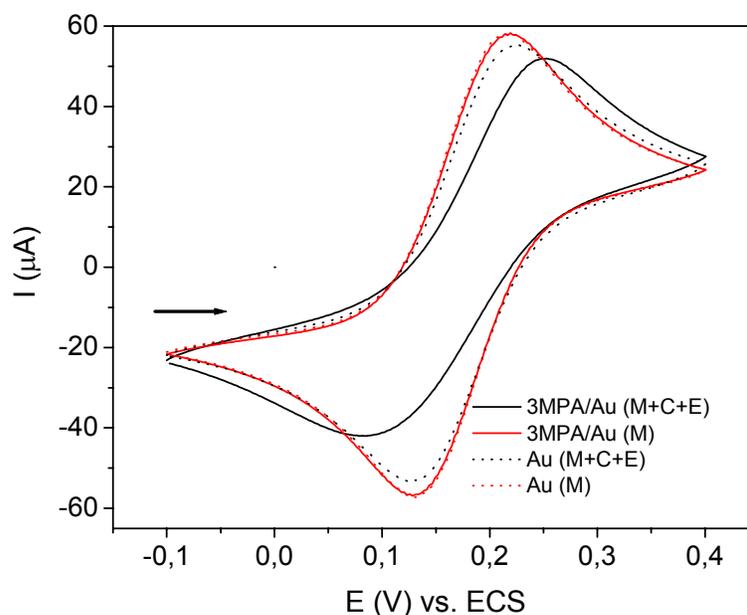
pico. Griveau et al. [145] tentaram utilizar o composto  $K_3[Fe(CN)_6]$  como prova redox para a caracterização de eletrodos de carbono vítreo modificados com ftalocianinas. Concluíram que devido o transporte de massa ser o componente determinante da velocidade de reação do par redox  $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ , outros fatores, como por exemplo, as condições da superfície eletródica, não iriam afetar significativamente o processo Faradaico inerente a esta espécie eletroativa [146-148]. A partir destes resultados conclui-se que a espécie  $K_3[Fe(CN)_6]$  não é adequada para avaliar as propriedades de superfície de eletrodos de ouro policristalino.

A espécie  $Fe(NH_4)(SO_4)_2$  em solução  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , com pH corrigido para 7,0 com  $H_2SO_{4(aq)}$ , apresentou comportamento indicativo das mudanças ocorridas em superfícies de ouro diferentemente tratadas. Na Figura 4 é exibida a resposta eletroquímica da espécie química Fe (III/II) em superfícies diferentemente tratadas. O par redox  $[Fe(H_2O)_6]^{3+}/[Fe(H_2O)_6]^{2+}$  apresentou comportamento *quasi-reversível* sob eletrodos que receberam pré-tratamento químico e uma redução significativa da velocidade reacional sob superfícies tratadas com o polimento mecânico. É importante enfatizar, que o polimento eletroquímico levou a uma leve melhora da atividade da superfície do ouro manualmente polida, contudo, ao se aplicar à limpeza química, o comportamento *quasi-reversível* foi completamente restabelecido. A partir destes resultados, pode-se concluir que a ativação, no caso de eletrodos de ouro policristalino, não pode ser atribuída somente ao aumento na área eletroquímica do eletrodo, mas ao tipo e quantidade de óxidos deixados na etapa de pré-tratamento.

#### **II.4.3 Efeito do pré-tratamento eletródico na formação de monocamadas auto-organizada de tióis**

Muitas tentativas de entender e incrementar o transporte de massa em superfícies modificadas por meio de auto-organização com tióis tem levado à criação de aparatos de reconhecimento molecular e iônico [149-151], bem como, a arranjos de ultramicroeletrodos de dimensões nanométricas [84]. Estes avanços no emprego de SAM para fins analíticos vêm se tornando possíveis graças aos esforços para o controle da formação e do surgimento de irregularidades e defeitos nas monocamadas [84]. Neste contexto, é igualmente possível controlar o grau de ordenamento de

monocamadas por meio do estudo das condições de pré-tratamento do substrato e da estratégia de formação da SAM.

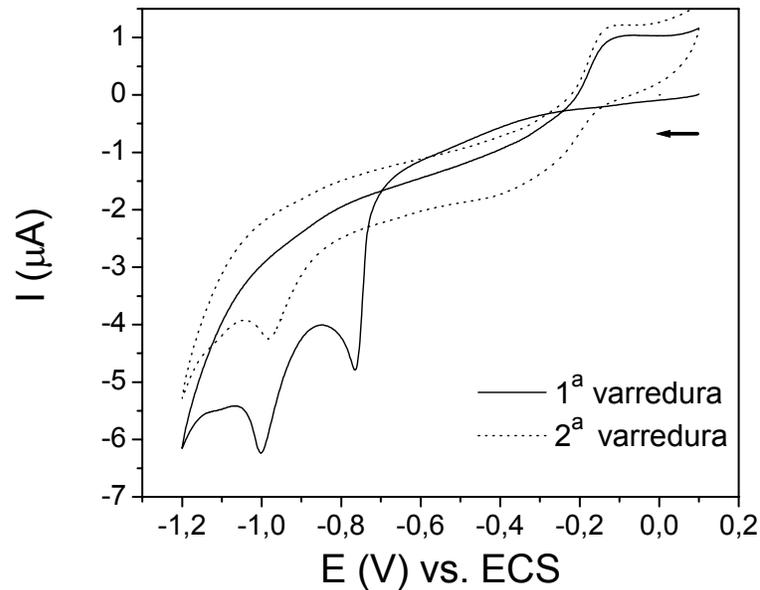


**Figura 5.** Voltamogramas cíclicos de eletrodos de ouro policristalino limpos ou revestidos com MPA que receberam pré-tratamento M ou M+C+E. Condições experimentais: solução  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  em  $0,1 \text{ KCl mol L}^{-1}$  pH 8,0 ,  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

Com o objetivo de obter informações sobre a estrutura de monocamadas formadas sobre superfícies de ouro policristalino, estudos voltamétricos foram realizados sobre superfícies eletródicas que receberam os pré-tratamentos M e M+Q+E, utilizando uma molécula sonda em meio básico, contendo  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (Figura 5). O grau de penetração de uma determinada molécula sonda através da monocamada é controlado pelas propriedades físicas e químicas da molécula sonda e pelas características relacionadas à organização e presença de irregularidades na SAM. Considerando que em meio básico, o composto  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  apresenta-se negativamente carregado, espera-se que ao entrar em contato com uma SAM composta por moléculas que contenham o grupo carboxílico desprotonado, sofra repulsão, principalmente, se a SAM for densa e bem empacotada. A partir do princípio que este processo alteraria a difusão da sonda eletroquímica até a superfície do

eletrodo de trabalho selecionou-se o composto  $K_3[Fe(CN)_6]$  como molécula sonda para este estudo. A monocamada de ácido 3-mercaptopropiônico foi, especialmente, escolhida para este estudo devido ao fato, que monocamadas de cadeia carbônica curta facilitam a transferência eletrônica através da SAM e, por este motivo, têm sido empregadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. O par redox  $Fe(CN)_6^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$  sob um eletrodo que recebeu polimento mecânico e que foi, posteriormente, recoberto com MPA, apresentou perfil voltamétrico similar ao de um eletrodo limpo que recebeu o mesmo pré-tratamento (Figura 5). Este fato indica que houve intensa difusão da molécula sonda para a superfície eletródica através da monocamada formada; provavelmente, devido à existência de grande número de defeitos e irregularidades na mesma. Entretanto, devido ao bom empacotamento que foi obtido sob a superfície de ouro pré-tratada com o procedimento M+C+E, obteve-se um voltamograma distorcido que mostrava queda na reversibilidade do processo e das correntes catódicas e anódicas do par  $Fe(CN)_6^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$  em relação àquele obtido com eletrodo de ouro limpo que recebeu o mesmo pré-tratamento de limpeza (Figura 5). Neste caso a molécula sonda foi dificultada de atingir a superfície do eletrodo de trabalho conforme previsto.

Foram obtidas monocamadas de MPA bem empacotadas sobre superfícies oxidadas de ouro policristalino. O tratamento M+C+E gerou superfícies limpas e com baixa rugosidade, no entanto, a influência da presença de óxidos na formação das SAM precisava ser mais bem avaliada. Na literatura admite-se que sob diferentes mecanismos reacionais, moléculas de tióis podem ser quimioadsorvidas tanto sob superfícies de óxidos de ouro, quanto de ouro metálico. De modo a verificar qual condição gera SAM melhor empacotadas, foram calculadas as superfícies de recobrimento de monocamadas de MPA ( $\Gamma_{3MPA}$ ) formadas sobre superfícies pré-tratadas com M+C+etanol (onde etanol, significa 30 min. de imersão da superfície eletródica em etanol) e M+C. Encontra-se descrito na literatura que o álcool etílico reage com  $Au_2O_3$ , gerando acetaldeído, água e ouro metálico [68]. Com base nestes estudos é esperado que após 30 minutos todo óxido de ouro seja reduzido a ouro metálico.



**Figura 6.** Voltamograma cíclico de um eletrodo policristalino modificado com SAM de MPA em solução de KOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $20 \text{ mV s}^{-1}$ . A SAM foi formada a partir de uma solução etanólica de MPA a  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , sobre eletrodo de ouro que foi pré-tratado com M+C+E seguido de imersão em etanol por 30 min.

O voltamograma cíclico do eletrodo modificado com a SAM de MPA em solução de aerada de KOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $20 \text{ mVs}^{-1}$ , de  $0,1$  a  $-1,2 \text{ V}$  (vs. ECS) exibe dois picos de redução (Figura 6). A presença de dois picos de dessorção é motivo de especulações e controvérsias, porque os dois picos não podem ser simplesmente atribuídos a um fenômeno realizado via um elétron como é considerada a dessorção redutiva. A origem de um segundo pico é ora atribuída aos diferentes domínios cristalinos na superfície do ouro [21,139], ora a um rearranjo de aglomerados de tióis formados devido a uma indução de campo durante a dessorção destas espécies [86].

Na Figura 6 observa-se que a dessorção da SAM de MPA ocorre, durante o primeiro voltamograma no sentido catódico, gerando dois picos de redução. No entanto, após a segunda varredura, somente um dos picos (aquele localizado próximo a  $-1,0 \text{ V}$ ) permanece. Após o primeiro ciclo dessoritivo, ocorre a difusão das moléculas de tiol para longe da superfície eletródica, desta forma, há uma diminuição do número de tióis que são reabsorvidos quando se aplica potencial positivo sob o eletrodo. Este

comportamento é uma forte evidência de que o pico localizado em potenciais mais negativos é devido à clivagem da ligação S-Au, e pode ser utilizado para o cálculo da superfície de recobrimento da superfície do ouro pela mercaptana em questão.

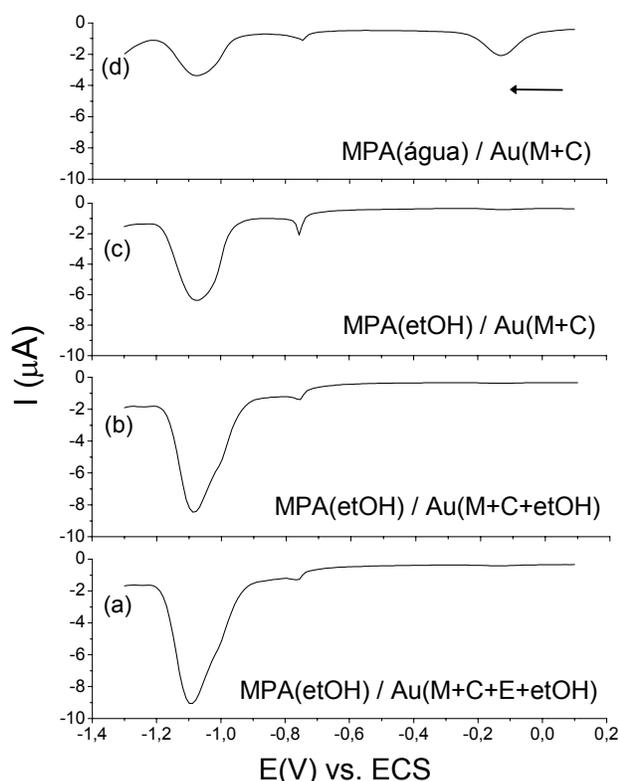
Imabayashi et al. [152] sugeriram que o potencial de pico ( $E_p$ ) de dessorção de monocamadas esparçadamente adsorvidas resultam em um deslocamento de  $E_p$  na direção de potenciais mais positivos. Com base neste estudo, sugere-se que provavelmente, o pico de redução que aparece em potenciais menos negativo exista devido à presença de moléculas de tióis fracamente ligadas à superfície eletródica, formando aglomerados de MPA que se instalam em regiões de defeitos da SAM ou sobre regiões com irregularidades sobre a superfície de ouro.

A partir dos voltamogramas cíclicos exibidos na Figura 7, e considerando a área sob o pico localizado próximo a  $-1.0$  V, foi calculada a  $\Gamma_{3MPA}$  que foi formada sobre superfície de ouro policristalino pré-tratada com o procedimento M+C+E+etanol que foi de  $\Gamma_{3MPA} = 1.51 \pm 0.25 \cdot 10^{-10}$  mol  $cm^2$  ( $n=3$ ). Sob condições similares de pré-tratamento eletródico e formação da SAM de MPA, foi realizado um experimento idêntico utilizando a voltametria de pulso diferencial. A razão de 1,2 foi encontrada entre as duas medidas de DPV e CV. Esta razão experimental foi verificada em todos os casos em que se mantiveram as condições experimentais similares, considerando um erro analítico da ordem de 5,0 %. Para os experimentos seguintes empregou-se a DPV devido a maior sensibilidade e precisão das medidas experimentais, mas os resultados quantitativos obtidos foram ajustados de acordo com a razão de sinal DPV/CV estimada.

A Figura 7 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial onde é possível observar, em potenciais positivos, o pico de redução do ouro antes do pico de dessorção da monocamada de 3MPA, entretanto, quando voltametria cíclica foi empregada, o pico de redução do ouro somente é visualizado, quando a SAM é removida da superfície. Já que a relação entre o recobrimento da superfície calculado por meio de DPV e CV é mantida, a falta de sensibilidade exprimida pela voltametria cíclica explica o fenômeno. Considerando novamente a informação contida na Figura 7 é possível fazer uma análise qualitativa do efeito bloqueador das SAM de 3MPA formadas sobre ouro policristalino que receberam diferentes pré-tratamentos, com base nas ondas redox do substrato metálico. Pode-se observar que a área sob o pico de

redução da SAM aumenta à medida que a área sob o pico de redução do ouro diminui e isto se deve ao efeito bloqueador da SAM.

Curvas de corrente vs. potencial que exibem a dessorção redutiva de monocamadas de 3MPA preparadas a partir de soluções etanolicas de 3MPA sobre substrato áureo reduzido e oxidado são mostradas na Figura 6. O  $\Gamma_{3MPA}$  sobre substratos reduzidos foi de  $1.26 (\pm 0.06) 10^{-10} \text{ mol cm}^2$ , enquanto o  $\Gamma_{3MPA}$  sobre o substrato oxidado foi aproximadamente 27 % menor ( $0.93 (\pm 0.05) 10^{-10} \text{ mol cm}^2$ ). Estes resultados revelam que sobre superfícies reduzidas de ouro monocamadas mais bem organizadas são formadas e isto pode ser justificado pelo fato de que quando a SAM é formada sobre superfícies contendo grandes quantidades de óxidos, uma determinada porção deste permanece trapeada entre a SAM e o substrato [67-68] e isto confere um impedimento aos monômeros da monocada que, por sua vez, não conseguem se organizar de forma ótima e formar uma SAM bem empacotada.



**Figura 7.** Voltamogramas de pulso diferencial de eletrodos de ouro modificados com SAM de MPA em solução de KOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $20 \text{ mVs}^{-1}$ , amplitude de pulso de  $25 \text{ mV}$ . O tempo de formação da SAM: 2 horas, em solução contendo  $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de MPA. Legenda: MPA(solvente da solução utilizada na formação da SAM)/Au (pré-tratamento).

Para avaliar o desempenho de superfícies de ouro eletroquimicamente reduzidas na formação de monocamadas de 3MPA, foi aplicado o potencial de  $-0,8$  V durante  $5000$  s [74] sob a superfície eletródica em meio de tampão fosfato  $0,1$  mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 em eletrodos de ouro que receberam o pré-tratamento (M+C). A SAM de 3MPA foi formada e desorvida do substrato metálico conforme descrito anteriormente. A superfície de recobrimento da SAM foi 20 % menor do que o recobrimento da SAM formada sob substrato reduzido com etanol, que previamente recebeu tratamento (M+C).

O solvente utilizado na preparação das soluções de tiol empregadas na etapa de formação da SAM é um importante aspecto a ser estudado para a obtenção de monocamadas melhor empacotadas. Como pode ser observado na Figura 7, quando a SAM de 3MPA foi formada valendo-se de soluções aquosas de 3MPA o  $\Gamma_{3MPA}$  foi de  $0,59 (\pm 0,48) 10^{-10}$  mol cm<sup>2</sup> (n = 6). A SAM formada nestas condições não exibe nenhum efeito passivador em relação ao substrato metálico, pois em potencial de  $-0,1$  V verifica-se nitidamente o pico de redução do ouro e o  $\Gamma_{3MPA}$  é 36 % menor que aquele calculado para SAM de 3MPA formadas a partir de soluções etanólicas de tiol sob substrato tratado de forma idêntica, devido a estes fatos pode-se concluir que a monocamada formada apresenta muitos defeitos. Estes resultados estão de acordo com a proposição de Ron and Rubinstein [68] que sugeriram a existência de uma competição entre a oxidação do tiol para a formação da SAM e a formação de óxido de ouro na superfície do substrato devido à presença de água.

Enquanto a quimiosorção de n-alcanotióis em ouro depende da afinidade de um adsorvente por um substrato, a auto-organização ocorre devido a interações intermoleculares estabelecidas entre as unidades formadoras da SAM [152]. Considerando que a auto-organização depende de fatores associados à rugosidade da superfície, a influencia do tratamento (E), que alisa a superfície do substrato, na formação de monocamadas de 3MPA foi estudado. Valendo-se de eletrodos de ouro que receberam o pré-tratamento (M+C+E) mais 30 min. de imersão da superfície eletródica em etanol, SAM de 3MPA foram construídas sobre este substrato e desorvidas conforme descrito anteriormente (Figura 7). O  $\Gamma_{3MPA}$  determinado nestas condições foi de  $1,47 (\pm 0,10) 10^{-10}$  mol cm<sup>2</sup> e, conforme previsto, sobre esta superfície menos rugosa a superfície de recobrimento determinada foi superior à encontrada em

condições similares usando o protocolo de tratamento (M+C) mais 30 min. de imersão em etanol (ao nível de 90 % de confiança).

## II.5 Conclusão

A limpeza e a preparação do substrato é de grande importância para estudos relacionados à fenômenos de superfície. A relevância do pré-tratamento de superfícies reside no fato de que estados superficiais providos por estes são, parcialmente, responsáveis pela atividade eletroquímica do substrato. A partir dos resultados apresentados neste trabalho fica claro que a área eletroquímica superficial muda sensivelmente, de acordo com o protocolo de limpeza e pré-tratamento aplicado à superfície. Mas, surpreendentemente, a maior resposta eletroquímica obtida com o composto sulfato de ferro amoniacal (II/III) sobre superfície de ouro oxidado não pode ser atribuída a um aumento na área superficial eletródica, mas ao tipo e quantidade de óxidos formados no substrato após a aplicação de determinado protocolo de pré-tratamento. A etapa química (C) parece ser importante à obtenção de superfícies de ouro ativadas.

O composto  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  é uma sonda molecular adequada para o estudo de defeitos no empacotamento de monocamadas formadas sobre ouro, no entanto, não é apropriada para a investigação do comportamento eletroquímico de superfícies de ouro que receberam diferentes pré-tratamentos.

O tratamento (E) diminui a rugosidade do eletrodo policristalino e permite a obtenção de superfícies mais reprodutíveis. As características químicas da superfície devem ser levadas em consideração.

Uma relação importante foi obtida comparando a dessorção redutiva de SAM de 3MPA sob ouro policristalino utilizando voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial. A partir do perfil de dessorção do tiol, foi sugerido que o pico localizado em potenciais mais negativos corresponde à clivagem da ligação enxofre-ouro.

O fenômeno da dessorção redutiva de tióis sobre substratos de ouro provê informações valiosas a respeito das características da SAM formada sobre substratos que receberam diferentes pré-tratamentos. O efeito da formação de SAM de tiol sobre o substrato metálico oxidado e reduzido foi estudado e monocamadas com maior

---

recobrimento de superfície foram obtidas sob substratos de ouro reduzidos por meio do contato com etanol.

A estratégia de pré-tratamento de superfícies que conduz à formação de monocamadas bem empacotadas sob eletrodos de ouro policristalino é aquela que proporciona a superfície mais limpa, com menor rugosidade e menor quantidade de óxidos sobre a superfície eletródica. Este objetivo foi alcançado por meio da aplicação do seguinte protocolo de pré-tratamento: (M+C+E) mais 30 min. de imersão da superfície eletródica em etanol.

## **CAPÍTULO III**

---

**DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR PREPARADO COM SAM DE  
MPA E COMPLEXO DE COBRE (II) COMO CATALISADOR  
BIOMIMETICO À *ASCORBATO OXIDASE* PARA A DETERMINAÇÃO DE  
ÁCIDO ASCORBICO EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

### III. 1 Resumo

Apresenta-se a construção e aplicação de um sensor biomimético para ácido ascórbico, tomando como base a química da cupro-enzima ascorbato oxidase, utilizando-se etilenodiamina e íons Cu(II) imobilizados sobre a superfície de um eletrodo de ouro policristalino modificado com uma SAM de ácido 3-mercaptopropiônico. Este trabalho demonstra que compostos simples podem substituir de forma satisfatória estruturas enzimáticas complexas, e serem usados como catalisadores biomiméticos na construção de sensores sensíveis e seletivos.

### III. 2 Introdução

A primeira descrição sobre o isolamento do ácido ascórbico foi feita por Albert Szent-Györgyi que, em 1928, o obteve a partir da glândula supra-renal de ratos, do suco de frutos cítricos e da páprica, chamando-a de ácido hexurônico [153]. Somente após 5 anos, a sua estrutura foi elucidada.

O ácido ascórbico (AsA) é uma biomolécula muito importante para o metabolismo dos seres vivos, e como tal, é intensivamente utilizada para fins terapêuticos. No cérebro, o ácido ascórbico está relacionado ao metabolismo da L-tirosina. No sistema imunológico, age na inibição da destruição oxidativa dos leucócitos, na resposta imunológica à alergias, age na metabolização da histamina. A deficiência de ácido ascórbico pode acarretar uma doença conhecida como escorbuto, que está associada à incapacidade do organismo de formar as fibras de colágeno apropriadamente, contudo, o excesso pode causar irritação gástrica, diarreia e litíase renal [154]. O ácido ascórbico é utilizado em larga escala como agente anti-oxidante em alimentos e bebidas [155].

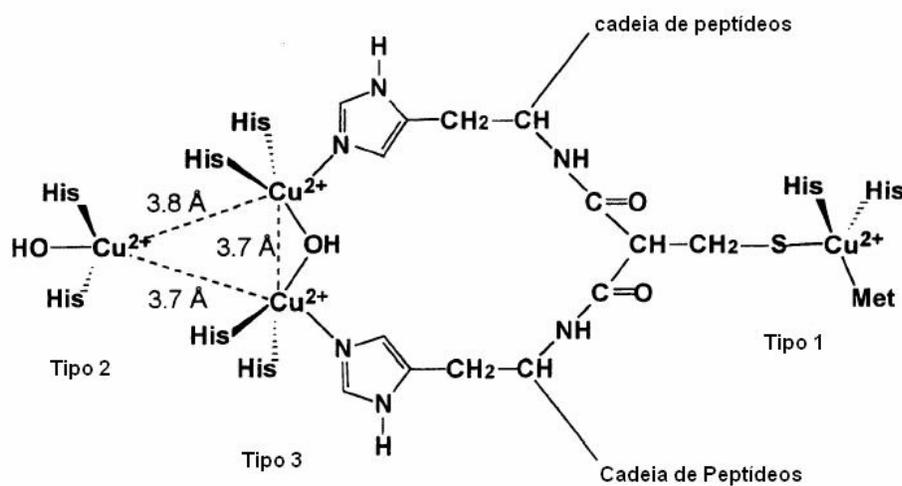
Existem muitas metodologias desenvolvidas para a determinação de ácido ascórbico nas mais diversas matrizes, no entanto as técnicas empregadas apresentam algumas limitações. A técnica espectrofotométrica com ou sem a adição de reagentes cromogênicos é a mais empregada, no entanto, amostras coloridas podem introduzir erros consideráveis na análise [156-160]. A titulação com 2,6 – diclorofenol-indofenol, 2,4 – dinitrofenolhidrazina ou iodo também são bastante empregadas [161-162], porém, amostras coloridas têm a análise interferida se o ponto final da titulação for visual e na titulação potenciométrica, a presença de substâncias redutoras na amostra acarreta

perda de seletividade, ainda cabe mencionar, a enorme quantidade de resíduos que é gerada durante esta análise. As determinações de ácido ascórbico por HPLC e CG apresentam o inconveniente de utilizarem reagentes e aparelhagem de alto custo, contudo, a análise é muito sensível e seletiva [155, 163-165]. A utilização de eletrodos modificados, íon-seletivos e potenciométricos para a determinação de ácido ascórbico ainda é incipiente e sofre influências de problemas de estabilidade das membranas e baixa seletividade [167-166]. Em geral, a utilização da voltametria [168-169] e amperometria [170] são restritas devido à influência de compostos presentes na amostra que respondem de forma similar na faixa de resposta da espécie química de interesse. Técnicas inusitadas tem sido empregadas para a análise de ácido ascórbico como espectroscopia de absorção atômica com chama [171], calorimetria [172], espectrofotometria enzimática [173], polarografia [174] etc.

O ácido ascórbico é estável na forma sólida, mas soluções aquosas são oxidadas rapidamente pelo oxigênio dissolvido, gerando ácido dehidroascórbico e água. Os fatores que influenciam significativamente na estabilidade de soluções de ácido ascórbico são pH, o oxigênio, a temperatura e a presença de íons metálicos, o solvente e a incidência de radiação eletromagnética [175]. Segundo estudos realizados por Fernandes et al. [175], a melhor maneira de preparar padrões e amostras de soluções aquosas de ácido L-ascórbico é em pH baixo ( $\text{pH} < 2$ ) devido à dificuldade de hidrólise do anel lactona, com água deionizada e no momento da análise.

A *ascorbato oxidase* (L-ascorbato: oxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.3) é membro da família das enzimas azuis que apresentam múltiplos centros de cobre ou complexos, como a lacase, a ceruloplasmina e outras enzimas menos conhecidas e caracterizadas. As oxidases azuis são das poucas enzimas que realizam a redução via quatro elétrons do oxigênio à água de forma simultânea à oxidação via um elétron de determinados substratos. A ascorbato oxidase é uma enzima encontrada em plantas [176-177] e bactérias [178]. É facilmente extraída e purificada de vegetais como a abobrinha (*Cucurbita pepo medullosa*) [179] ou pepino (*Cucumis sativus*) [180]. O papel fisiológico da ascorbato oxidase não é conhecido [181], no entanto, foi a primeira das cupro-oxidases a ser caracterizadas cristalograficamente, cada sub-unidade contém 552 resíduos de aminoácidos e apresenta forma globular. O sítio ativo contém um íon cobre do tipo 1 separado cerca de 12,5 Å de um cluster composto por três íons cobre

(Figura 8). Os ligantes do sítio tipo 1 (His, Cys, His, Met), bem como todas as outras características estruturais, são similares às proteínas que apresentam sítio cúprico tipo 1 [182-183]. O aglomerado formado por três íons cobre apresenta ao todo oito ligantes histidina, é composto por um par de íons cobre formando um sítio tipo 3, cada cobre sendo ligado a três histidinas, realizando uma ponte hidroxilo entre si, e um sítio cúprico tipo 2 composto por dois resíduos de histidina e um ligante hidroxilo terminal. A distância média entre os íons cobre do aglomerado é de 3.74 Å [184].



**Figura 8.** Vista esquemática da estrutura do sítio ativo da ascorbato oxidase [184].

Uma grande variedade de estruturas moleculares têm sido utilizadas a fim de representar o sítio ativo de inúmeras metaloproteínas. Muitas dessas estruturas são construídas a partir de indicações a respeito da estrutura que desejam imitar, outras respondem física ou quimicamente de forma similar, no entanto, ambos buscam os mesmos objetivos: compreender os mecanismos de ação e/ou superar as limitações encontradas na utilização de biocatalisadores.

O objetivo deste trabalho é a construção de um sensor biomimético a *ascorbato oxidase* para a detecção de ácido ascórbico em amostras de interesse farmacológico.

### **III. 3 Metodologia experimental**

#### **III.3.1 Reagentes e preparo de soluções**

Somente reagentes de grau P. A. foram usados para preparar as soluções. As soluções aquosas foram preparadas com água deionizada (Mili-Q Water Purifier System, Millipore Inc., USA) com resistividade  $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ . Toda vidraria utilizada foi limpa em  $\text{HNO}_3$  10% (v/v) e água deionizada a fim de evitar contaminações. Abaixo estão descritos os reagentes utilizados, bem como sua procedência: Acetato de sódio, Synth; Ácido Sulfúrico, Synth; Cloreto de cobre, Vetec; Cloreto de potássio, Synth; EDC, Aldrich; Etilenodiamina, Merck; Fosfato de sódio monobásico e dibásico, Synth; Ácido fosfórico, Synth; HEPES, Sigma; Hidróxido de Sódio, Vetec; MPA (pureza  $> 99 \%$ ), Sigma; Nitrato de potássio, Synth; Nitrogênio, Air Liquid Brasil Ltda; Peróxido de Hidrogênio, 30 v, Merck; PIPES, Sigma; Sulfato de cobre pentahidratado, Carlo Erba; Suspensão aquosa de alumina (0,3 e 0,5-mm), Fortel; TRIS, Sigma; Ácido acético, Synth.

##### **III.3.1.1 Soluções tampão**

As soluções tampão de fosfato e acetato foram preparadas utilizando misturas adequadas do ácido fraco e do sal do ácido fraco correspondente, a fim de obter o pH desejado. As soluções tampão de PIPES, HEPES e TRIS foram preparadas na concentração determinada e o pH da solução foi ajustado posteriormente com a adição de solução diluída de hidróxido de sódio ou ácido sulfúrico.

##### **III.3.2 Solução de MPA**

Foi preparada uma solução alcoólica de MPA  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  adicionando-se  $8,7 \mu\text{L}$  do composto tiolado em  $10,0 \text{ mL}$  de álcool etílico absoluto. Esta solução sempre foi preparada imediatamente antes do uso.

### III.3.1.3 Solução de ácido ascórbico

Para o preparo da solução estoque, pesou-se 17,60 mg de ácido ascórbico que foram dissolvidos em 10,0 mL de água. Posteriormente, para preparar uma solução  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido ascórbico foram tomados 500  $\mu\text{L}$  da solução estoque, que foram diluídos em 50,0 mL de água. O ácido ascórbico apresenta alta instabilidade em meio aquoso devido à presença de oxigênio dissolvido no solvente, portanto as soluções foram preparadas imediatamente antes do uso.

### III.3.1.4 Solução de EDC

Para o preparo de soluções a  $15,0 \text{ mg mL}^{-1}$  e a  $7,5 \text{ mg mL}^{-1}$  de EDC foram transferidos, respectivamente, 150,00 mg e 75,00 mg de EDC para balões volumétricos de 10,0 mL e os volumes foram ajustados com solução tampão de acetato de sódio  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,8. Devido a grande probabilidade de que o composto em questão se desproporcione com o tempo, esta solução sempre foi preparada imediatamente antes do uso.

### III.3.1.5 Solução de sulfato de cobre

Para o preparo da solução  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$  foram diluídos 6,24 mg de sulfato de cobre pentahidratado em 25,0 mL de água.

Para o preparo da solução  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$  foram diluídos 0,62 mg de sulfato de cobre pentahidratado em 25,0 mL de água.

### III.3.1.6 Solução de ligante etilenodiamina

Prepararam-se duas soluções aquosas de concentração distinta em etilenodiamina:  $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $25,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , foram adicionados 16,7  $\mu\text{L}$  e 41,7  $\mu\text{L}$  de etilenodiamina, respectivamente, em balões volumétricos de 25,0 mL e o volume dos balões volumétricos foram ajustados com água. O pH das soluções foi corrigido para 6,0 ou 8,0 de acordo com o procedimento experimental por meio da adição de ácido sulfúrico.

### III.3.1.7 Solução piranha ácida ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ concentrado + $\text{H}_2\text{O}_2$ 30 %, (3:1, v/v))

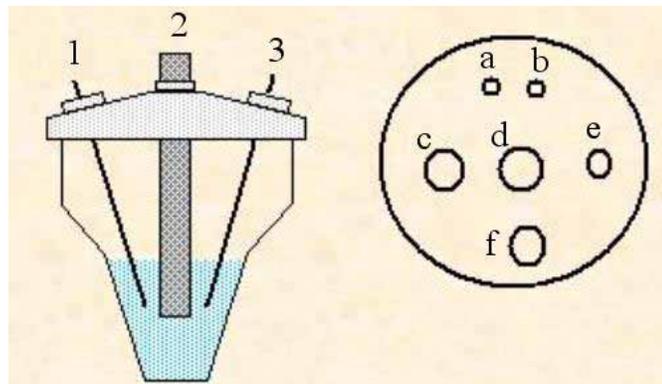
Esta solução foi preparada em um béquer de 10,0 mL misturando 3,0 mL de ácido sulfúrico, seguido da adição de 1,0 mL de peróxido de hidrogênio. Esta mistura é exotérmica e deve ser cuidadosamente preparada.

### III.3.2 Equipamentos

Foi utilizada uma célula eletroquímica de vidro com capacidade de 5,0 mL composta por três eletrodos, sendo o eletrodo de trabalho, um eletrodo de ouro (99,99 %, Metrohm 6.1204.020, Suécia); o eletrodo auxiliar, um fio helicoidal de platina; e um eletrodo de calomelano saturado (ECS) como eletrodo de referência (Figura 9).

O eletrodo de trabalho era formado de um cilindro de ouro policristalino, revestido em Teflon<sup>®</sup> com área geométrica de  $0,071 \text{ cm}^2$ . As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato Autolab PGSTAT30 utilizando o software GPES 4.9 (Eco Chemie BV, Holanda).

O banho de ultra-som utilizado era da marca UNIQUE T-1425, apresentava frequência de 25 kHz e um pico máximo de potencia de 54 W. Uma balança analítica Sartorius BP 211D, de 5 casas decimais, foi utilizada para as tomadas de massa dos compostos químicos.



**Figura 9.** Esquema de célula de três eletrodos utilizada nas medidas eletroquímicas.

a = entrada de ar; b = saída de ar; c = eletrodo de referência – ECS (1); d = eletrodo de trabalho (2); e = adição de soluções com micropipeta; f = eletrodo auxiliar – espiral de platina (3).

### **III.3.3 Procedimento experimental**

#### **III.3.3.1 Pré-tratamento do eletrodo de ouro policristalino**

Esta etapa do trabalho foi extensivamente explorada com a finalidade de se obter uma superfície do eletrodo de ouro não somente limpa, mas realmente adequada à imobilização da monocamada auto-organizada. As condições de pré-tratamento dos eletrodos de ouro utilizados no presente trabalho foram determinadas de acordo com os resultados relatados e discutidos mais elaboradamente no Capítulo II desta dissertação. O eletrodo de ouro policristalino foi polido com suspensão aquosa de alumina (0,3 e 0,5·mm), posteriormente, imerso por 10 min em solução piranha recém-preparada, em seguida foi realizada a varredura de potencial em solução 0,5 mol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mV s<sup>-1</sup>, entre + 0,1 e + 1,4 V por meio de voltametria cíclica durante 25 ciclos e, por fim, o eletrodo foi imerso em etanol absoluto durante 30 min.

### **III. 3.4 Construção do Sensor Biomimético**

#### **III.3.4.1 Formação da SAM de MPA sobre eletrodos de ouro**

Após o preparo da superfície do eletrodo de ouro, este foi lavado abundantemente em álcool etílico e imediatamente imerso em solução etanólica a 10,0 mmol L<sup>-1</sup> de MPA durante 1 hora. Após este período, o eletrodo de ouro foi removido da solução e lavado com álcool etílico absoluto e seco em atmosfera de nitrogênio. Procedia-se, então, a etapa seguinte de modificação.

#### **III.3.4.2 Imobilização do ligante etilenodiamina sobre a SAM de MPA**

Após a formação da SAM de MPA sobre a superfície do eletrodo de ouro, este foi imerso por 1 hora em solução de EDC que foi mantida sob agitação constante. Após este período, o eletrodo de ouro foi removido da solução, lavado com água e seco em atmosfera de nitrogênio.

Em seguida, o eletrodo foi imerso por 1 hora em solução aquosa de etilenodiamina, a seguir lavado em água e seco em atmosfera de nitrogênio.

### III.3.4.3 Complexação de íons cobre

Considerando que grande quantidade de ligantes etilenodiamina que foram imobilizados estão com um grupo  $\text{-NH}_2$  livre, após a imersão do eletrodo em solução contendo cobre, ocorrerá a complexação de íons cobre na superfície do eletrodo quimicamente modificado. Supõe-se, então, que o íon cobre (II) seja complexado a partir das interações com grupos  $\text{-NH}_2$  de ligantes etilenodiamina vizinhos.

### III.3.4.4. Acondicionamento do sensor construído

O eletrodo quimicamente modificado foi mantido por 1 minuto em tampão fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 com o objetivo de retirar a fração de íons cobre que estavam fracamente adsorvidos no eletrodo. O eletrodo foi lavado em água e então, realizaram-se os estudos eletroquímicos.

### III.3.4.5. Otimização das concentrações das soluções utilizadas na construção do sensor

Foi realizado um planejamento  $2^3$  sem replicatas (A) para estudar a influência da concentração das soluções utilizadas (concentração de EDC, etilenodiamina e sulfato de cobre) na variação de potencial de pico ( $\Delta E_p$ ), corrente de pico anódico ( $I_{pa}$ ) e catódico ( $I_{pc}$ ) e estabilidade sensor obtido considerando a diferença de corrente anódica entre a 2ª e 10ª varredura realizada com o sensor em relação ao processo faradaico relacionado com o cobre complexado na superfície do EQM. Os fatores e os níveis do planejamento fatorial A são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Dados do planejamento fatorial A.

Fatores	Níveis	
	-	+
1. [EDC], $\text{mg mL}^{-1}$	7,5	15,0
2. [Etilenodiamina], $\text{mmol L}^{-1}$	10,0	25,0
3. $[\text{CuSO}_4]$ , $\mu\text{mol L}^{-1}$	50,0	500

### III.3.4.6 Otimização do pH das soluções utilizadas na construção do sensor

Foi realizado um planejamento  $2^2$  sem replicatas (B) para estudar a influência da concentração hidrogeniônica das soluções de etilenodiamina e sulfato de cobre na variação de corrente de pico anódico e catódico ( $\Delta E_p$ ), corrente de pico anódico ( $I_a$ ) e catódico ( $I_c$ ) e estabilidade sensor obtido considerando a diferença de corrente anódica entre a 2ª e 10ª varredura realizada com o sensor em relação ao processo faradaico correspondente ao cobre complexado na superfície do EQM. Os fatores e os níveis do planejamento fatorial B são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Dados do planejamento fatorial B

Fatores	Níveis	
	–	+
1. [CuSO <sub>4</sub> ], pH	5,0	6,0
2. [Etilenodiamina], pH	6,0	8,0

### III.3.5 Caracterização eletroquímica do sensor biomimético

#### III.3.5.1 Dessorção redutiva da SAM de MPA como forma de Caracterização do Sensor

O arranjo experimental consistiu em montar e dessorver redutivamente da superfície do eletrodo de ouro as SAMs quimicamente modificadas dependendo do estágio de formação do sensor. A dessorção redutiva foi realizada em solução aquosa 0,1 M KOH através da varredura de potencial de +0,1 V a – 1,4 V, no sentido catódico 20 mV s<sup>-1</sup>. A solução de KOH foi desoxigenada através da purga com gás nitrogênio durante 15 minutos previamente à realização do experimento.

#### III.3.5.2 Avaliação do potencial formal do sensor proposto e de diferentes EQMs

Foi imobilizado através de atração eletrostática o complexo cloreto de dietilenodiamincobre (II) sobre a superfície de eletrodos de ouro modificados com SAM de MPA com a finalidade de se observar o potencial formal ( $E^0$ ) da espécie imobilizada. Foi realizado o mesmo procedimento para o complexo formado entre a SAM de MPA e cobre (II) e para o complexo formado no sensor proposto.

---

As medidas voltamétricas foram realizadas em tampão PIPES 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0, entre os potenciais de 0 e 300 mV, a 10 mV s<sup>-1</sup>.

### III.3.5.3 Efeito do eletrólito de suporte

Foram avaliados os efeitos dos eletrólitos KCl, KNO<sub>3</sub>, HEPES, PIPES e TRIS na resposta eletroquímica do sensor estudado. Foram preparadas soluções aquosas dos eletrólitos e dos tampões descritos acima na concentração de 0,1 mol L<sup>-1</sup>, e o pH das soluções foi ajustado para 7,0. As medidas voltamétricas foram realizadas entre os potenciais de 0 e 300 mV, a 10 mV s<sup>-1</sup>.

### III.3.5.4 Efeito do pH da solução de eletrólito de suporte

Foi avaliado o efeito que diferentes potenciais hidrogeniônicos exercem na resposta eletroquímica do sensor estudado. Foi preparado 500 mL de uma solução aquosa de PIPES 0,1 mol L<sup>-1</sup> que foi igualmente dividida em 6 porções. Cada alíquota recebeu o ajuste para um valor único de pH entre os seguintes: 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0. As medidas voltamétricas foram realizadas entre os potenciais de 0 e 300 mV, a 10 mV s<sup>-1</sup>.

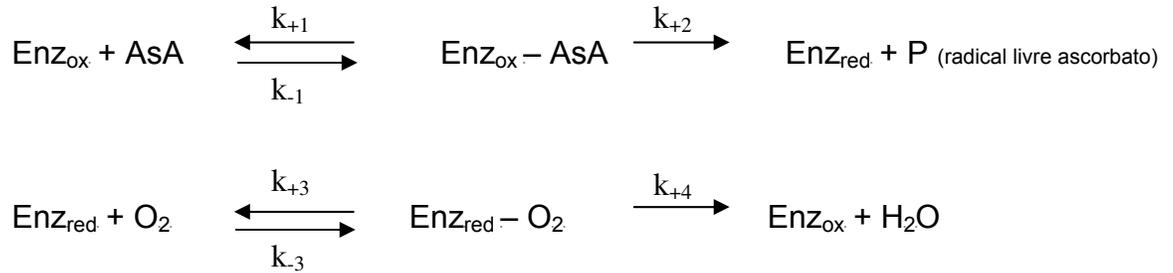
### III.3.5.5 Efeito da concentração de eletrólito de suporte

Para estudar o efeito da concentração de eletrólito no comportamento eletroquímico do sensor estudado foram preparadas soluções de tampão PIPES nas concentrações de 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 e 0,001 mol L<sup>-1</sup>. O pH das soluções foi ajustado para 7,0. As medidas voltamétricas foram realizadas entre os potenciais de 0 e 300 mV, a 10 mV s<sup>-1</sup>.

### III.3.5.6 Efeito Catalítico

O sensor foi testado em relação ao seu potencial catalítico frente a alguns compostos fenólicos como catecol, orto-cresol, salicilato de sódio, 2-clorofenol e 2-aminofenol. Sabe-se que a ascorbato oxidase apresenta dois sítios de cobre em seu

sítio ativo, portanto, testou-se ainda o efeito catalítico do sensor estudado para a oxidação de ácido ascórbico. A enzima ascorbato oxidase catalisa a oxidação aeróbica de ácido ascórbico de acordo com o seguinte mecanismo reacional:



Onde  $\text{Enz}_{\text{ox}}$  e  $\text{Enz}_{\text{red}}$  representam as formas oxidada e reduzida da enzima, respectivamente.

Para testar o efeito catalítico do sensor foram preparadas soluções aquosas dos compostos fenólicos citados acima e também de ácido ascórbico na concentração de  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

### III.3.5.7 Curva analítica para ácido ascórbico

Foi utilizada a técnica cronoamperométrica para construir uma curva analítica para ácido ascórbico utilizando o sensor em estudo. Foram realizados incrementos de 50 nanomol de ácido ascórbico em 5,0 mL de solução de PIPES  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. Para a construção da curva analítica foi realizado correção de volume para os cálculos de concentração da espécie química de interesse em solução.

### III.3.5.8 Método de referência: titulação iodométrica

A confiabilidade das determinações amperométricas de ácido ascórbico em preparações farmacêuticas foi verificada usando o procedimento iodométrico descrito pela farmacopéia (USP) [161]. Para este fim foi preparado uma solução  $0,015 \text{ mol L}^{-1}$  de iodeto, a partir de iodeto e iodato de potássio, sendo o iodato de potássio padrão primário, este não foi padronizado. Foi utilizada solução de amido como indicador visual do ponto de viragem.

A determinação amperométrica de ácido ascórbico foi realizada por meio do método da adição de padrão, além da amostra foram adicionados mais três volumes de solução conhecida de padrão de ácido ascórbico (adições de  $n$  mols de AsA). A

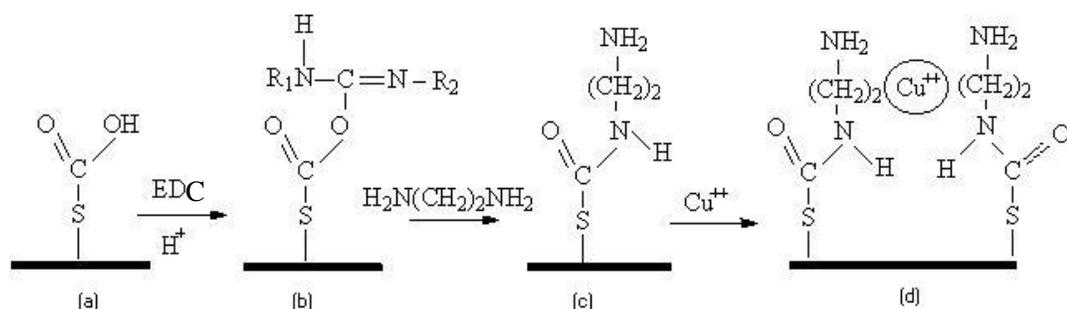
amostra foi diluída completamente em meio aquoso, pH corrigido para 2,0 com ácido sulfúrico diluído, e mantida sob proteção da luz e analisada imediatamente após esta etapa de preparo de amostra.

### III.3.5.9 Teste de efeito catalítico da superfície biomimética sobre solução de ácido ascórbico

Uma superfície de ouro foi quimicamente modificada com SAM MPA+etilenodiamina+Cu(II), conforme comumente se prepara o sensor, e este foi imerso em 10,0 mL de solução de ácido ascórbico, contudo, sem a aplicação de potencial eletroquímico. O mesmo procedimento foi realizado com um eletrodo de ouro limpo. Após 15 minutos foi realizado o doseamento do teor de AsA em um volume de 5,0 mL de cada solução de AsA em contato com os eletrodos e ainda o doseamento de uma solução de ácido ascórbico que foi disposta como controle.

## III.4. Resultado e discussões

O processo de modificação do eletrodo de ouro pode ser representado pelo esquema ilustrado na Figura 10.



**Figura 10.** Representação esquemática das etapas de construção do sensor biomimético proposto: (a) Formação da SAM; (b) Ativação dos grupos carboxílicos da SAM; (c) Reação com Etilenodiamina que resulta na formação de uma ligação amida; (d) Reação de complexação de íons cobre pelos ligantes imobilizados sobre a SAM. Os grupos R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> representam um radical etila e o grupo  $-\text{[(CH}_2\text{)}_3\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{]HCl}$ , respectivamente.

O reagente EDC é um derivado hidrossolúvel da carbodiimida, composto muito utilizado na catálise da formação de ligações amida entre ácidos carboxílicos e aminas. A construção de biossensores enzimáticos com base em monocamadas auto-organizadas utilizam deste mesmo esquema reacional para realizar a imobilização das enzimas de interesse [185, 8].

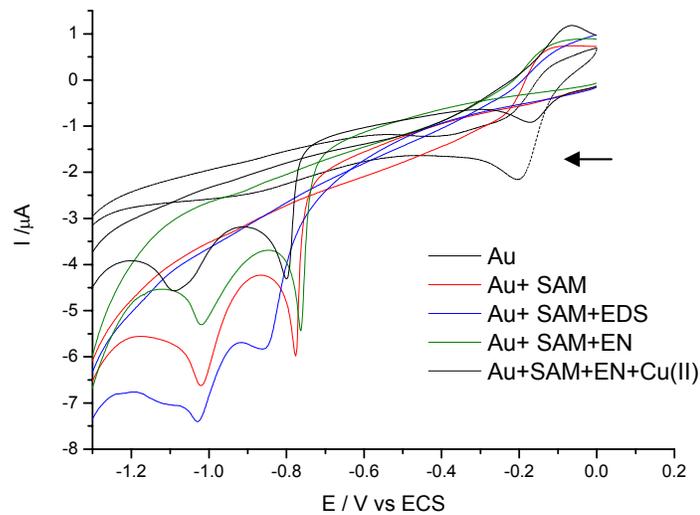
Foi descrito na literatura a formação de um complexo de cobre entre a SAM de MPA e cobre (II) [186], portanto, torna-se necessário confirmar a obtenção do EQM proposto. Para tanto, foram obtidos os valores de potencial formal ( $E^{\circ}$ ) para o complexo formado entre MPA e cobre, para o complexo  $[\text{Cu}(\text{en})_2]\text{Cl}_2$  imobilizado sobre a superfície de um EQM com SAM de MPA e para o complexo formado no sensor proposto. O potencial formal é característico da espécie eletroativa e é uma forma ajustada do potencial padrão, pois varia de acordo com os coeficientes de atividade das espécies presentes na solução de medida. Como pode ser verificado na Tabela 3, devido às diferenças nos valores de  $E^{\circ}$  para cada sistema, há indícios de que o sensor em estudo esteja complexando íons cobre de forma diferente daquela existente nos dois sistemas utilizados para a comparação.

**Tabela 3.** Valores de  $E^{\circ}$  para diferentes complexos formados na superfície de eletrodos de ouro policristalino. Medidas Voltamétricas realizadas em tampão PIPES 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 a 10 mV s<sup>-1</sup>.

Sistema	$E^{\circ}$ / mV	Desvio Padrão relativo
MPA + Cu(II)	145	13
MPA + $[\text{Cu}(\text{en})_2]\text{Cl}_2$	117	4
Sensor proposto	166	3

Uma segunda tentativa de caracterizar o EQM proposto foi realizada valendo-se da dessorção redutiva de monocamadas auto-organizadas. O potencial de dessorção de monocamadas auto-organizadas de tióis sobre o ouro depende, dentre outros fatores, do tamanho da cadeia carbônica e dos grupos funcionais terminais do tiol imobilizado, portanto, supõem-se que de acordo com o tipo de modificação que a monocamada auto-organizada receber, serão verificados diferentes potenciais de pico

de dessorção redutiva. Este fato pode ser utilizado para verificar algumas propriedades da modificação.



**Figura 11.** Dessorção redutiva de monocamadas de MPA que passaram por modificações químicas (ou não) durante as etapas de construção do sensor em estudo. Foi realizada uma varredura de potencial sobre o eletrodo de ouro limpo para efeito de comparação. Voltamogramas cíclicos realizados em solução de KOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

De acordo com Imabayashi *et al.* [152], o deslocamento do potencial do pico de dessorção redutiva para valores mais negativos é característico do aumento da estabilização de uma monocamada em relação à interface estudada. Considerando os picos de dessorção redutiva da SAM de MPA sem modificações como referência, observa-se um deslocamento catódico dos potenciais dos picos de dessorção da SAM quando íons cobre são complexados pelo sistema em estudo.

A interpretação teórica a respeito da presença de dois picos de dessorção redutiva de tióis funcionalizados sobre eletrodos de ouro policristalino ainda está sendo investigada. Na literatura alguns artigos iniciam a discussão, porém existem poucas informações conclusivas. O pico de dessorção menos negativo, considerado, na maioria dos casos, originado pela dessorção de monômeros da SAM que estão fracamente ligados sobre a superfície de ouro, mostra tendências de estabilização quando a SAM

de MPA é modificada com EDC e quando cobre é complexado pelo sistema, mas em contrapartida, é verificada uma menor estabilização do sistema quando ocorre a ligação do grupo ácido da SAM com a amina do ligante etilenodiamina (Figura 11). É possível que possam ocorrer ligações de um mesmo ligante etilenodiamina com dois grupos carboxílicos adjacentes da SAM, isto explicaria, em parte, esta desestabilização observada.

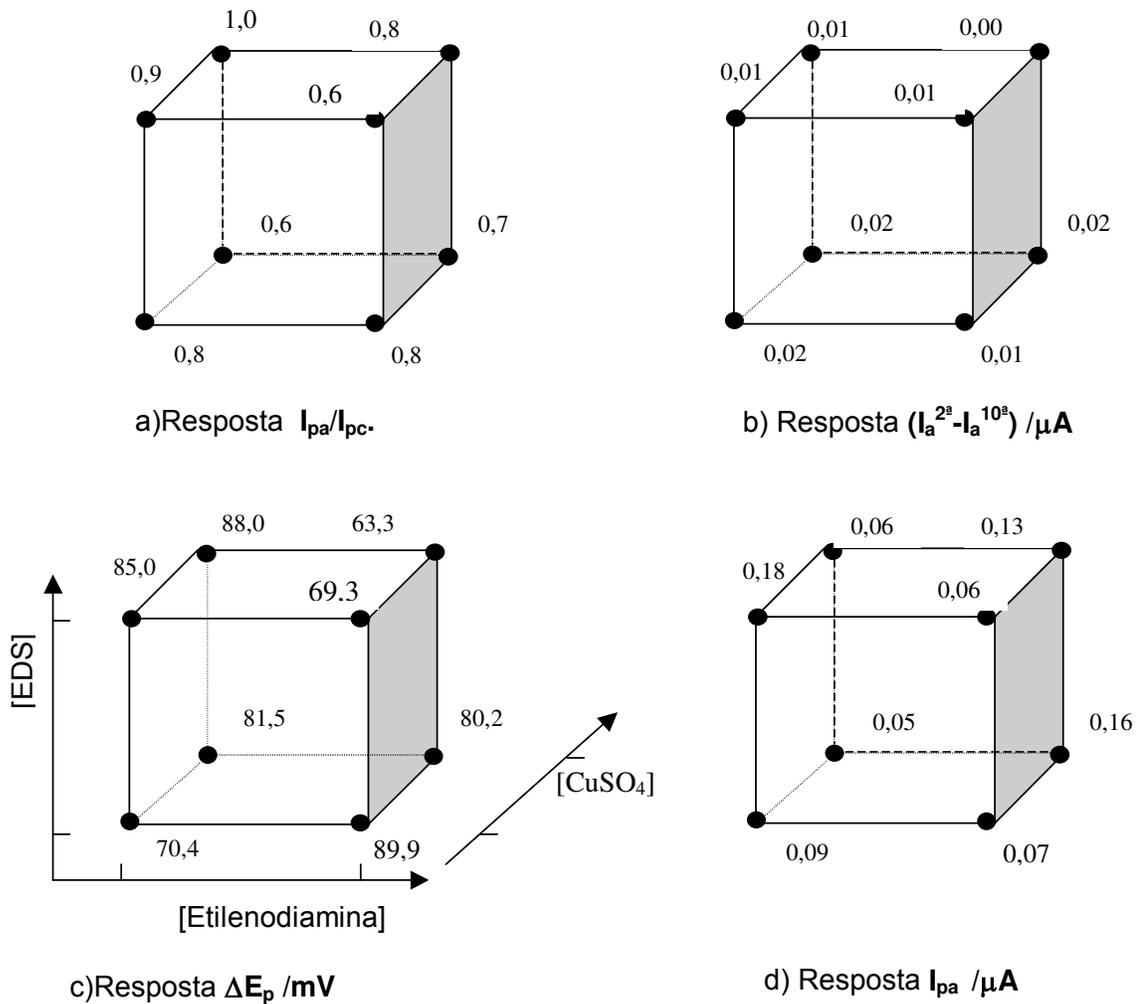
**Tabela 4.** Valores de resposta de  $\Delta E_p$ ,  $I_{pa}$ ,  $I_{pa}/I_{pc}$  e  $(I_a^{2a} - I_a^{10a})$  para o planejamento fatorial  $2^3$ . Condições: tampão PIPES  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

Ensaio	1	2	3	$\Delta E_p / \text{mV}$	$I_{pa} / \mu\text{A}$	$I_{pa} / I_{pc}$	$(I_a^{2a} - I_a^{10a}) / \mu\text{A}$
A1	-	-	-	70,4	0,095	0,8	0,024
A2	+	-	-	89,9	0,072	0,8	0,008
A3	-	+	-	85,0	0,176	0,9	0,015
A4	+	+	-	69,3	0,058	0,6	0,011
A5	-	-	+	80,2	0,053	0,6	0,015
A6	+	-	+	81,5	0,1638	1,0	0,024
A7	-	+	+	88,0	0,058	0,7	0,009
A8	+	+	+	63,3	0,134	0,8	0,000

A verificação das condições ótimas de construção do sensor proposto foi realizada através de dois planejamentos fatoriais. Por meio de um planejamento fatorial  $2^3$  sem replicatas avaliou-se o efeito da concentração dos reagentes e por meio de um planejamento  $2^2$  sem replicatas determinou-se o pH mais adequado das soluções de etilenodiamina e sulfato de cobre que foram utilizados na construção do EQM.

Os resultados obtidos com os estudos utilizando planejamento fatorial podem ser observados nas Tabelas 4 e 5 e nas Figuras 12 e 13.

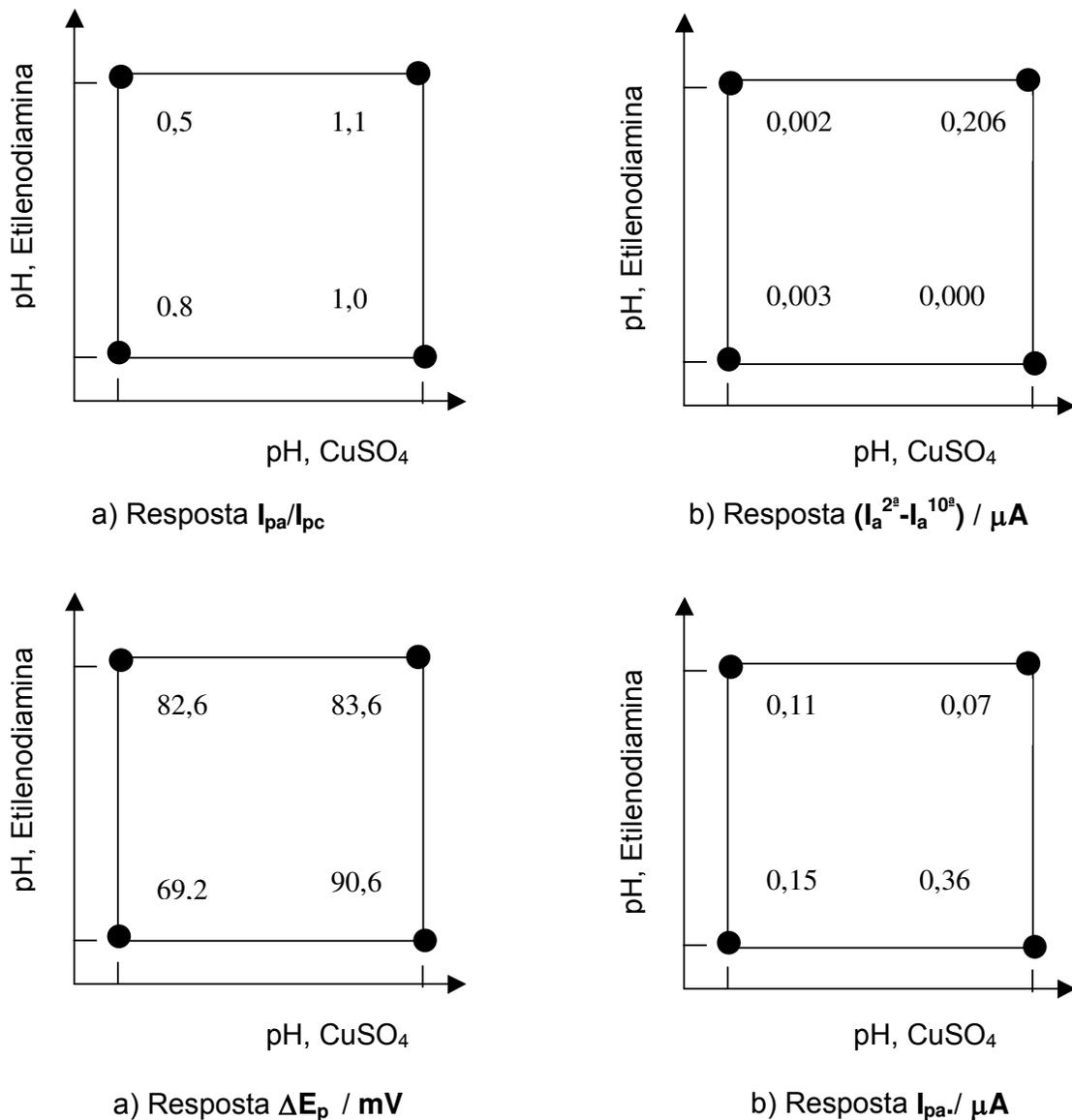
A análise dos valores de resposta é facilitada pelo uso de diagramas. No planejamento fatorial A, se somente os valores de resposta para  $\Delta E_p$  fossem considerados, as melhores condições estariam localizadas nos níveis superiores de concentração para os fatores 1 e 2 (ensaios A<sub>4</sub> e A<sub>8</sub>, respectivamente).



**Figura 12.** Gráficos cúbicos das respostas  $\Delta E_p$ ,  $I_{pa}$ ,  $I_{pa}/I_{pc}$  e  $(I_a^{2a} - I_a^{10a})$  para o planejamento fatorial  $2^3$ . A Figura (c) indica a posição dos fatores.

**Tabela 5.** Valores de resposta de  $\Delta E_p$ ,  $I_{pa}$ ,  $I_{pa}/I_{pc}$  e  $(I_a^{2a} - I_a^{10a})$  para o planejamento fatorial  $2^2$ . Condições: tampão PIPES  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

	1	2	$\Delta E_p / mV$	$I_{pa} / \mu A$	$I_{pa} / I_{pc}$	$(I_a^{2a} - I_a^{10a}) / \mu A$
Ensaio						
<b>A1</b>	-	-	69,2	0,1516	0,803	0,003
<b>A2</b>	+	-	90,6	0,3553	0,975	0,000
<b>A3</b>	-	+	82,6	0,1058	0,525	0,002
<b>A4</b>	+	+	83,6	0,0721	1,106	0,206

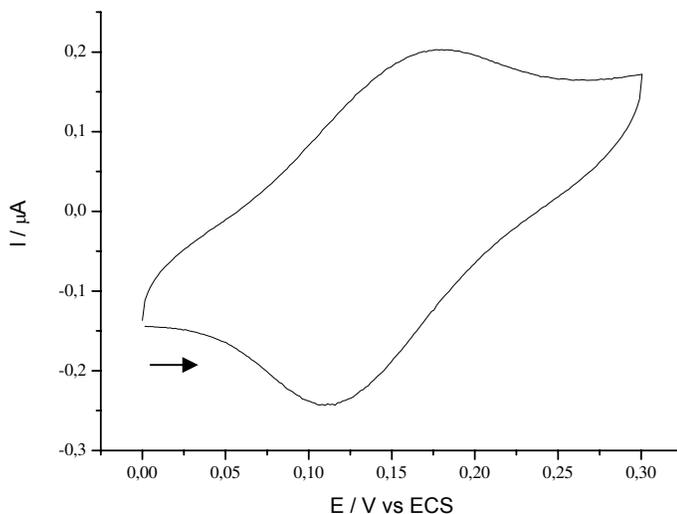


**Figura 13.** Gráficos das respostas  $\Delta E_p$ ,  $I_{pa}$ ,  $I_{pa}/I_{pc}$  e  $(I_a^{2a} - I_a^{10a})$  para o planejamento fatorial  $2^2$ .

Entre os ensaios  $A_4$  e  $A_8$  aquele que apresentou maior sinais de  $I_{pa}$ ,  $I_{pa}/I_{pc}$  e melhor estabilidade  $(I_a^{2a} - I_a^{10a})$  foi o ensaio  $A_8$ . Desta forma, foi estabelecido que a condição mais adequada, dentre aquelas estudadas, foi aquela que compreende os níveis + + + para os três fatores.

O ensaio  $A_2$  do fatorial  $2^2$  mostrou melhor resposta em relação a todos os fatores com exceção da resposta para  $\Delta E_p$ , portanto, mesmo com este ponto negativo, o ensaio + - foi considerado como a condição mais adequada a ser seguida.

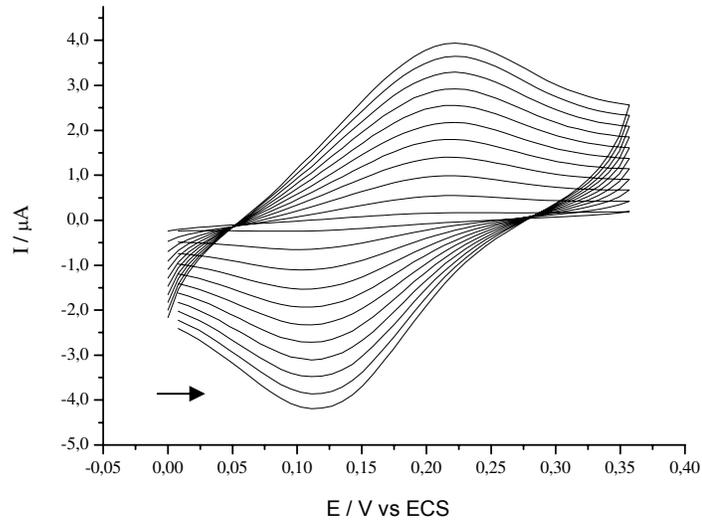
As análises experimentais indicaram que o sensor deve ser construído com solução de EDC na concentração de  $15,0 \text{ mg mL}^{-1}$ , solução de etilenodiamina  $25 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 6,0 e solução aquosa de sulfato de cobre  $500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , pH 6,0.



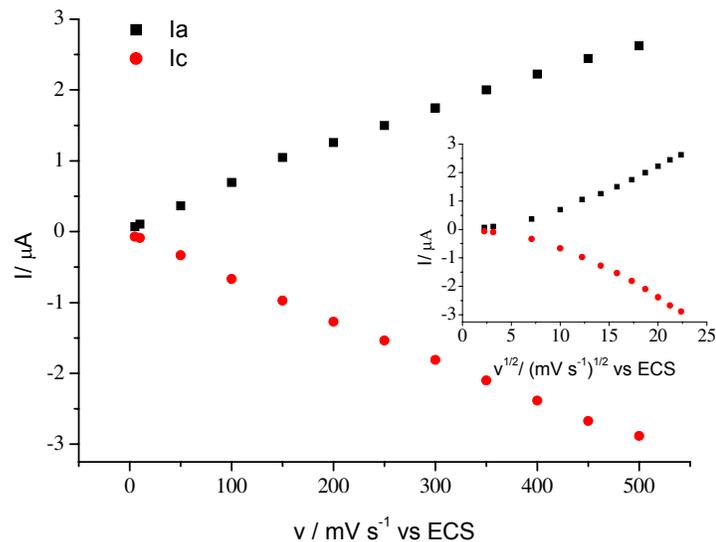
**Figura 14.** Voltamograma cíclico do perfil do EQM estudado nas condições otimizadas. Tampão Pipes  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

A Figura 14 mostra o voltamograma cíclico do complexo formado entre os ligantes etilenodiamina imobilizados sobre a SAM de MPA e o íon cobre (II) registrado a  $10 \text{ mV s}^{-1}$  em tampão Pipes  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. As Figuras 22 e 23 apresentam o comportamento da corrente anódica e catódica em função da velocidade de varredura na faixa de 5 a  $500 \text{ mV s}^{-1}$ . O gráfico de  $I_{pa}$  e  $I_{pc}$  em função da velocidade de varredura revela um comportamento linear, isto se remete ao comportamento de espécies eletroativas imobilizadas na superfície de eletrodos, como é o caso do presente estudo.

A Figura 16 traz o gráfico de  $I_{pa}$  e  $I_{pc}$  em função da raiz da velocidade de varredura e mostra um comportamento não linear, foi inserido como informação complementar, pois confirma o fato de que existem espécies imobilizadas na superfície do EQM.



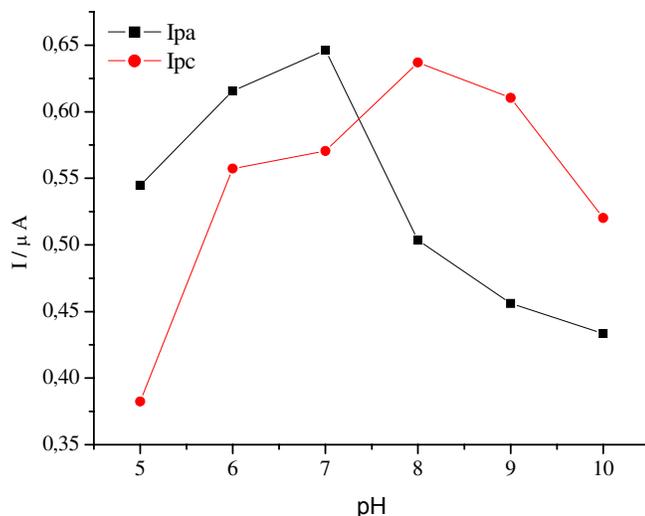
**Figura 15.** Voltamograma cíclico do perfil do EQM estudado em diferentes velocidades de varredura. Tampão PIPES 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0.



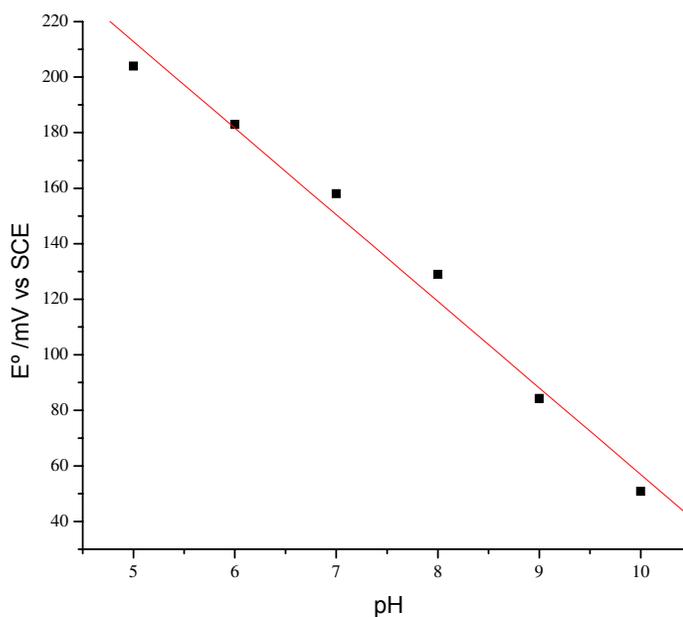
**Figura 16.** Gráfico da Corrente de pico anódica e catódica versus a velocidade de varredura. Tampão PIPES 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0. Figura inserida: gráfico de  $I_{pa}$  e  $I_{pc}$  em função da raiz da velocidade de varredura, Tampão PIPES 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0.

O efeito do pH da solução na performance do eletrodo de ouro modificado é mostrado na Figura 17. É observado que existe uma faixa ótima de pH (entre 7,0 e 8,0) onde o eletrodo apresenta bom sinal eletroquímico. Outro fato observado é que a

corrente anódica apresenta maiores sinais de corrente em condições ácidas, em contrapartida, a corrente catódica apresenta maiores sinais de corrente em condições básicas.



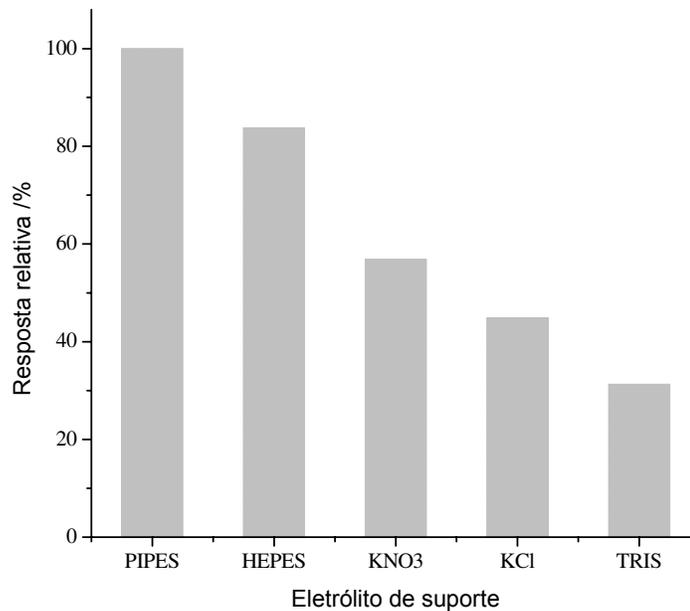
**Figura 17.** Resposta do EQM em estudo em relação ao pH da solução. Tampão PIPES  $0,1\text{mol L}^{-1}$ , a  $10\text{ mV s}^{-1}$ . O sinal da corrente anódica foi desconsiderado com a finalidade de facilitar a compreensão.



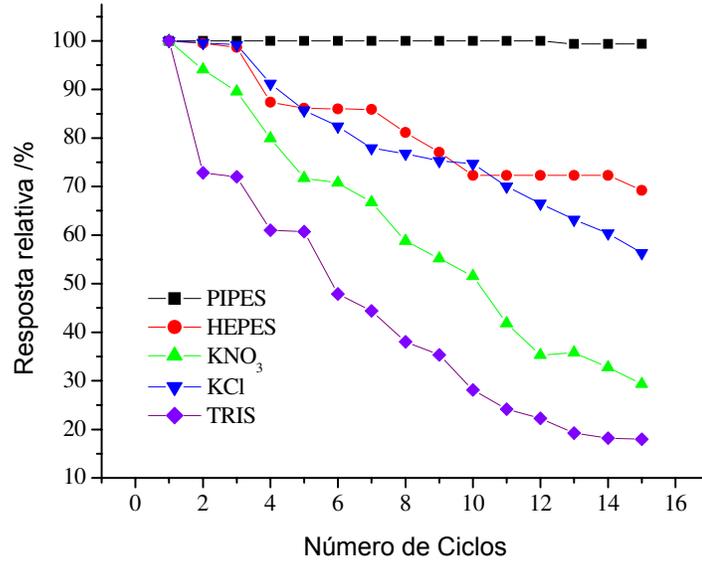
**Figura 18.** Influência do pH da solução no potencial formal ( $E^{\circ}$ ) para o EQM em estudo. Condições experimentais: Tampão PIPES  $0,1\text{mol L}^{-1}$ , pH 7,0.

A Figura 18 mostra a influência do pH da solução no potencial formal do complexo formado na superfície do eletrodo de ouro. É verificado um deslocamento do potencial formal para valores mais positivos à medida que o pH aumenta. Isto é um indicativo de que uma etapa de protonação/desprotonação pode estar envolvida no processo redox. O coeficiente angular da curva  $E^0$  versus o pH apresenta o valor de 30,1 mV (valor referente a média de duas replicatas), isto pode vir a confirmar a participação de dois prótons e um elétron na reação eletroquímica.

O tipo de eletrólito de suporte empregado tem uma grande influência na performance do sensor proposto, portanto cinco eletrólitos de suporte foram testados. A Figura 19 mostra a resposta do sensor em PIPES, HEPES,  $\text{KNO}_3$ , KCl e TRIS (todas as soluções apresentam pH 7,0 e concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ). A ordem de magnitude das respostas foi a seguinte: PIPES > HEPES > KCl >  $\text{KNO}_3$  > TRIS.

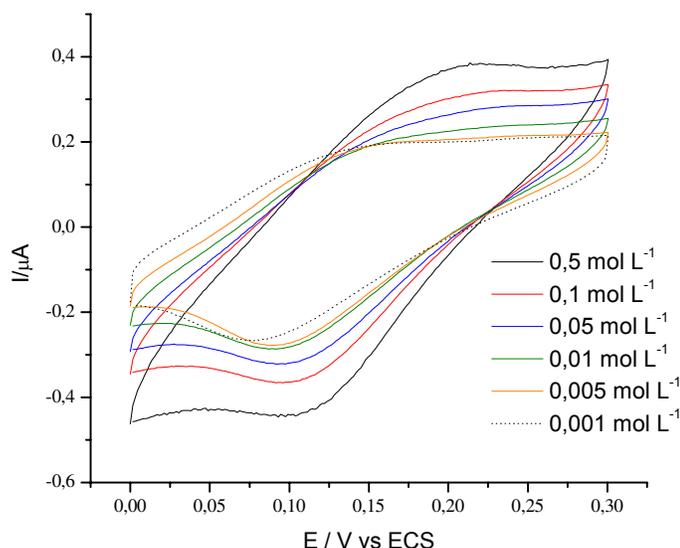


**Figura 19.** Resposta relativa do EQM estudado em diferentes eletrólitos de suporte. Concentração do eletrólito de suporte  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Figura 20.** Estabilidade do EQM construído em diferentes eletrólitos de suporte em função do número de ciclos voltamétricos. Medidas realizadas a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ , concentração do eletrólito de suporte  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.

O sensor proposto não apresentou boa estabilidade nos tampões TRIS ( $\text{pK}_b = 5,94$ ) e HEPES ( $\text{pK}_b = 6,52$ ) e nos eletrólitos  $\text{KNO}_3$  e  $\text{KCl}$ , no entanto, apresentou estabilidade considerável em tampão PIPES ( $\text{pK}_b = 7,24$ ). Entre os tampões zwitteriônicos verifica-se que há uma ordem crescente da força básica que coincide com o aumento da instabilidade do sensor no meio em questão. A estabilidade é maior em meio tamponado com PIPES, onde há menor tendência de competição dos íons cobre entre o eletrólito e os ligantes etilenodiamina da superfície eletródica.

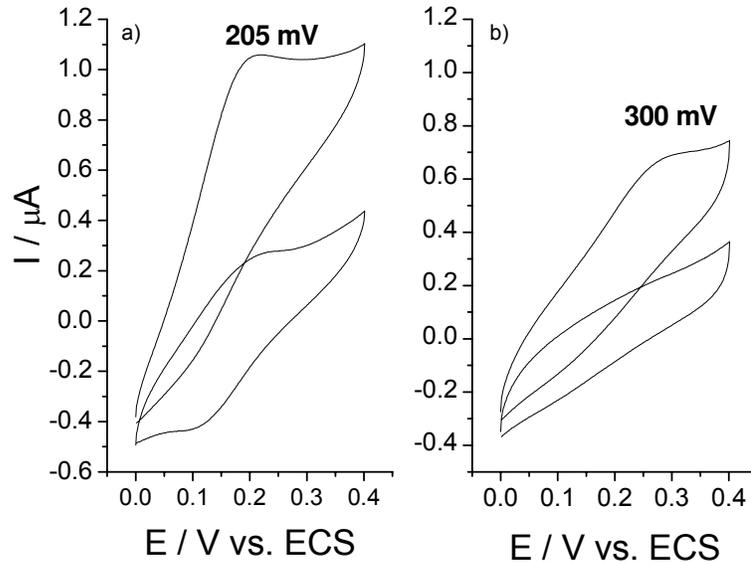


**Figura 21.** Resposta do EQM em estudo em relação à concentração de eletrólito. Tampão PIPES, pH 7,0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

A Figura 21 apresenta o efeito da concentração do tampão PIPES, pH 7,0 na resposta do EQM em estudo. Verifica-se que há um deslocamento catódico dos potenciais de pico quando a concentração de eletrólito é diminuída. Isto pode indicar a ocorrência de uma interação entre o eletrólito de suporte e o EQM. Talvez a maior estabilidade do sensor em estudo seja verificada em PIPES devido a este fator. Apesar de o sensor apresentar maior resposta analítica em meio contendo  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de tampão PIPES, a fim de evitar possíveis interferências futuras com a solução amostral, preferiu-se utilizar um solução mais diluída de tampão,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .

Tendo em vista os resultados experimentais, foi determinado o uso de tampão PIPES na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 como condição adequada de trabalho para o EQM em estudo.

O sensor foi testado em relação ao seu potencial catalítico frente a alguns compostos fenólicos como catecol, orto-cresol, salicilato de sódio, 2-clorofenol e 2-aminofenol. Nenhum destes substratos teve sua oxidação catalisada pelo sensor, no entanto, houve resposta catalítica para oxidação de ácido ascórbico como pode ser observado na Figura 22. O pico de resposta ocorre em 205 mV, desta forma, este potencial foi utilizado para realizar o estudo cronoamperométrico.



**Figura 22.** Voltamogramas cíclicos obtidos sobre eletrodo de ouro policristalino a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ , em tampão PIPES  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7: e após adição de  $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  a) eletrodo quimicamente modificado com SAM de MPA, etilenodiamina e cobre (II). b) eletrodo limpo.

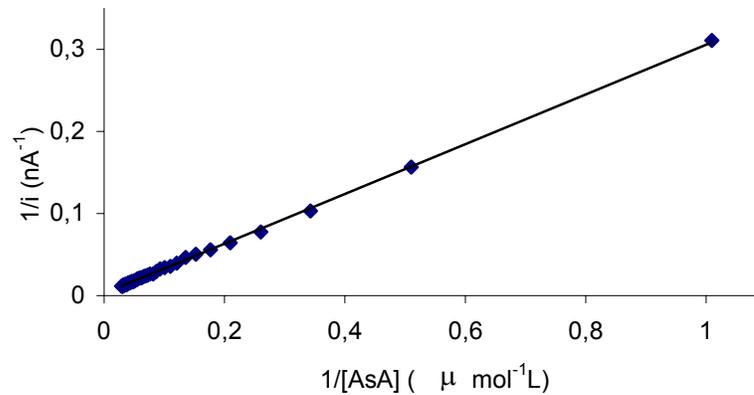
A Figura 22 mostra os voltamogramas cíclicos de um eletrodo de ouro limpo e quimicamente modificado em estudo na presença e ausência de ácido ascórbico. Como pode ser visto na Figura 20, o sensor biomimético apresenta as ondas voltamétricas bem definidas do par redox Cu(I)-Cu(II) com  $\Delta E$  de aproximadamente 50 mV e  $E^\circ$  igual a 166 mV. Após a adição de ácido ascórbico, um aumento na corrente de pico anódica foi observada e a corrente de pico catódico tende a desaparecer. Este é um comportamento típico e esperado em oxidações mediadas. A corrente de pico anódica aumenta à medida que há o aumento da concentração de ácido ascórbico na solução e foi verificado que voltametricamente a corrente de pico anódica é linearmente dependente da concentração de ácido ascórbico na solução em estudo.

A fim de aferir as propriedades biomiméticas do sensor em estudo alguns testes foram realizados: a) perfil cinético do sistema, cálculo da constante aparente de Michaelis-Menten; b) aferimento das propriedades catalíticas da superfície sensora sob a ausência da aplicação de potencial eletroquímico.

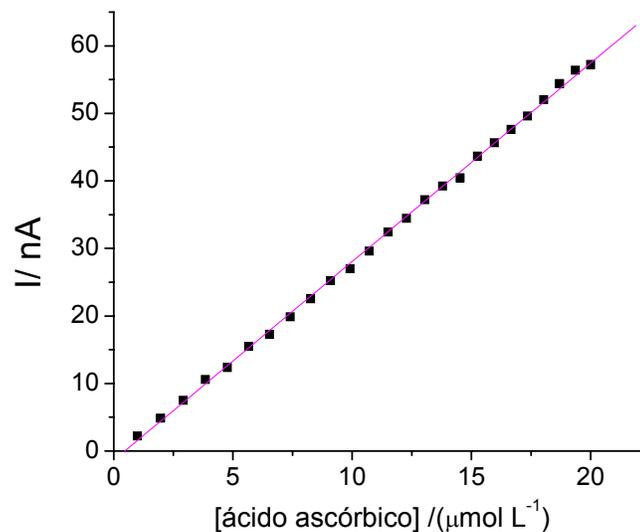
Se a reação catalisada pela superfície sensora modificada se realiza segundo a cinética de Michaelis-Menten, o  $K_m$  pode ser calculado por meio da velocidade da reação ( $v$ ) e a concentração de substrato [115]. Neste caso,  $v$  corresponde à taxa de consumo de oxigênio, que é na realidade a variação de corrente ( $\Delta I$ ) observado no sinal de resposta do sensor à adição de determinada concentração de ácido ascórbico. Como o Gráfico 30 apresenta essencialmente uma reta ( $r = 0,9996$ ), a oxidação do ácido ascórbico pela superfície eletródica quimicamente modificada segue a cinética de Michaelis-Menten [115].

A equação eletroquímica de Michaelis-Menten utilizada foi,  $(1/I) = (1/I_{max}) + (1/S)(K_m/I_{max})$  [115]; do intercepto e do coeficiente angular foi possível calcular que na média  $K_m^{app}$  é aproximadamente  $130 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $n=2$ ), estes dados foram obtidos da Figura 23. A Figura 23 exibe o gráfico de Lineweaver-Burk que fornece valores de  $K_m^{app}$  na situação de saturação do eletrodo, portanto o gráfico de  $1/I$  vs.  $1/S$  deve ser construído com base na faixa de saturação do eletrodo modificado. Este valor está muito próximo daquele calculado por Fernandes et al. para a enzima ascorbato oxidase extraída de casca de pepino e imobilizada por ligação covalente cruzada, com glutaraldeído, sobre eletrodo de grafite/epóxi,  $K_m^{app}$  igual a  $157 \mu\text{mol L}^{-1}$  [175].

Como se sabe, as enzimas catalisam a reação de seus substratos específicos mesmo sem a aplicação de potencial eletroquímico. Foi realizado o doseamento do teor de AsA em soluções do composto que foram colocadas em contato com a superfície de ouro quimicamente modificada, com a superfície de ouro limpa (que foi tomada como controle). Tentou-se verificar se a superfície biomimética realiza a catálise da oxidação de ácido ascórbico na ausência de potencial eletroquímico de fonte externa. Os resultados da análise indicam que o sensor catalisa a oxidação de AsA em circuito aberto já que quantificou-se somente  $70,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AsA na solução contendo a superfície biomimética,  $88,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  na solução que continha o eletrodo de ouro (solução controle). A solução inicial apresentava concentração inicial de  $94,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido ascórbico. Todas as soluções foram analisadas por iodometria.



**Figura 23.** Gráfico Eletroquímico de Lineweaver-Burk para o sensor biomimético desenvolvido. O gráfico foi baseado na resposta de corrente correspondente à variação de concentração de ácido ascórbico adicionado em solução tampão PIPES  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 até a completa saturação do eletrodo.



**Figura 24.** Curva analítica para ácido ascórbico obtida por amperometria com o sensor biomimético desenvolvido. Tampão PIPES, pH 7,0 a  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .  $E_{\text{app}}$ :  $205 \text{ mV}$ .

Cronoamperométricamente foi construída uma curva analítica para ácido ascórbico utilizando o sensor em estudo (Figura 24). Foram realizados incrementos sucessivos de  $50 \text{ nanomol}$  de ácido ascórbico em solução de PIPES  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.

Verificou-se uma faixa de resposta linear entre  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido ascórbico.

O sensor biomimético apresentou limite de detecção de  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  (calculado de acordo com o critério  $3s/m$ , onde  $m$  é o coeficiente angular da faixa linear da respectiva curva de calibração e  $s$  é o sinal correspondente ao ruído encontrado na medida) e limite de quantificação igual a  $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$  (critério,  $10s/m$ ) de ácido ascórbico em tampão PIPES, pH 7,0. A precisão da medida de  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido ascórbico em pH 7,0 foi de 3,3 % em termos de RSD. A reprodutibilidade de construção do sensor é de 4,9 % (RSD), ( $n = 3$ ), considerando o coeficiente angular de curvas analíticas construídas com o sensor. O tempo de resposta é da ordem de 0,5 s, que indica que o sensor desenvolvido pode ser acoplado a sistemas em fluxo ou ser utilizado em monitoramento em tempo real. A equação que descreve o desempenho analítico do sensor é dada por:

$$I \text{ (nA)} = - 1,37 (\pm 0,21) + 2,94 (\pm 0,02) [\text{AA} (\mu\text{mol L}^{-1})] \text{ onde, } r = 0,9996.$$

A aplicabilidade do sensor para análise de vitamina C em amostras de fármacos foi avaliada. Um estudo preliminar dos excipientes indicava que a determinação não seria interferida se a amostra fosse solubilizada e diluída até se adequar à faixa de resposta linear demonstrada para o sensor biomimético, devido à baixa ou nenhuma atividade eletroquímica dos componentes do medicamento. A determinação de ácido ascórbico foi realizada por meio do método da adição de padrão, além da amostra foram adicionados mais três volumes de solução conhecida de padrão de ácido ascórbico. A amostra foi diluída completamente em meio aquoso, pH corrigido para 2,0 com ácido sulfúrico diluído, e mantida sob proteção da luz e analisada imediatamente após esta etapa de preparo de amostra.

A Tabela 6 resume os resultados analíticos obtidos na análise do teor em ácido ascórbico em alguns medicamentos. Os resultados obtidos com o sensor foram comparados com o do método titulométrico convencional. O RSD ( $n=3$ ) para amostras de comprimidos tendo AsA como princípio ativo foi menor que 3,0 %, e houve uma concordância entre os resultados obtidos com o sensor e o método de referência. O método de referência apresenta o inconveniente de produzir grande quantidade de

rejeito com periculosidade considerável ao meio ambiente, utilizar grande quantidade de reagentes, baixa seletividade, no entanto, utiliza um instrumental simples e de preparação rápida. O sensor biomimético construído é intrinsecamente mais seletivo, emprega mínimas quantidades de reagentes na sua construção e produz quantidades irrelevantes de resíduo não tóxico, no entanto, a preparação do eletrodo é laboriosa. Mesmo que as amostras apresentassem algum tipo de espécie interferente, o efeito desta seria minimizado devido à diluição de no mínimo 1250 vezes em solução tampão que era realizado antes de prosseguir a determinação do princípio ativo.

Em relação a um biossensor construído com ascorbato oxidase trapeada em gel de poliacrilamida [115], o sensor biomimético apresenta vantagens em relação à robustez e estabilidade. Enquanto o sensor biomimético se mantém em condições de uso por até 3 meses, o biossensor suporta somente 40 dias de armazenamento (sob refrigeração e em meio adequado). A faixa de pH de trabalho do biossensor se restringe a pequena faixa de pH onde a enzima mantém sua estrutura e propriedade catalítica inalteradas e foi verificado que o sensor biomimético mantém sua resposta ótima entre pH 7 e 8.

**Tabela 6.** Resultados obtidos na análise de amostras farmacêuticas de vitamina C com o sensor biomimético desenvolvido.

Amostra	Valor Nominal	Sensor Biomimético	Titulação/ Farmacopéia <sup>[161]</sup>	Desvio Relativo*
#1	500 mg/comprimido	502 ± 2	500 ± 3	0,4 %
#2	300 mg/ comprimido	303 ± 3	301 ± 1	0,7 %
#3	500 mg/ comprimido	496 ± 2	501 ± 5	0,9 %

A estimativa do desvio padrão para três determinações foi realizada em todas as análises. \*estimativa do desvio relativo obtido entre os métodos titulométrico e sensor biomimético.

Também contém na formulação das amostras de fármacos:

**#1** Ácido esteárico, celulose microcristalina, estearato de magnésio e croscarmelose sódica (Schering-Plough - Vitamina C); **#2** excipiente q. s. p. (Benegripe); **#3** Excipiente q. s. p. (Melhoral C)

O eletrodo proposto para ácido ascórbico baseado em SAM de MPA, etilenodiamina e íons cobre complexados foi utilizado com bons resultados para a determinação de AsA em amostras farmacêuticas, como pode ser observado na Tabela 6. As drogas analisadas contém vários compostos em suas formulações, tais como açúcares, sais e conservantes, porém nenhuma interferência foi observada. Os

resultados para determinação de ácido ascórbico nestas amostras apresentaram boa concordância com o método da titulação iodométrica mostrando a aplicabilidade do sensor proposto. O tempo de restauração do sensor foi de alguns minutos em tampão Pipes  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. O eletrodo apresentou um tempo de vida útil de até 3 dias após iniciado seu uso, sendo feito cerca de 40 análises sem decréscimo significativo em sua resposta, se armazenado em local limpo, temperatura ambiente (aprox.  $25^{\circ}\text{C}$ ) e seco. Esta medida de estabilidade foi realizada alterando a solução tampão a cada 3 medidas. Após a realização da modificação do eletrodo base de ouro o eletrodo permanece no mínimo 3 meses apto ao uso se acondicionado em local seco, isento de poeiras e à temperatura ambiente.

### **III. 5 Conclusão**

Este trabalho mostra claramente que a química biomimética pode ser tomada como base na construção de um sensor para a detecção de biomoléculas de interesse farmacológico e que isto é possível utilizando estruturas moleculares simples. Este sensor apresentou ampla faixa de resposta, boa repetibilidade e estabilidade suficiente à realização de análises confiáveis.

Ressalta-se ainda que o sensor biomimético aqui descrito resulta em um método que segue a tendência atual da química limpa, pois utiliza quantidade mínima de reagentes e gera um pequeno volume de resíduo não tóxico, ao contrário do que se verifica com o método de referência. O sensor é construído de forma simples e barata e seu tempo de vida se estende por alguns meses, se mantido em ambiente limpo.

## **CAPÍTULO IV**

---

### **CONCLUSÕES GERAIS**

A grande vantagem de se empregar sensores biomiméticos ao invés dos biossensores correspondentes, está no fato de que aqueles oferecem a possibilidade de estender as excelentes propriedades dos biossensores relacionadas, principalmente à seletividade e à catálise reacional, à análise de compostos de interesse presentes em amostras que se encontram sob condições analíticas mais extremas e necessitem de um instrumental mais robusto para tal. Muitos estudos ainda precisam ser realizados, a ponto de permitir que se atinja este grau de autonomia na utilização de sensores biomiméticos e isto se deve, sobretudo, ao fato de o ramo de pesquisa ainda ser muito recente.

Ao se associar a técnica de modificação de superfícies por meio de SAM e o desenho molecular de interfaces para fins biomiméticos vislumbrou-se a grande necessidade de se aferir as propriedades do substrato para a aquisição reprodutibilidade da formação da SAM e, conseqüentemente, da resposta do sensor construído. Neste sentido, um ponto de suma importância é a característica físico-química do substrato e, neste estudo, verificou-se que a estratégia de pré-tratamento de superfície que leva a formação de monocamadas auto-organizadas de tióis com recobrimento satisfatório sobre eletrodos de ouro policristalinos é aquela que proporciona uma superfície limpa, com baixa rugosidade e menor quantidade de óxidos.

Em relação aos resultados obtidos na modificação de eletrodos de ouro verificou-se que a estabilidade das estruturas ligadas aos monômeros da SAM é bastante sensível às variações na basicidade do eletrólito utilizado nas medidas voltamétricas. A estabilidade da SAM de tióis é indiscutível, no entanto, é sempre necessário, atestar com cautela a estabilidade do sistema.

A intensificação do estudo relacionado ao desenvolvimento de modelos enzimáticos a partir da química de coordenação de complexos metálicos apresenta possibilidades de avanços em muitas áreas do conhecimento, sobretudo, ao desenvolvimento de aparatos analíticos biomiméticos e até mesmo para outras finalidades como a utilização da reação catalítica para a composição de células combustível, por exemplo.

O sensor biomimético construído apresentou ampla faixa de resposta, boa repetibilidade e estabilidade suficiente à realização de análises confiáveis em amostras de fármacos contendo ácido ascórbico como princípio ativo.

## **CAPÍTULO V**

---

### **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Das inúmeras características interessantes de aplicação de SAM de tióis, que foram citadas neste trabalho, a possibilidade de arquitetar novas estruturas biomiméticas a partir de auto-organização molecular que, de forma análoga às enzimas, permitam o desenvolvimento de aparatos analíticos com propriedades vantajosas em relação aos biossensores já desenvolvidos, trás grande impulso ao desenvolvimento de novas técnicas eletroanalíticas mais robustas. Dentro deste contexto, sugere-se o desenvolvimento de sensores biomiméticos à catálise reacional de diferentes metaloenzimas com base na química de coordenação do sítio ativo enzimático, por meio do desenho molecular da superfície de eletrodos sólidos com monocamadas de tióis e da utilização de diferentes complexos inorgânicos.

## **CAPÍTULO VI**

---

### **BIBLIOGRAFIA**

1. R. K. Smith, P. A. Lewis, P. S. Weiss, *Prog. Surf. Sci.* **2004**, 75,1.
2. J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R.G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.*, *in press*.
3. D. L. Allara, A. N. Parikh, F. Róndeles, *Langmuir* **1995**, 11, 2357.
4. A. Ulman, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 1533.
5. J. Sajiv, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 92.
6. P. E. Laibinis, J. J. Hickman, M. S. Wrighton, G. M. Whitesides, *Science* **1989**, 245, 845.
7. P. E. Laibinis, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1990.
8. S. Campuzano, B. Serra, M. Pedrero, F. J. Manuel de Villena, J. M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta* **2003**, 494, 187.
9. D. Qu, M. Morin, *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 517, 45.
10. D. S. Karpovich, G. J. Blanchard, *J. Chem. Educ.* **1995**, 72, 466.
11. R. S. Freire, C. A. Pessoa, L. T. Kubota, *Quim. Nova* **2003**, 26, 381.
12. B. Xia, J. Li, S. J. Xiao, D. J. Guo, J. Wang, Y. Pan, X. Z. You, *Chem. Lett.*, **2005**, 34, 226.
13. H. L. Li, N. Perkass, Q. L. Li, Y. Gofer, Y. Kolytyn, A. Gedanken, *Langmuir*, **2003**, 19, 10409.
14. H. H. Weetall, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **1993**, 41, 157.
15. M. Ferreira, W. Caetano, R. Itri, M. Talbak, O. N. Oliveira Jr., *Quim. Nova*, **2005**, 28, 502.
16. M. C. Petty; *Langmuir-Blodgett Films – An Introduction*, Cambridge University Press: Cambridge, 1996.
17. H.O. Finklea, *Electroanal. Chem.* 19 (1996) 109.
18. S. Campuzano, B. Serra, M. Pedrero, F. J. M. Villena, J. M. Pingarrón, *Ana. Chim. Acta* **2003**, 494, 187.
19. A. Lindgren, L. Gordon, T. Ruzgas, U. Baminger, D. Haltrich, M. Schulein, *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 496, 76.
20. C. D. Bain, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1989**, 5, 1370.
21. D.E. Weeishaar, D. B. Lamp, M. D. Porter, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5860.
22. C. A. Widrig, C. Chung, M. D. Porter, *J. Electroanal. Chem.* **1991**, 310, 335.
23. D.E. Weeishaar, M. M. Walczak, M. D. Porter, *Langmuir*, **9**, (1993), 323-329.
24. D. Roy, J. Fendler, *J. Adv. Mater.* **2004**, 16, 479.
25. M. A. Bryant, J. E. Pemberton, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 8284.
26. E. Ito, K. Konno, J. Noh, K. Kanai, Y. Ouchi, K. Seki, M. Hara, *Appl. Surf. Sci.* **2005**, 244, 584.
27. A. S. Duwez, *J. Electron. Spectrosc. Relat. Phenom.* **2004**, 134, 97.
28. H. I. Sung, D. E. Kim, *Tribol. Lett.* **2004**, 17, 835.
29. C. E. D. Chidsey, G. Y. Liu, G. Scoles, J. Wang, *Langmuir* **1990**, 6, 1804.
30. G. M. Whitesides, P. F. Laibinis, *Langmuir* **1990**, 6, 87.
31. K. A. Peterlinz, R. Georgiadis, *Langmuir*, **1996**, 12, 4731.
32. P. E. Laibinis, G. M. Whitesides, D. L. Allara, Y. T. Tao, A. N. Parikh, R. G. Nuzzo, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 7152.
33. R. Subramanian, V. Lakshminarayanan, *Electrochim. Acta.* **2000**, 45, 4501.

34. M. M. Walczak, D. D. Popenoe, R. S. Deinhammer, B. D. Lamp, C. Chung, M. D. Porter, *Langmuir*, **1991**, 7, 2687.
35. M. D. Porter, T. B. Bright, D. Allara, C. E. D. Chidsey, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 3559.
36. C. J. Miller, P. Cuendet, M. Gratzel, *J. Phys. Chem.* 1991, 95, 877.
37. A. L. Plant, *Langmuir* **1993**, 9, 2764.
38. K. Bandyopadhyay, K. Vijayamohan, G. S. Shekhawat, R. P. Gupta, *J. Electroanal. Chem.* **1998**, 447, 11.
39. H. O. Finklea, S. Avery, M. Lynch, T. Furtch, *Langmuir* **1987**, 3, 409.
40. K. A. Groat, S. E. Creager, *Langmuir* **1993**, 9, 3668.
41. C. J. Miller, P. Cuendet, M. Gratzel, *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 877.
42. A. M. Becka, C. J. Miller, *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 6233.
43. M. J. Hostetler, J. E. Wingate, C. J. Zhong, J. E. Harris, R. W. Vachet, M. R. Clark, J. D. Londono, S. J. Green, J. J. Stokes, G. D. Wignall, G. L. Glish, M. D. Porter, N. D. Evans, and R. W. Murray, *Langmuir* **1998**, 14, 17.
44. A. M. Jackson, J. W. Myerson, F. Stellacci, *Nat. Mater.* 2004, 3, 330.
45. R. H. Terrill, T. A. Postlethwaite, C. H. Chen, C. D. Poon, A. Terzis, A. Chen, J. E. Hutchison, M. R. Clark, G. Wignall, J. D. Londono, R. Superfine, M. Falvo, C. S. Johnson Jr., E. T. Samulski, R. W. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 12537.
46. H. Modrow, *Appl. Spectrosc. Rev.* 2004, 39, 183.
47. H. Murayama, N. Ichikuni, Y. Negishi, T. Nagata, T. Tsukuda, *Chem. Phys. Lett.* 2003, 376, 26.
48. A. Badia, L. Cuccia, L. Demmers, F. Morrin, R. B. Lennox, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2682.
49. M. J. Hostetler, J. J. Stokes, R. W. Murray, *Langmuir* **1996**, 12, 3604.
50. M. M. Alvarez, J. T. Khoury, T. J. Schaaf, M. N. Shafiqullin, I. Vezmar, R. L. Whetten, *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 3706.
51. M. J. Hostetler, R. W. Murray, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1997**, 2, 42.
52. K. V. Wolf, D. A. Cole, S. L. Bernasek, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 5009.
53. W. P. Wuelfing, A. C. Templeton, J. F. Hicks, R. W. Murray, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 4069.
54. S. W. Chen, R. W. Murray, S. W. Feldberg, *J. Phys. Chem. B* **1998**, 71, 4069.
55. Y. Golan, L. Margulis, I. Rubinstein, *Surf. Sci.* **1992**, 264, 312.
56. S. D. Evans, K. E. Goppert-Bearducci, E. Urankar, L. J. Gerenser, A. Ulman, *Langmuir*, **1991**, 7, 2700.
57. J. P. Folkers, P. E. Laibinis, G. M. Whitesides, *Langmuir*, 1992, 8, 1330.
58. S. E. Creager, L. A. Hockett, G. K. Rowe, *Langmuir*, **1992**, 8, 854.
59. L. H. Guo, J. S. Facci, G. McLendon, R. Mosher, *Langmuir*, **1994**, 10, 4588.
60. L. D. Burke, L. M. Hurley, V. E. Lodge, M. B. Mooney, *J. Solid State Electrochem.* **2001**, 5, 250.
61. L. D. Burke, J. A. Collins, M. A. Horgan, L. M. Hurley, A. P. O'Mullane, *Electrochim Acta* **2000**, 45, 4127.
62. Z. Yang, A. Conzalez-Cortez, G. Jourquin, J. Vire', J. Kauffmann, *Biosens. Bioelectron.* **1995**, 10, 789.

63. R. Subramanian, V. Lakshminarayanan, *Curr. Sci.* **1999**, 76, 665.
64. L. D. Burke, A. P. O'Mullane, *J. Solid State Electrochem.* **2000**, 4, 285.
65. M. T. Lee, C. C. Hsueh, M. S. Freund, G. S. Ferguson, *Langmuir* **1998**, 14, 6419.
66. M. Dijkstra, T. Ishida, N. Nishida, M. Hara, H. Sasabe, W. Knoll, *Langmuir* **2000**, 16, 3852.
67. H. Ron, I. Rubinstein, *Langmuir* **1994**, 10, 4566.
68. H. Ron, I. Rubinstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 13444.
69. H. Ron, S. Matlis, I. Rubinstein, *Langmuir* **1998**, 14, 1116.
70. M. Dijkstra, T. Ishida, N. Nishida, M. Hara, H. Sasabe, W. Knoll, *Langmuir* **2000**, 16, 3852.
71. S. E. Creager, L. A. Hockett, G. K. Rowe, *Langmuir* **1992**, 8, 854.
72. Q. Cheng, A. Brajter-Toth, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 4180.
73. L. Guo, J. S. Facci, G. McLendon, R. Mosher, *Langmuir* **1994**, 10, 4588.
74. J. C. Hoogvliet, M. Dijkstra, B. Kamp, W. P. Van Bennekom, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 2016.
75. M. Wirde, U. Gelius, L. Nyholm, *Langmuir* **1999**, 15, 6370.
76. J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, Wiley, New York 2000, pp. 100 – 139.
77. L. Bertilsson, B. Liedberg, *Langmuir* **1993**, 9, 141.
78. M. Kawasaki, T. Sato, T. Tanaka, K. Takao, *Langmuir* **2000**, 16, 1719.
79. M. S. El-Deab, T. Ohsaka, *Electrochim. Acta* **2004**, 49, 2189.
80. K. Ozoemena, T. Nyokong, *Electrochim. Acta* **2002**, 47, 4035.
81. B. Zeng, X. Ding, F. Zhao, *Electroanalysis* **2002**, 14, 651.
82. R. S. Freire, L. T. Kubota, *Analyst* **2002**, 127, 1502.
83. M. Dijkstra, B. Kamp, J. C. Hoogvliet, W. P. Bennekom, in *Development of Electrochemical Immunosensors based on Self-assembled Monolayers*, Eco Chemie B. V., Utrecht 2001, pp. 89 – 105.
84. G. Che, Z. Li, H. Zhang, C. R. Cabrera, *J. Electroanal. Chem.* **1998**, 453, 9.
85. M. Akram, M. C. Stuart, D. K. Y. Wong, *Anal. Chim. Acta* **2004**, 504, 243.
86. W. Yang, J. J. Gooding, D. B. Hibbert, *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 516, 10.
87. J. Wang, B. Zeng, C. Fang, X. Zhou, *Anal. Sci.* **2000**, 16, 457.
88. C. Frubose, K. Doblhofer, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1995**, 91, 1949.
89. C. D. Bain, E. B. Throughton, Yu.-T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, R. G. Nuzzo, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 321.
90. K. Shimazu, I. Yagi, Y. Sato, K. Uosaki, *Langmuir* **1992**, 8, 1385.
91. W. Pan, C. J. Durning, N. J. Turro, *Langmuir* **1996**, 12, 4469.
92. F. S. Damos, R. C. S. Luz, L. T. Kubota, *Langmuir* **2005**, 21, 602.
93. D. S. Karpovich, G. J. Blanchard, *Langmuir* **1994**, 10, 3315.
94. J. Wang, *Electroanalysis* **2000**, 12, 703.
95. A. C. Pereira, A. S. Santos, L. T. Kubota, *Quim. Nova* **2002**, 25, 1012.
96. B. R. Eggins, *Biosensors: An Introduction*. John Wiley & sons, England, p. 133 – 145, **1996**.
97. M. D. P. T. Sotomayor, A. A. Tanaka, T. K. Kubota, *Anal. Chim. Acta* **2002**, 455, 215.
98. A. Chaubey, B. Malhotra, *Biosens. Bioelectron* **2002**, 17, 441.
99. M. I. Prodomidis, M. I. Karayannes, *Electroanalysis* **2002**, 14, 241-264.

100. S. Zhang, G. Wright, Y. Yang, *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 273.
101. L. Gorton, A. Lindgren, T. Larsson, F. Munteanu, T. Ruzgas, I. Gazaryan, *Anal. Chim. Acta* **1999**, *400*, 91.
102. S. Andreescu, O. A. Sadik, *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 861.
103. A. K. Deisingh, M. Thompson, *Can. J. Microbiol.* **2004**, *50*, 69.
104. G. Gupta, V. Rajendran, P. Atanassov, *Electroanalysis.* **2003**, *15*, 1577.
105. D. Mandler, I. Turyan, *Electroanalysis.* **1996**, *8*, 207.
106. S. Ferret, S. Paynter, D. A. Russel, K. E. Sapsford, D. J. Richardson, *Trends Anal. Chem.* **2000**, *19*, 530.
107. G. Gilardi, A. Fantuzzi, *Trends Biotechnol* **2001**, *19*, 468.
108. C. Nistor, J. Emnéus, *Waste Management* **1999**, *19*, 147.
109. S. Zhang, G. Wright, Y. Yang, *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 273.
110. R. S. Freire, N. Durán, L. T. Kubota, *Talanta* **2001**, *54*, 681.
111. D. J. Cram, *Angew. Chem. Res.* **1998**, *27*, 1009.
112. Y. Murakami, Y. Aoyama, J. Kikushi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I.* **1981**, *11*, 1209.
113. R. Breslow, L. E. Overman, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 1075.
114. H. Ikeda, Y. Horimoto, M. Nakata, A. Ueno, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6483.
115. Y. Hasebe, T. Akiyama, T. Yagisawa, S. Uchiyama, *Talanta* **1998**, *47*, 1139.
116. J. Kikushi, Z. Thang, Y. Murakami, *Chem. Lett.* **1994**, *8*, 1559.
117. N. Kitajima, *Adv. Inorg. Chem.* **1992**, *39*, 1.
118. J. C. B. Fernandes, L. T. Kubota, G. Oliveira-Neto, *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *481*, 34.
119. D. A. Rockcliff, A. E. Martell, *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 3143.
120. R. Menif, A. E. Martell, P. J. Squattrito, A. Clearfield, *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 4723.
121. P. M. Ngwenya, D. Chen, A. E. Martell, J. Reibenspies, *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 2732.
122. R. Breslow, *Chem. Soc. Rev.* **1972**, *1*, 553.
123. R. Breslow, *Pure & Appl. Chem.* **1994**, *66*, 1573.
124. R. Breslow, M. A. Winnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 3083.
125. B. I. Kurganov, I. N. Topchieva, *Biochemistry-Moscow*, **1991**, *56*, 1374.
126. R. Katakay, E. Morgan, *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 1407.
127. R. Breslow, L. E. Overman, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 1075.
128. R. Breslow, B. Zang, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5882.
129. R. Breslow, D. Chipman, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 4195.
130. R. Breslow, *J. Chem. Educ.* **1998**, *75*, 705.
131. M. A. Halcrow, G. Christou, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2421.
132. L. Ye, K. Haupt, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 1887.
133. M. D. P. T. Sotomayor, A. A. Tanaka, L. T. Kubota, *J. Eletroanal. Chem.* **2002**, *536*, 71.
134. L. C. S. Chou, C. Liu, *Sens. Actuators, B* **2005**, in press.
135. M. D. P. T. Sotomayor, A. A. Tanaka, L. T. Kubota, *Electrochim. Acta* **2003**, *48*, 855.

136. M. D. P. T. Sotomayor, A. A. Tanaka, L. T. Kubota, *Anal. Chim. Acta* **2002**, 455, 215.
137. H. F. Bao, Z. Q. Peng, E. K. Wang, S. J. Dong, *Langmuir*, **2004**, 20, 10992.
138. D. E. Weisshaar, B. D. Lamp, M. D. Porter, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5860.
139. M. M. Walczak, D. D. Pnpenoe, R. S. Deinhammer, B. D. Lamp, C. Chung, M. D. Porter, *Langmuir* **1991**, 7, 2687.
140. S. Trasatti, O. A. Petrii, *Pure & Appl. Chem.* **1991**, 5, 711.
141. M. Wirde, U. Gelius, L. Nyholm, *Langmuir* **1999**, 15, 6370.
142. D.-F. Yang, M. Morin, *J. Electroanal. Chem.* **1998**, 441, 173.
143. Z. Yang, A. Conzalez-Cortez, G. Jourquin, J. Viré, J. Kauffmann, *Biosens Bioelectron.* **1995**, 10, 789.
144. M. S. El-Deab, T. Ohsaka, *Electrochim. Acta* **2002**, 47, 4255.
145. S. Griveau, J. Pavez, J. H. Zagal, F. Bedioui, *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 497, 75.
146. S. D. Collyer, F. Davis, A. Lucke, C. J. M. Stirling, S. P. J. Higson, *J. Electroanal. Chem.* **2003**, 549, 119.
147. P. Krysiński, M. Brzostowska-Smolka, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, 424, 61.
148. K. R. Prasad, N. Munichandraiah, *Synth. Met.* **2002**, 130, 17.
149. R. S. Freire, L. T. Kubota, *Analyst* **2002**, 127, 1502.
150. O. Chailapakul, R. M. Crooks, *Langmuir* **1993**, 9, 884.
151. S. Steinberg, Y. Tor, E. Sabatani, I. Rubinstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 5176.
152. S. Imabayashi, M. Lida, D. Hobara, Z. Q. Feng, K. Niki, T. Kakiuchi, *J. Electroanal. Chem.* **1997**, 428, 33.
153. A. Szent-Györgyi *Biochem. J.* **1928**, 22, 1387.
154. R. H. Garret, C. M. Grisham, *Biochemistry*, Saunders College Publishing, Orlando, p. 319, 180-182, 375 – 376, 491, 1995.
155. F. O. Silva,; *Food Control* **2005**, 16, 55.
156. R. T. Tulley, US Patent, **1995**, 441,872.
157. J. K. Kwakye, A. West, *J. Pharm.* **1997**, 11, 65.
158. J. K. Kwakye, *Talanta* **2002**, 51, 197.
159. W. Zeng, F. Martinuzzi, A. MacGregor, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 36, 107.
160. M. J. R. Rama, A. R. Medina, A. M. Diaz; *Microchem. J.* **2004**, 78, 157.
161. British Pharmacopoeia, HMSO: London, p. 733, **2000**.
162. USP 24/NF19, USP Convention Inc., **2000**.
163. T. Perez-Ruiz, C. Martinez-Lozano, A. Sanz, A. Guillen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, 34, 551.
164. B. A. Wolucka, M. Davey, W. W. Boerjan, *Anal. Biochem.* **2001**, 294, 161.
165. J. Lykkesfeldt, *Anal. Biochem.* **2001**, 291, 173.
166. P. Janda, J. Weber, J. Dunsch, A. B. P Lever, *Anal Chem.* **1996**, 68, 960.
167. M. Zhang, Z. Gong, H. Zhang, L. Mao, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 20,1270.

- 
168. S. Wang, D. Du, *Sens. Actuators B: Chem.* **2004**, 97, 373.
  169. E. M. Stochkova, Y. I. Turyan, I. Kuselman, A. Shenhar, *Talanta* **1997**, 44, 1923.
  170. J. Zen, D. Tsai, A. S. Kumar, V. Dharuman, *Electrochem. Commun.* **2000**, 2, 782.
  171. M. C. Yebra, R.M. Cespon, A. Moreno-Cid, *Anal. Chim. Acta* **2001**, 448, 157.
  172. M. L. Antonelli, G. D'Ascenzo, A. Lagana, P. Pusceddu *Talanta* **2002**, 58, 961.
  173. M. R. Esteban, C. Ho, *Microchem. J.* **1997**, 56, 122.
  174. F. Sahbaz, G. Somer, *Food Chem.* **1992**, 44, 141.
  175. J. C. B. Fernandes, L. T. Kubota, G. Oliveira Neto, Desenvolvimento de um sistema multi-componente de injeção em batelada com detecção potenciométrica, aplicando à análise de substâncias de interesse biológico. Tese, Unicamp, Campinas SP **2000**.
  176. Kroneck, P.M.H., Armstrong, F.A., Merkle, H., Marchesini, A., *Adv. Chem. Ser.* **1982**, 200, 223.
  177. Finazzi-Agro, A., Rossi, A., *Biochem. Soc. Trans.* **1992**, 20, 369.
  178. E. I. Solomon, U. M. Sundaram, T. E. Machonkin, T.E. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2563.
  179. A. Marchesini, P. M. H. Kroneck, *Eur. J. Biochem.*, **1979**, 101, 65.
  180. T. Sakurai, S. Sawada, S. Suzuki, A. Nakahara, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, 915, 238.
  181. L. Avigliano, A. Finazzi-Agro, Multicopper oxidases, A. Messerschmidt (Ed.), World Scientific, Singapore, **1997**, p. 251–284.
  182. J. M. Guss, H. C. Freeman, *J. Mol. Biol.* **1983**, 169, 521.
  183. H. Nar, A. Messerschmidt, R. Huber, M. van de Kamp, G. Canters, *J. Mol. Biol.*, **1991**, 221, 765.
  184. L. Casella, E. Monzani, L. Santagostini, L. Gioia, M. Gullotti, P. Fantucci, T. Beringhelli, A. Marchesini, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 185–186, 619.
  185. J. W. Lee, S. J. Sim, S. M. Cho, J. Lee *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 20, 1422.
  186. R. S. Freire, L. T. Kubota, *Electrochim. Acta* **2004**, 49, 3795.