



**Universidade Federal do Ceará
Centro de Ciências
Programa de Pós-Graduação em Química**

***SAMs DE MOLÉCULAS SULFURADAS: ESTUDO TERMODINÂMICO
E CINÉTICO DE ADSORÇÃO E APLICAÇÃO EM REAÇÕES DE
TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS DE METALOPROTEÍNAS***

Tércio de Freitas Paulo

Orientadora: Dra. Izaura Cirino Nogueira Diógenes

**Tese submetida à comissão
do Curso de Pós-Graduação
em Química como requisito
parcial para a obtenção do
título de Doutor.**

Fortaleza, Agosto de 2011

P356s Paulo, Tércio de Freitas
SAMS de moléculas sulfuradas : estudo termodinâmico e cinético de adsorção e aplicação em reações de transferências de elétrons de metaloproteínas / Tércio de Freitas Paulo. – 2011.
147 f. : il. color., enc.

Orientador: Profa. Dra. Izaura Cirino Nogueira Diógenes
Área de concentração: Físico-Química
Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, 2011.

1. Citocromos 2. Mioglobina 3. Físico-química I. Diógenes, Izaura Cirino Nogueira (Orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-Graduação em Química III. Título

CDD 541.3

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química, área de concentração Química Inorgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e em cuja Biblioteca Central encontra-se à disposição dos interessados.



Tércio de Freitas Paulo

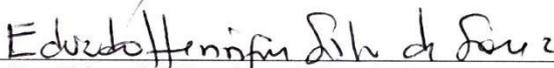
Tese aprovada em: **19/08/2011**



Dra. Izaura Cirino Nogueira Diógenes
(Orientadora-UFC)



Dr. Auro Atsushi Tanaka
(UFMA)



Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa
(UFC)



Dr. Héctor D. Abruña
(Cornell University, Ithaca – NY, USA)



Dra. Márcia Laudelina Arruda Temperini
(USP)

Dedico este trabalho,

*Aos meus pais Tadeu e Rita, à minha irmã
Tatiana e à Marilena pelo amor, apoio e
incentivo durante todos os momentos da
minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra. Izaura Cirino Nogueira Diógenes, pelo incentivo contínuo, confiança, dedicação e orientação essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Héctor D. Abruña, pela oportunidade, orientação e dedicação em repassar conhecimentos.

Ao Prof. Auro Tanaka, pela hospitalidade e dedicação em repassar conhecimentos.

Ao Prof. Eduardo Sousa pela contribuição neste trabalho.

À Profa. Marcia Temperini, pela contribuição neste trabalho.

Aos professores do Grupo de Bioinorgânica: Izaura, Luisinho, Idalina, Elisane, Jackson, Karine, Marcelo, Audísio e Eduardo e aos estudantes do grupo: Ordelei, Adilson, Sérgio, Socorro, Jefferson, Fernando, Aldenor, Natanna, Michele, Pedro, Tiago Fco, Elis, Manuela, Dieric, Ticyano, Marcos, Amanda, Daniele, Walysson, Felipe, Renato, Ramon, Samuel, Priscila, Auridéia, Vivânia, Patrícia e os membros mais recentes pelos momentos de descontração e apoio.

À Lucidalva Pinheiro e Sergio Araújo, pela contribuição neste trabalho.

À Universidade de Cornell e ao grupo do Prof. Abruña.

À Mary e a todos os membros da minha família, pelos momentos de companheirismo e descontração.

À CAPES, pelo suporte financeiro e pela bolsa PDEE.

...e, finalmente, a todos aqueles que foram involuntariamente esquecidos neste agradecimento, meu muito obrigado!

RESUMO

O emprego das técnicas de eletroquímica, microbalança de cristal quartzo (QCM – *Quartz Crystal Microbalance*) e ressonância de plásmos de superfície (SPR – *Surface Plasmon Resonance*) mostram que as espécies 1,4-ditiano (1,4-dt), 4-mercaptopiridina (pyS), 5-(4-piridil)-1,3,4-oxadiazol-2-tiol (Hpyt), tionicotinamida (TNA) e isotionicotinamida (iTNA) experimentam adsorção espontânea formando SAMs (*Self-Assembled Monolayers*) como resultado da imersão de substratos de ouro em solução contendo estas espécies. As imagens obtidas por microscopia de varredura por tunelamento (STM – *Scanning Tunneling Microscopy*) indicam um arranjo próximo do hexagonal com exceção da iTNA cujas imagens não foram conclusivas. Adicionalmente, as imagens indicam a existência de defeitos nas SAMs mesmo após longos períodos de imersão (24 h). Os estudos termodinâmicos e cinéticos dos processos de adsorção foram realizados por desorção redutiva em meio alcalino e QCM. Os valores dos potenciais de desorção redutiva, E_{dr} , foram observados em $-0,9$, $-0,8$ e $-0,5$ V vs. Ag/AgCl/Cl⁻ para a desorção de iTNA, TNA e Hpyt, respectivamente. Comparativamente às espécies 1,4-dt ($-0,8$ V) e pyS ($-0,5$ V), o valor de E_{dr} da SAM de Hpyt indica uma interação σ ao passo que aqueles observados para iTNA e TNA sugerem uma contribuição π adicional. Os valores de quantidade de material adsorvido (Γ) e da taxa de recobrimento da superfície (θ), calculados por desorção redutiva e impedância eletroquímica, respectivamente, foram consistentes com as imagens de STM. Comparativamente aos resultados de desorção, os maiores valores de Γ determinados por QCM foram atribuídos à presença de moléculas de água co-adsorvidas visto que foi observada uma relação linear entre o excesso de massa e o momento de dipolo das espécies modificadoras. As curvas de desorção obtidas para pyS indicam a decomposição da monocamada não possibilitando, portanto, a determinação dos parâmetros termodinâmicos e cinéticos de adsorção. A correlação com os resultados obtidos após imersão do eletrodo de ouro em solução de Na₂S sugere que este processo está associado à quebra da ligação C–S com formação de uma camada de enxofre atômico e/ou oligomérico. As isotermas de adsorção obtidas para os processos de formação das SAMs de Hpyt, TNA e iTNA, adequaram-se ao modelo de Langmuir permitindo a determinação da variação da energia livre de adsorção, ΔG_{ads} , como $-35,9$, $-38,5$ e $-34,9$ kJ mol⁻¹, respectivamente. Estes valores são indicativos de interação forte sendo característicos de processos de quimissorção. Para o modelo de Frumkin, os dados apresentaram melhores correlações quando o parâmetro de interação (g) foi fixado em $-0,45$, $-0,30$ e $-0,10$, respectivamente, para as SAMs de Hpyt, TNA e iTNA indicando interações repulsivas entre as moléculas adjacentes. Os valores de pKa das SAMs de Hpyt (4,2), TNA (5,0 e 8,5) e iTNA (4,5 e 7,9) foi determinado por voltametria utilizando-se o íon complexo [Fe(CN)₆]³⁻. Neste estudo, foram sugeridas modificações, uma vez que o método proposto na literatura dificulta a determinação de mais de um valor de pKa como observado para as moléculas de TNA e iTNA. As reações de transferência de elétrons (TE) das metaloproteínas citocromo c (cyt c) e mioglobina (Mb) foram estudadas utilizando-se as SAMs de Hpyt, TNA, iTNA, pyS e 1,4-dt. Para as SAMs de TNA e iTNA, o deslocamento positivo de 0,2V no valor do potencial de meia-onda do cyt c (pH~7,0) em relação a forma nativa, foi atribuído à densidade de carga positiva resultante da protonação do grupo NH₂ (pKa ~ 8,0). Resultados de QCM e SPR indicaram que há a formação de uma monocamada de cyt c sobre as SAMs estudadas. Esta monocamada, embora não sendo redox ativa, permite o estudo da reação de TE das moléculas de cyt c em solução sugerindo que este processo pode envolver os orbitais das moléculas modificadoras. Para a metaloproteína Mb, utilizou-se uma SAM formada pelo aminoácido L-cisteína (cys), uma vez que nenhuma das SAMs estudadas acessou a reação de TE. O processo redox foi observado em 0,086 V o que sugere a forma nativa. Os dados de QCM e SPR indicaram, também, a formação de uma monocamada sobre a SAM de cys (Au/cys/Mb). Valores de $-49,67$ kJ mol⁻¹ e $-0,15$ para ΔG_{ads} e g , respectivamente, foram calculados para a formação da monocamada de Mb sobre a SAM de cys. O eletrodo Au/cys/Mb apresentou atividade catalítica em relação a reação de oxidação do ácido ascórbico com uma diminuição de 400 mV no sobrepotencial e uma reação cineticamente controlada com uma constante de velocidade, k_p , de $\sim 2,0 \times 10^4$ L mol⁻¹ s⁻¹.

ABSTRACT

Electrochemical techniques, quartz crystal microbalance (QCM) and surface plasmons resonance (SPR) were used to study the formation of self-assembled monolayers (SAMs) of 1,4-dithio (1,4-dt), 4-mercaptopyridine (pyS), 5-(4-pyridinyl)-1,3,4-oxadiazole-2-thiol (Hpyt), thionicotinamide (TNA) and thioisonicotinamide (iTNA) as a result of the immersion of gold substrates into the respective solutions. STM (Scanning Tunneling Microscopy) images indicate the sulfur atom as the adsorption site of these molecules and a hexagonal conformation on surface. For the iTNA molecule, the images were not conclusive. In addition, the images indicated the existence of defects even after longer immersion times (24 h). Thermodynamic and kinetic aspects of the adsorption process were evaluated by reductive desorption in alkaline media and QCM. The reductive desorption potentials, E_{dr} , were observed at -0.9 , -0.8 , and -0.5 V vs. Ag/AgCl for the desorption of iTNA, TNA and Hpyt, respectively. In comparison to 1,4-dt (-0.8 V) and pyS (-0.5 V) species, the E_{dr} value of Hpyt indicates a σ interaction whereas those of iTNA and TNA indicate an additional π contribution. The values of the concentration of adsorbed material, Γ , and fractional coverage ($\theta \sim 0.9$), determined, respectively, by reductive desorption and impedance are consistent with the STM images. In comparison to the desorption data, the higher values of Γ calculated by QCM were assigned to the presence of water molecules since a linear relation was observed between the dipole moment and the mass change calculated by QCM. The desorption curves acquired for the pyS SAM indicated the decomposition of the monolayer thus not allowing the determination of the thermodynamic and kinetic parameters of adsorption. In comparison with the results obtained for the electrode modified after immersion in Na_2S solution, it was suggested that this process is associated to the cleavage of the C—S bond which results in the formation of an adlayer composed of atomic and/or oligomeric sulfur species. The adsorption isotherms for Hpyt, TNA and iTNA fitted the Langmuir model of adsorption allowing the determination of the free energy of adsorption, ΔG_{ads} , as -35.9 , -38.5 and -34.9 kJ/mol, respectively. These values are indicative of strong interaction being typical of chemisorption. For the Frumkin model, the best correlation was found when the interaction parameter, g , was established as -0.45 , -0.20 and -0.10 for Hpyt, TNA and iTNA, respectively, indicating repulsive interactions between the adjacent molecules. Cyclic voltammetry was used to determine the pKa of the SAMs of Hpyt (4.2), TNA (5.0 and 8.5) and iTNA (4.5 and 7.9) by using $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ as a probe molecule. For this study, some changes were suggested since in the method proposed in the literature the existence of more than one protonation site was not considered thus not allowing the determination of more than one pKa value as was observed for TNA and iTNA molecules. Electron transfer reactions (TE) of cytochrome c (cyt c) and myoglobin (Mb) metalloproteins were studied by using the SAMs of Hpyt, TNA, iTNA, pyS and 1,4-dt. For the SAMs formed with TNA and iTNA, the positive shift of 0.2V on the half-wave potential of cyt c in relation to that of the native protein, was assigned to the positive charge density on surface in consequence of the protonation of NH_2 groups (pKa \sim 8.0) since these measurements were carried out in physiological medium. QCM and SPR data indicated the formation of a monolayer of cyt c on the studied SAMs. This monolayer, although not being electroactive, allows the study of the TE reaction of the cyt c molecules in solution suggesting that this process involves the orbitals of the modifier molecules. For the Mb metalloprotein, a SAM of L-cysteine amino acid was used since none of the studied sulfur molecules was able to access the TE reaction. The redox process was observed at 0.086 V suggesting the native form of Mb. QCM and SPR data indicated, also, the formation of a monolayer of Mb on the cys SAM (Au/cys/Mb). Values of -49.67 kJ mol $^{-1}$ and -0.15 for ΔG_{ads} and g , respectively, were calculated for the formation of the monolayer of Mb on the cys SAM. The electrode Au/cys/Mb presented catalytic activity toward the oxidation reaction of ascorbic acid presenting a decrease of 400 mV in the overpotential and a kinetic controlled with a rate constant, k_f , of 2.0×10^4 L mol $^{-1}$ s $^{-1}$.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	xiii
ABREVIATURAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Monocamadas Automontadas	1
1.2 Citocromo c.....	7
1.3 Estudos Eletroquímicos do cyt c.....	9
1.4 Efeito da Monocamada na TE do cyt c.....	11
1.5 Interação Monocamada/cyt c	18
1.6 Mioglobina.....	23
1.7 Estudos eletroquímicos da Mb.....	24
2. OBJETIVOS	27
2.1 Formação e caracterização das monocamadas.....	27
2.2 Aplicação das Monocamadas Formadas	27
2.2.1 Estudo da reação de TE do cyt c.....	28
2.2.2 Estudo da reação de TE da Mb	28
2.3 Estudo da Reação de TE da Mb utilizando a monocamada de cisteína (cys)..	28
2.3.1 Imobilização da Mb na monocamada de cys	28
2.3.2 Aplicação do eletrodo Au/cys/Mb	28
3. PARTE EXPERIMENTAL	29
3.1 Reagentes e Soluções	29
3.2 Materiais e instrumentos	30
3.2.1 Medidas Eletroquímicas.....	30
3.2.2 Pré-tratamento do Eletrodo de Ouro Policristalino.....	31
3.2.3 Avaliação da Área Ativa do Eletrodo de Ouro Policristalino.....	31

3.2.4	Cálculos teóricos	32
3.2.5	Formação das Monocamadas Automontadas.....	32
3.2.6	Impedância Eletroquímica (EIS – “Electrochemical Impedance Spectroscopy”)	32
3.2.7	Microbalança de Cristal de Quartzo(QCM).....	33
3.2.8	Ressonância de Plásmons de Superfície	34
3.2.9	Microscopia de Varredura por Tunelamento (STM –“Scanning Tunneling Microscope”).....	35
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	Formação e Caracterização das Monocamadas Automontadas	37
4.1.1	Desorção Redutiva	39
4.1.2	Cinética e Termodinâmica de Adsorção	41
4.1.3	Microbalança de Cristal de Quartzo (Quartz Crystal Microbalance - QCM) ..	51
4.1.4	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)	55
4.1.5	pKa de Superfície Modificada	60
4.1.6	Microscopia de Varredura por Tunelamento (STM)	70
4.2	Aplicação das monocamadas	79
4.2.1	Estudos da TE do citocromo c (cyt c).....	79
4.2.1.1	Acompanhamento via QCM	83
4.2.1.2	Acompanhamento via SPR	86
4.2.2	Estudos da TE da Mioglobina (Mb).....	93
4.2.2.1	Acompanhamento via SPR	94
4.3	Imobilização da Mb sobre a monocamada de L-cisteína.....	95
4.3.1	Influência do pH e da força iônica na reação TE da Mb	98
4.3.2	Estudo cinético e termodinâmico da adsorção da Mb sobre a monocamada de cys	100
4.3.3	Acompanhamento via QCM	102
4.4	Aplicação do eletrodo Au/cys/Mb para catálise de ácido ascórbico.....	103

5.	CONCLUSÃO	110
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
	Apêndice A.....	125
	Apêndice B	126
	Apêndice C.....	126

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** – Modelo esquemático de uma monocamada automontada sobre uma superfície sólida..... 1
- Figura 1.2** – Representação das geometrias utilizadas nos cálculos teóricos para quimissorção de enxofre sobre estrutura monocristalina hexagonal ($\sqrt{3} \times \sqrt{3} R 30^\circ$) de ouro. Comprimentos de ligação são em Å e ângulos de ligação estão em grau. A distância Au–Au é fixada em 2,884 Å..... 3
- Figura 1.3** – Representação esquemática das interações entre SCH₃ e superfícies para diferentes modelos de adsorção. Adaptado da referência 26..... 5
- Figura 1.4**– (A) Estrutura tridimensional do cyt c de coração de cavalo. (B) Estrutura química detalhada do grupo heme..... 8
- Figura 1.5** – Voltamogramas cíclicos para o eletrodo de ouro na presença de (A) 4,4'-bpy e (B) pySSpy em NaClO₄ 0,1 mol L⁻¹ e tampão fosfato 0,02 mol L⁻¹ pH 7 contendo cyt c 0,40 mmol L⁻¹. Potencial em V vs. SCE (eletrodo de calomelano saturado - “*saturated calomel electrode*”) e velocidade de varredura (v): (A) [a] 20, [b] 50 e [c] 100 mV s⁻¹ e (B) [a] 50, [b] 100, [c] 200 mV s⁻¹. Gráficos adaptados das referências 4 e 46..... 11
- Figura 1.6** - Voltamogramas cíclicos para o eletrodo Au/SR na presença em tampão fosfato 1,0 mmol L⁻¹ pH 7, obtidos após 30 min de imersão em solução contendo cyt c 0,10 mmol L⁻¹. Onde, SR corresponde: (a) S(CH₂)₁₁N⁺(CH₃)₃, (b) S(CH₂)₁₀COOH, (c) S(CH₂)₁₁CH₃, (d) S(CH₂)₁₁SO₃⁻, (e) S(CH₂)(C₆H₄)-(C₆H₅), (f) S(CH₂)₁₁(OCH₂CH₂)₃OH, e (g) S(CH₂)₁₁NH₂. $v = 0.1$ Vs⁻¹ em a-f e 1,0 Vs⁻¹ em g. Linha tracejada: voltamogramas cíclicos para o eletrodo modificado com as respectivas monocamadas antes da imersão em solução de cyt c. Adaptado da referência 57..... 14
- Figura 1.7** – Sensorgramas para a relação entre a variação do ângulo SPR (ΔRU) e o tempo de imersão do eletrodo de ouro modificada com: S(CH₂)₁₁N⁺(CH₃)₃, S(CH₂)₁₁CH₃, S(CH₂)₁₁SO₃⁻ e S(CH₂)₁₁(EG)₃OH na presença de cyt c 0,10 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 1,0 mmol L⁻¹ pH 7. Gráfico adaptado da referência 57..... 15
- Figura 1.8** – Comportamento do $\log(k_o)$ para o cyt c como uma função do número de grupos metileno da monocamada composta por SH(CH₂)_nCOOH sobre ouro..... 17

Figura 1.9 – Diagrama da interação covalente entre monocamada/cyt c resultante da formação de ligações amida entre o grupo terminal –COOH da monocamada mista formadas pelos grupos HS(CH ₂) ₅ COOH e HS(CH ₂) ₄ OH) e resíduos lisina do cyt c.....	20
Figura 1.10 – (A) Diagrama esquemático da estratégia de imobilização do cyt c na monocamada mista formada pelos compostos HS(CH ₃) ₁₀ e HS(CH ₃) ₁₁ COOC ₅ H ₄ N ilustrados em (B). (C) Ilustração da imobilização do cyt c na superfície da monocamada.....	20
Figura 1.11 – (A) Estrutura tridimensional da mioglobina (Fe(III)) de músculo esquelético de equinos. (B) Estrutura detalhada do grupo heme da Mb.....	24
Figura 2.1 – Estruturas dos compostos sulfurados: 1,4-ditiano (1,4-dt), 4-mercaptopiridina (pyS), 5-(4-piridil)-1,3,4-oxadiazol-2-tiol (Hpyt), tionicotinamida (TNA) e isotionicotinamida (iTNA).....	27
Figura 3.1 – Frequencímetro (PM-740, Maxtek) e eletrodos comerciais com ouro depositado sobre cristais piezelétricos.....	33
Figura 3.2 – Instrumento AUTOLAB ESPRIT Eco Chemie B. V., Utrech, Netherlands.....	35
Figura 4.1 – Representação da distribuição do orbital HOMO calculado para as moléculas Hpyt, TNA, iTNA, pyS e 1,4-dt.....	38
Figura 4.2 – Voltamogramas de varredura linear (LSV) a 50 mV s ⁻¹ para o eletrodo de ouro modificado com as espécies iTNA, TNA e Hpyt obtidos em KOH 0,5 mol L ⁻¹ . Tempo de imersão (valores descritos na Tabela 4.1) na solução modificadora (2,0 mmol L ⁻¹).....	40
Figura 4.3 – Dados experimentais para a adsorção de (▽)TNA, (○) Hpyt e (□) iTNA sobre o eletrodo Au a 20 °C.e dados simulados (linha tracejada) para a isoterma de Langmuir linearizada.....	44
Figura 4.4 – Dados experimentais (o) e as curvas teóricas para a isoterma de Langmuir (curvas sólidas) e Frumkin (curvas tracejadas), com $g = -0,10, -0,20$ e $-0,45$ para a adsorção das monocamadas de iTNA, TNA e Hpyt, respectivamente. $T = 20^{\circ}\text{C}$	46

- Figura 4.5** – Variação de Γ em função do tempo de imersão para o processo de adsorção de iTNA, TNA e Hpyt a 20°C com a concentração das soluções modificadoras de 0,2 mmol L⁻¹. Dados experimentais para (▲) TNA, (□) Hpyt e (★) iTNA e curva simulada (linha sólida) a partir da Equação 4.15 com k' e Γ_e como parâmetro ajustável..... 49
- Figura 4.6** – Γ/Γ_e vs. $t^{1/2}$ para a adsorção de (A) iTNA, (B) TNA e (C) Hpyt sobre o eletrodo de Au a 20°C e com a concentração da espécie modificadora de 0,2 mmol L⁻¹. As curvas sólidas e pontilhadas referem-se à simulação, respectivamente, para um processo controlado cineticamente (Equação 4.15) e por difusão (Equação 4.16)..... 50
- Figura 4.7** – Gráfico de variação da frequência do cristal em relação ao tempo de imersão em soluções aquosas contendo 0,1 mmol L⁻¹ dos compostos: (●)TNA, (▲)iTNA, (◇)Hpyt, (★)pyS e (□) 1,4-dt a 25 °C..... 52
- Figura 4.8** – Valores do momento de dipolo calculados para as moléculas de TNA, iTNA, Hpyt, pyS e 1,4-dt em função da quantidade de moléculas de água co-adsorvidas nas respectivas monocamadas..... 54
- Figura 4.9** – Representação esquemática de uma resposta de impedância eletroquímica para um sistema onde ocorre transferência de carga de uma espécie eletroativa controlada por difusão. $Z_{Real} = R_{\Omega} + \frac{R_{CT}}{1 + \omega^2 C_d^2 R_{CT}^2}$ e $Z_{Imaginário} = \frac{\omega^2 C_d^2 R_{CT}^2}{1 + \omega^2 C_d^2 R_{CT}^2}$ onde R_{Ω} - resistência da solução, R_{CT} - resistência à transferência de carga, ω - frequência angular e C_d - capacitância da dupla camada elétrica..... 56
- Figura 4.10** – Diagramas de EIE obtidos em solução contendo KCl 0,1 mol L⁻¹ e 8,0 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]³⁻ + 8,0 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]⁴⁻ para o eletrodo de ouro limpo (●) e para os eletrodos modificados com (A) Hpyt, (B) iTNA e (C) TNA após 5 min (◇), 30 min (□) e 1440 min (★) de imersão em solução 2,0 mmol L⁻¹ das espécies modificadoras..... 57
- Figura 4.11** – Representação esquemática da interação da monocamada com o íon complexo [Fe(CN)₆]³⁻ em função do pH da solução eletrolítica..... 60

Figura 4.12 – Representação esquemática da curva i vs. pH.....	62
Figura 4.13 – Representação esquemática da curva Q vs. pH para espécies com dois valores de pK_a	63
Figura 4.14 – Voltamogramas cíclicos para o eletrodo Au/TNA na presença de $[Fe(CN)_6]^{3-}$ em (A) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e KCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ a 100 mV s^{-1} (método de Zhao) e (B) $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e KCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ a 15 mV s^{-1} . Comportamento em função do pH da solução eletrolítica para corrente de pico anódica (C) dos voltamogramas em A e da carga anódica (D) nos voltamogramas em B.....	64
Figura 4.15 – Relação entre a carga e o valor do pH da solução eletrolítica. Dados experimentais para as monocamadas formadas por: (Δ) iTNA, (\circ) TNA, (\diamond) Hpyt, (\square) 1,4-dt e (\star) pyS e Curvas simuladas a partir das Equações 4.24 para Hpyt e pyS (linhas tracejadas) e 4.25 para TNA e iTNA (linhas pontilhada). Tempo de imersão de 1h.....	65
Figura 4.16 – Voltamogramas de varredura linear (LSV) a 50 mV s^{-1} para o eletrodo de ouro modificado com as espécies pyS (após as medidas para determinação do pK_a) e S^{2-} obtidos em KOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	69
Figura 4.17 – Imagem de STM em baixa resolução para Hpyt sobre Au(111). Tempo de imersão de 24h em solução de Hpyt $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$	72
Figura 4.18 – Imagens de STM em alta resolução para amostra de ouro limpa (a) e modificada com Hpyt (b) após 30 min de imersão em solução de Hpyt $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$	73
Figure 4.19 – Imagem de STM em baixa resolução para TNA sobre Au(111). Tempo de imersão de 24h em solução de TNA $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$	74
Figura 4.20 – Imagem de STM em baixa resolução para TNA sobre Au(111). Tempo de imersão de 30 min em solução de TNA $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$	75
Figura 4.21 – Imagem de STM em alta resolução para TNA sobre Au(111). Tempo de imersão de 24 h em solução de TNA $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$	76
Figura 4.22 – Imagem de STM em baixa resolução para iTNA sobre Au(111). Tempo de imersão de 24h em solução de iTNA $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Resistência de tunelamento (A)133 e (B) 240 $G\Omega$	78

Figura 4.23 – Voltamogramas cíclicos a 100 mV s^{-1} em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 7,0, contendo cyt c $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para o eletrodo de ouro policristalino, após a imersão por 60 min em soluções contendo (A) Hpyt, (B) TNA e (C) iTNA (–) 1º e (—) 2º ciclo de varredura.....	80
Figura 4.24 – Representação hipotética da orientação da monocamada de iTNA.....	81
Figura 4.25 – Voltamogramas cíclicos a 100 mV s^{-1} para o eletrodo de ouro, após a imersão em soluções contendo diferentes proporções de Hpyt e POT, na presença de cyt c $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 7,0.....	82
Figura 4.26 – (A) Variação da frequência do eletrodo de Au previamente modificado (tempo de imersão de 1h) com (—)TNA, (—)iTNA,(—)Hpyt, (—)pyS e(—)1,4-dt após injeção de cyt c $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e (B) os respectivos voltamogramas cíclicos obtidos durante as medidas de QCM.....	84
Figura 4.27 – Voltamogramas cíclicos obtidos (linha pontilhada) para o eletrodo Au/Hpyt na presença de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (—) durante o monitoramento via QCM (—) após a estabilização da frequência sendo obtido na ausência de cyt c e (—) após a reinserção de cyt c $100 \mu\text{mol L}^{-1}$	85
Figura 4.28 – (A) Representação esquemática da configuração de Kretchmann para SPR. (B) Curvas de refletância na ausência (θ_{SPR1}) e presença (θ_{SPR2}) de espécies na superfície do filme metálico; (C) Relação entre θ_{SPR} e tempo durante a interação de espécies com a superfície do filme metálico.....	87
Figura 4.29 – Variação de θ em função do tempo para a adsorção do cyt c ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) sobre as monocamadas de (A) pyS, (B) iTNA, (C) 1,4-dt, (D) TNA e (E) Hpyt (tempo de imersão de 1h).....	89
Figura 4.30 – Comparação entre os valores Δm de cyt c determinados via QCM e SPR.....	91
Figura 4.31 – (A) Variação de θ em função do tempo para as etapas de modificação do disco de ouro com Hpyt e cyt c. (B) Voltamogramas cíclicos realizados durante a modificação do eletrodo.....	92
Figura 4.32 – Comparação dos voltamogramas cíclicos a 100 mV s^{-1} para o eletrodo de ouro modificado com várias moléculas sulfuradas na presença de Mb $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 6,5.....	93

Figura 4.33 –	Varição de θ em função do tempo para a adsorção de Mb ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) sobre as monocamadas de (A) TNA, (B)Hpyt, (C)pyS, (D)iTNA e (E)1,4-dt (tempo de imersão de 1h para a formação das monocamadas).....	94
Figura 4.34 –	Voltamogramas cíclicos a $0,10 \text{ V s}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5, para o Au limpo na presença de (—) Mb $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, (—) Cys $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e para Au/Cys na presença de (—) Mb $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e para o eletrodo Au/cys/Mb na presença de (—) tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	96
Figura 4.35 –	(A) Voltamogramas cíclicos em várias velocidades de varredura para o eletrodo Au/Cys/Mb na presença de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,5 e (B) Relação linear entre a i_p catódico e anódico coma a v . (C) Gráfico de $\log v$ vs. a potencial (E_p) de oxidação e redução para o eletrodo Au/Cys/Mb na presença de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5.....	97
Figura 4.36 –	(A) Voltamograma cíclico para o eletrodo Au/Cys/Mb a $0,1 \text{ V s}^{-1}$ na presença de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH. Gráficos de (B) $E_{1/2}$ vs. pH e (C) $E_{1/2}$ vs. o inverso da raiz quadrada da força iônica (μ).....	99
Figura 4.37 –	(A) Isoterma de adsorção da Mb sobre o eletrodo Au/Cys e as curvas teóricas para a isoterma de Langmuir (curva sólida) e Frumkin (curva tracejada), com $g = -0,15$. (B) Isoterma de Langmuir linearizada.....	100
Figura 4.38 –	(A) Gráfico de Γ_t vs. t e (B) I/I_s vs. $t^{1/2}$ para a adsorção de Mb sobre o eletrodo Au/Cys para diferentes concentrações.....	101
Figura 4.39 –	Curva observada (linha solida) e calculada (círculos abertos) da variação da frequência vs. o tempo para a adsorção de Mb sobre Au/cys. Figura anexada: voltamograma cíclico a 100 mV s^{-1} para o eletrodo Au/cys (cristal de Au) em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ contendo Mb $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ após 5000s de imersão....	103
Figura 4.40 –	Voltamogramas cíclicos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) contendo AA $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para os eletrodos (A) Au/cys/Mb (linha sólida) e Au (linha pontilhada) a 100 mV s^{-1} e para o eletrodo (B) Au/cys/Mb em diferentes... velocidades de varredura (v) (a) 10, (b) 25, (c) 50, (d) 75, (e) 150, (f) 250, (g) 300, (h) 400 e (i) 500 mV s^{-1} . (C) Gráfico da corrente catalítica (o), i , vs. $v^{1/2}$ e da (●) corrente normalizada, $i/v^{1/2}$ vs. v	105
Figura 4.41 –	Representação do processo electrocatalítico do AA mediante o eletrodo Au/cys/Mb. k_f é a constante de velocidade.....	106

Figura 4.42 – Modelo teórico de Saveant para o comportamento da corrente catalítica em função da constante de velocidade k_f	107
Figura 4.43 – (A) voltamogramas RDE a $0,01 \text{ V s}^{-1}$ para Au/cys/Mb em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) contendo AA $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Gráficos de Levich (B) e Koutecky–Levich (C) a $0,40\text{V}$ para a reação de oxidação de AA.....	108
Figure 4.44 – Voltamogramas cíclicos para o eletrodo Au/cys/Mb a $0,1 \text{ V s}^{-1}$ Em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo diferentes concentrações de AA. Figura anexada: i_p vs. [AA].....	109
Esquema 1 – Diferentes equilíbrios sugeridos para a molécula pyS.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 –	Valores $E_{1/2}$ do cyt c para várias monocamadas de compostos sulfurados sobre ouro.....	22
Tabela 1.2 –	Valores $E_{1/2}$ da Mb para vários eletrodos.....	26
Tabela 4.1 –	Valores dos potenciais de desorção redutiva, E_{dr} , para algumas moléculas sulfuradas obtidos na presença de KOH 0,5 mol L ⁻¹	40
Tabela 4.2 –	Parâmetros termodinâmicos para o processo de adsorção das espécies iTNA, TNA e Hpyt sobre ouro.....	45
Tabela 4.3 –	Parâmetros cinéticos para a adsorção das monocamadas de iTNA, TNA e Hpyt.....	48
Tabela 4.4 –	Comparação dos valores da variação de massa (Δm_{QCM}) observada via QCM e calculada por voltametria (Δm_{DR}).....	53
Tabela 4.5 –	Correlação dos valores de resistência a transferência de carga (R_{TC}), taxa de recobrimento (θ) e constante de velocidade de transferência de carga (k_{app}) do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em função do tempo de imersão do eletrodo de ouro nas soluções modificadoras de Hpyt, iTNA, TNA, pyS e 1,4-dt.....	59
Tabela 4.6 –	Valores de pKa em solução e de superfície para as monocamadas automontadas formadas por: iTNA, TNA, Hpyt, pyS e 1,4-dt.....	67
Tabela 4.7 –	Valores de pKa em solução para alguns derivados piridínicos.....	67
Tabela 4.8 –	Valores de Δm e Γ para a adsorção de cyt c sobre as monocamadas de pyS, iTNA, 1,4-dt, TNA e Hpyt.....	85
Tabela 4.9 –	Valores de $\Delta\theta$, Δm e Γ para a adsorção de cyt c sobre as monocamadas de pyS, iTNA, 1,4-dt, TNA e Hpyt.....	90
Tabela 4.10 –	Valores de $\Delta\theta$, Δm e Γ para a adsorção de Mb sobre as monocamadas de pyS, iTNA, 1,4-dt, TNA e Hpyt.....	95
Tabela 4.11 –	Parâmetros k' e Γ_e para a adsorção de Mb sobre o eletrodo Au/cys.....	102

ABREVIATURAS

1,4-dt – 1,4-ditiano
2,2'-bpy – 2,2'-bipiridina
4,4'-bpy – 4,4'-bipiridina
Å – Angstroms
 A_{ativa} – Área eletroquimicamente ativa do eletrodo
Ag/AgCl/Cl⁻ – Eletrodo de prata cloreto de prata
 C^* - Concentração da solução
CCO – Citocromo c oxidase
 C_d – capacitância da dupla camada elétrica.
cyt c – citocromo c
D – Coeficiente de difusão
DDAB – Brometo de didecildimetilamônio
deoxiMb – Mioglobina penta coordenada
DMSO- dimetilsulfóxido
 $E_{1/2}$ – Potencial formal de meia-onda
 E_{dr} – Potencial de desorção redutiva
EIE – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS – “*Electrochemical Impedance Spectroscopy*”);
 F – Constante de Faraday (96485 C mol⁻¹)
Fcc – Rede cúbica de face centrada (“*face-centered cubic*”)
g – Parâmetro de interação
GC – Carbono vítreo
Hcp – Rede hexagonal fechada (“*hexagonal close-packed*”).
Hcy – DL-homocisteína
His – Aminoácido Histidina
HOMO – Orbital molecular ocupado de maior energia (“*Highest Occupied Molecular Orbital*”)
Hpyt – 5-(4-piridil)-1,3,4-oxadiazol-2-tiol
Im – grupo imidazólico
iTNA – Isotonicotinamida
ITO – Eletrodo de estanho dopado com índio
 k_0 – Constante de velocidade da reação heterogênea de TE
 k_f – Constante de velocidade
Mb - Mioglobina
Met – Aminoácido Metionina
MWCNTs – nanotubos de carbono com multicamadas
NPAu – ouro nanopiramidal
PG – Grafite pirolítico
py – grupo piridínico
pyS – 4-mercaptopiridina
pySpy – bis(4-piridil)sulfeto
pySSpy – bis(4-piridil)dissulfeto
QCM – Microbalança de Cristal de Quartzo (“*Quartz Crystal Microbalance*”)

R – Constante dos gases
 R_{CT} – resistência à transferência de carga
RDE – Eletrodo de disco rotatório (“*Rotating Disk Electrode*”)
ROS – Espécies reativas de oxigênio
RRDE – Eletrodo de disco-anel rotatório (“*Rotating Ring-Disk Electrode*”)
 R_{Ω} – resistência da solução
SAMs – monocamadas automontadas (“*Self-Assembled Monolayers*”)
SCE – Eletrodo de calomelano saturado (“*saturated calomel electrode*”)
SERS – Espalhamento Raman Intensificado pela Superfície (“*Surface-Enhanced Raman Scattering*”)
SOD – Metaloenzima bovina cobre-zinco superóxido dismutase (“*copper-zinc superoxide dismutase*”)
SPR – Ressonância de Plásmons de superfície (“*Surface Plasmon Resonance*”)
STM – Microscopia de Varredura por Tunelamento (“*Scanning Tunneling Microscope*”)
 T – Temperatura absoluta
TE – Transferência de elétrons
TNA – Tionicotinamida
 $Z_{\text{imaginário}}$ – Impedância imaginária
 Z_{real} – Impedância imaginária
 β – Coeficiente de adsorção
 γ – Coeficiente de atividade
 Δf – Variação de frequência
 ΔG_{ads} – Energia livre de adsorção
 Δm_{DR} – Variação de massa calculada por desorção redutiva
 Δm_{QCM} – Variação de massa calculada por QCM
 Γ – Quantidade de moléculas adsorvidas
 Γ_e – Quantidade de moléculas adsorvidas no equilíbrio
 Γ_s – Quantidade máxima de moléculas adsorvidas
 $\bar{\mu}$ – Potencial eletroquímico
 ω – frequência angular

1. INTRODUÇÃO

1.1 Monocamadas Automontadas

Monocamadas automontadas (SAMs – “*Self-Assembled Monolayers*”)¹ são definidas como agregados moleculares formados espontaneamente sobre uma superfície sólida por adsorção de moléculas que apresentam uma região com forte afinidade à superfície e outra que apresenta fraca ou nenhuma afinidade. Do ponto de vista energético, as monocamadas automontadas são constituídas por três regiões², conforme é ilustrado na Figura 1.1.

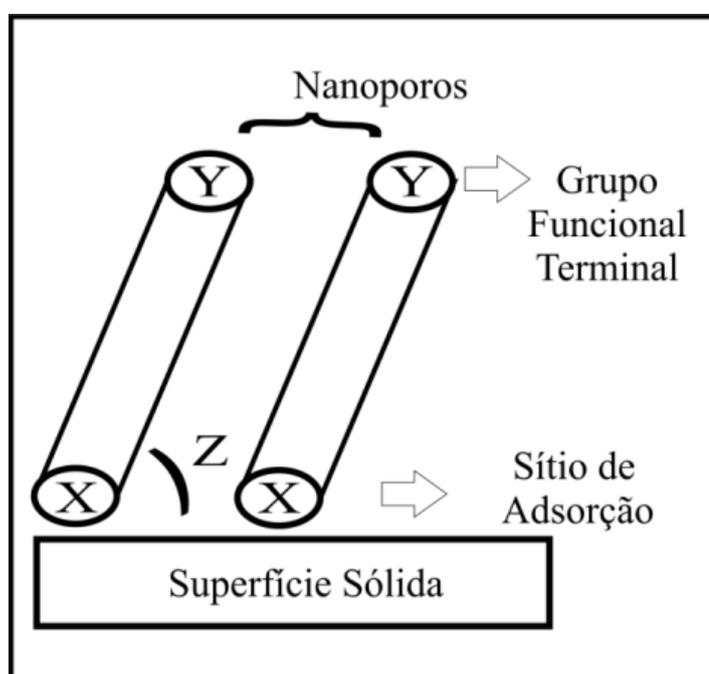


Figura 1.1 - Modelo esquemático de uma monocamada automontada sobre uma superfície sólida.

A primeira região (X) é o "grupo cabeça" que apresenta o sítio de adsorção com a superfície. A segunda região normalmente é uma cadeia orgânica intermediária constituída, nos sistemas mais simples, por uma cadeia alquila. A energia associada às interações intermoleculares entre as cadeias depende tanto da extensão como da densidade do empacotamento destas. Estas interações e a estrutura molecular do adsorbato podem induzir a uma dada inclinação (Z) em relação à superfície e a presença

de nanoporos que podem permitir o acesso à superfície. A terceira região (Y) é constituída de um grupo funcional terminal capaz de interagir com espécies presentes na fase em contato.

O primeiro exemplo de monocamada automontada foi atribuído à preparação de uma monocamada de um surfactante sobre uma superfície metálica por Zisman e colaboradores³ em 1946. Em 1982, Taniguchi e colaboradores⁴ utilizaram eletrodos de ouro modificados com bis(4-piridil)dissulfeto (pySSpy) e bis(4-piridil)sulfeto (pySpy) para estudar a reação de transferência de elétrons (TE) do citocromo c (cyt c). Entretanto, o início da investigação dos sistemas de monocamadas automontadas sobre superfícies metálicas é, geralmente, atribuído¹ ao estudo de Nuzzo e Allara⁵(1983) que prepararam monocamadas de compostos sulfurados sobre ouro por adsorção em soluções diluídas de dissulfetos.

O estudo sobre monocamadas tem focado vários sistemas, incluindo ácidos graxos em óxidos metálicos⁶, derivados de organosilanos em superfície hidroxilada⁷ e compostos sulfurados em superfícies metálicas^{2,8-21}. O último desses sistemas é amplamente estudado devido à combinação de alta ordenação estrutural¹⁰, diversidade de grupos terminais e facilidade de preparação e análise. Além disso, o ouro é o substrato mais utilizado devido, fundamentalmente, aos aspectos listados abaixo:

- (1) facilidade de obtenção;
- (2) inércia química em relação às reações de oxidação por oxigênio da atmosfera e às reações com a maioria dos reagentes químicos, exceto com aqueles que possuem enxofre, neste caso a reação é altamente espontânea¹¹;
- (3) emprego como substrato em várias técnicas, tais como: Ressonância de Plásmons de superfície (SPR – “*Surface Plasmon Resonance*”), Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM – “*Quartz Crystal Microbalance*”), Espalhamento Raman Intensificado pela Superfície (SERS – “*Surface-Enhanced Raman Scattering*”), Microscopia de Varredura por Tunelamento (STM – “*Scanning Tunneling Microscope*”) e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica, EIE, (EIS – “*Electrochemical Impedance Spectroscopy*”);
- (4) compatibilidade celular, ou seja, permite o estudo do comportamento celular sem apresentar toxicidade.

O procedimento vastamente empregado para formação^{1,8,22} de monocamadas automontadas sobre superfícies metálicas é a imersão desses substratos limpos em uma solução contendo um composto capaz de experimentar adsorção. Embora existam dúvidas relacionadas à interação adsorbato/substrato, diversos estudos^{2,23-26} vêm tentando descrever essa interação, principalmente de compostos sulfurados em superfície de ouro.

Alguns modelos^{2,26} são utilizados na investigação teórica da interação Au-S, conforme ilustrado na Figura 1.2.

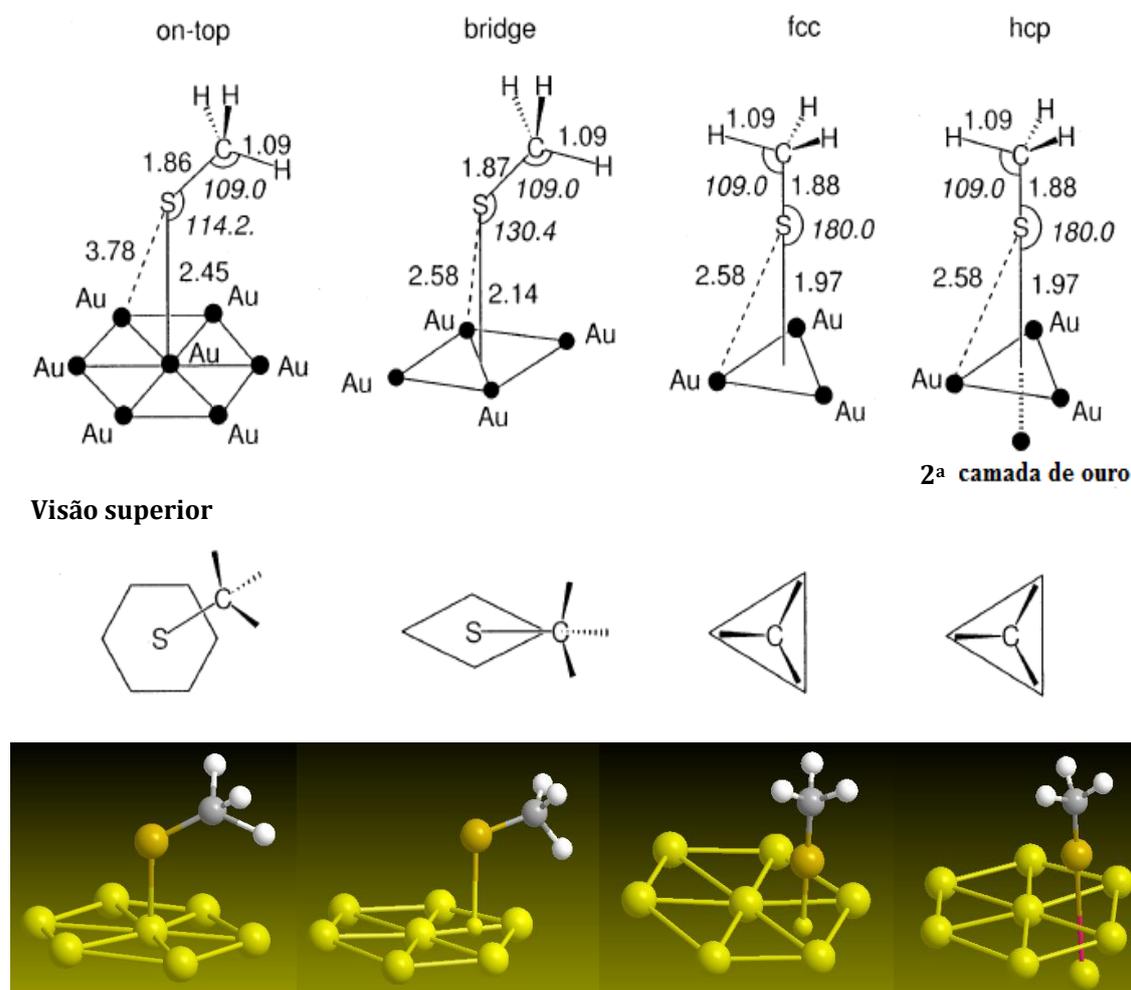


Figura 1.2– Representação das geometrias²⁶ utilizadas nos cálculos teóricos para quimissorção de enxofre sobre estrutura monocristalina hexagonal ($\sqrt{3}\times\sqrt{3}R30^\circ$) de ouro. Comprimentos de ligação estão em Å e ângulos de ligação estão em grau. A distância Au–Au é fixada em 2,884 Å.

De acordo com a figura acima, o enxofre pode interagir de diferentes maneiras com a superfície hexagonal ($\sqrt{3}\times\sqrt{3}R30^\circ$) de ouro monocristalino. A adsorção pode ocorrer na

camada de ouro mais externa envolvendo um átomo do metal, *on-top*, ou entre dois átomos do metal, *bridge*. A adsorção, também, pode ocorrer em uma região entre três átomos da camada mais externa da superfície podendo ser rede cúbica de face centrada (**fcc** “*face-centered cubic*”) ou rede hexagonal fechada (**hcp** “*hexagonal close-packed*”). A diferença entre **fcc** e **hcp** é a presença de um átomo da segunda camada de ouro logo abaixo do sítio de adsorção.

Sellers e colaboradores² utilizaram, pela primeira vez, o método *ab initio* para otimizar a geometria de –SH e –SCH₃ sobre modelos de superfície de ouro monocristalino (Au(111)). De acordo com os autores, para a adsorção em sítios *on-top*, a ligação entre a superfície e o enxofre tem, principalmente, caráter σ com uma pequena contribuição π . Esta ligação é concentrada, basicamente, sobre um único átomo do metal e o enxofre apresentando uma hibridização sp^3 comum ângulo de 109° para Au–S–R. Considerando o eixo z como eixo internuclear, a ligação σ é realizada principalmente pelos orbitais p_z do enxofre e o 6s do ouro, com contribuições significativas dos orbitais $6p_z$ e $5d_z^2$ do metal. Os orbitais p perpendiculares à superfície também podem contribuir para a ligação. Sellers² sugere que a ligação do átomo de enxofre a essas superfícies envolve vários átomos do metal e não pode ser interpretada em termos de um átomo de metal individual. A adsorção é mais estável quando o átomo de enxofre assume uma hibridização *sp* com um ângulo de 188° (Au–S–R) e penetra entre os espaços vazios na estrutura do metal. Dessa forma, o enxofre interage com vários átomos de ouro incluindo átomos da segunda camada mais externa.

De acordo com Hoffmann e colaboradores²⁶, a interação σ é dominante no modelo *on-top*. Para os modelos de *bridge*, *fcc* e *hcp* (Figura 1.3) a contribuição π é considerada corroborando os resultados teóricos de Sellers. Para Hoffmann²⁶ a interação π é mais intensa para a adsorção nos modelos *fcc* e *hcp* sendo maximizada quando o ângulo Au–S–CH₃ é de 180°. Hoffmann²⁶ determinou, também, que a adsorção seguindo os modelos *fcc* e *hcp* são energeticamente equivalentes indicando que a segunda camada de Au tem pouca influência. Dessa forma, foi sugerido que preferência para a adsorção de –SCH₃ segue a seguinte ordem: (*fcc* e *hcp*)>*bridge*>*on-top*.

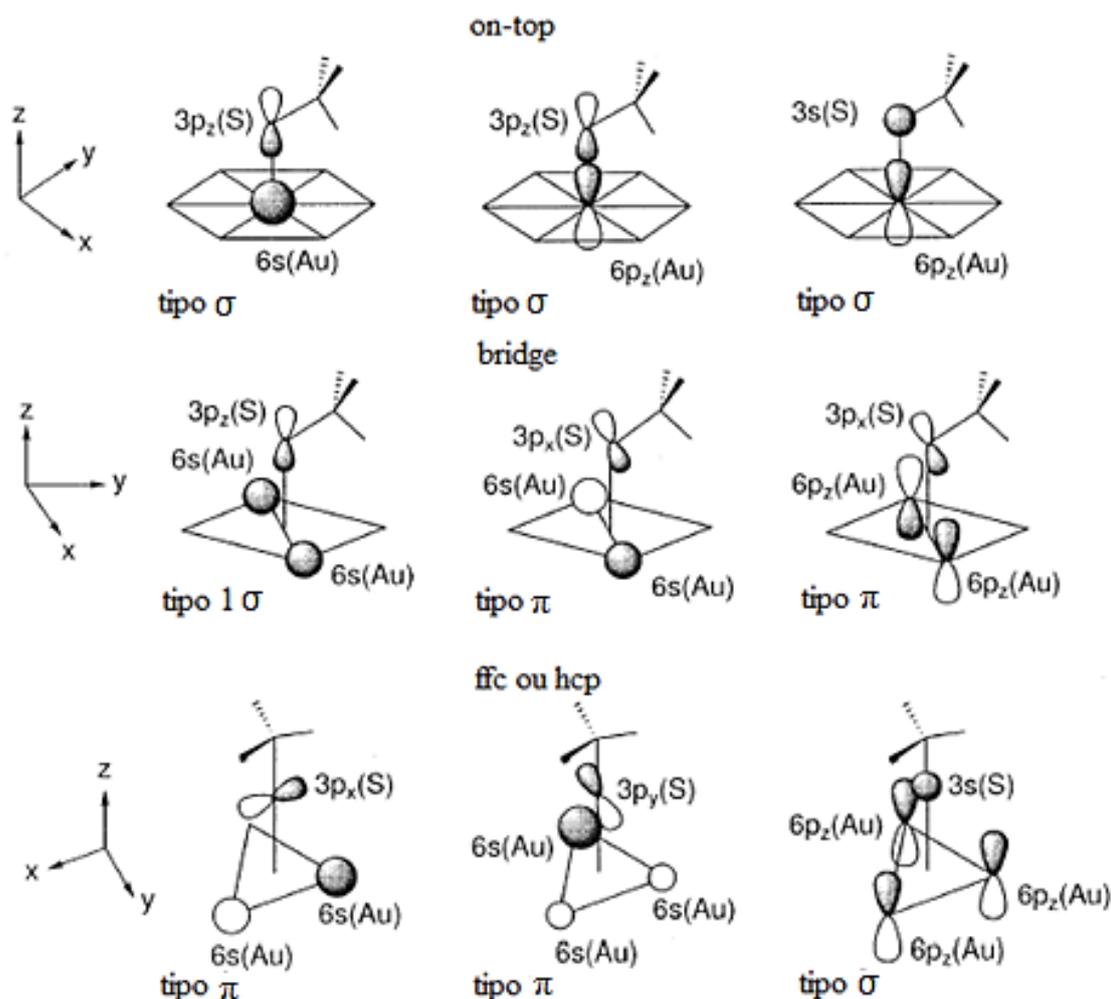


Figura 1.3 – Representação esquemática das interações entre SCH₃ e superfícies para diferentes modelos de adsorção. Adaptado da referência 26.

Compostos alcanotióis com diferentes características têm sido frequentemente estudados e incluem: *n*-alcanotióis (HS-(CH₂)_n-CH₃); alcanoditióis (HS-(CH₂)_n-SH); hidroxialcanotióis (HS-(CH₂)_n-OH); carboxialcanotióis (HS-(CH₂)_n-COOH); aminoalcanotióis (HS-(CH₂)_n-NH₂). Quando $n > 9$, estas monocamadas apresentam elevado grau de ordenação com distribuição molecular hexagonal²⁷ ($\sqrt{3} \times \sqrt{3} R 30^\circ$) e empacotamento com inclinação de 30° em relação ao plano da superfície. Para cadeias curtas²⁸, as monocamadas apresentam menor grau de ordenação demonstrando a importância¹ das forças de Van der Waals entre as cadeias paralelas. Dois modos de ligação têm sido atribuído a adsorção de alcanotióis sobre Au (111), um com ângulo (Au-

S-C) em torno de 180° (sp) e outro de 109° (sp^3). Desta forma, as interações laterais podem determinar o ângulo final (Au-S-C).

Monocamadas automontadas de tióis aromáticos²⁹ também têm sido estudadas para modificar superfícies metálicas para uma variedade de aplicações^{8,29,30}. A adsorção de tióis aromáticos inclui: tiofenóis, benzenotióis e mercaptopiridinas dentre outros. Esses tióis são interessantes por diversas razões, podendo-se citar:

– as moléculas são altamente anisotrópicas permitindo interações intermoleculares mais fortes do que entre alcanotióis, e pode levar a diferentes empacotamentos moleculares^{31,32}. O empilhamento π - π , por exemplo, favorece o alinhamento das moléculas de maneira semelhante a cadeias de polímeros;

– Os elétrons são mais deslocalizados do que nas cadeias de alcanos, o que significa uma maior condutância elétrica;

– Vários grupos funcionais podem ser introduzidos na extremidade oposta, que têm sido utilizadas para modificar as propriedades da superfície do eletrodo. Apesar do fato que várias monocamadas de compostos aromáticos tenham sido utilizadas, estas são menos compreendidas que aquelas formadas por alcanotióis.

Monocamadas podem ser utilizadas em diversas aplicações técnicas. A modulação de monocamadas permite desde a proteção da superfície contra corrosão até o uso como elemento ativo em sensores. Em todos os casos, o entendimento da formação e da estrutura da monocamada é um pré-requisito para o uso bem sucedido em aplicações técnicas. Dentre as aplicações mais importantes, estão inclusas:

- (1) proteção de superfície, como evitar corrosão e proteção mecânica;
- (2) ancoragem de biomoléculas, adsorção seletiva e biocompatibilidade;
- (3) modelo de superfícies químicas, como modulação de superfície com finalidades específicas para o controle de reações químicas;
- (4) propriedades eletrônicas, como transferência de elétrons através de moléculas e eletrônica molecular;
- (5) desenvolvimento de sensores específicos e seletivos.

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos é uma das áreas de maior e mais rápido crescimento dentro da Química Analítica. Isto é atribuído, principalmente, aos

novos desafios impostos por amostras de interesse industrial, clínico, biológico e ambiental que têm levado a uma crescente busca por sensores com melhores características, tais como: alta sensibilidade, seletividade e estabilidade^{31,32}. Alguns sensores atuais, entretanto, ainda apresentam limitações em relação a seletividade e tamanho. Sensores eletroquímicos baseados em monocamadas automontadas são bastante atrativos, pois podem combinar a alta sensibilidade dos métodos eletroquímicos tradicionais com as novas possibilidades do aumento da seletividade e estabilidade das monocamadas. Muitas das limitações atuais dos sensores eletroquímicos podem ser superadas pela modificação/planejamento das superfícies em escala molecular, adequando-se, desta forma, as necessidades específicas em função de sua aplicação. Assim, as monocamadas podem, também, contribuir para prover um ambiente favorável para a análise de compostos alvos, tornando o sensor menos susceptível as condições das amostras. Manipulações da arquitetura molecular superficial dos eletrodos podem oferecer novos níveis de reatividade e aplicabilidade. Esta manipulação permite a confecção de eletrodos mais seletivos e sensíveis para o estudo da transferência eletrônica direta entre materiais biocatalíticos e eletrodos além de proporcionar uma melhor compreensão dos mecanismos de inúmeros processos químicos e biológicos. Dentre estes podem se citar o estudo eletroquímico das metaloproteínas citocromo c (cyt c) e mioglobina (Mb) as quais exercem papéis fundamentais, respectivamente, de transferência de elétrons na cadeia respiratória e no armazenamento de oxigênio no tecido muscular.

1.2 Citocromo c

O citocromo c (cyt c) é uma metaloproteína mitocondrial evolutivamente conservada e largamente distribuídas nos organismos. O cyt c é uma das proteínas mais importante e extensivamente estudada, parcialmente devido à sua alta solubilidade em água em relação às outras metaloproteínas. A primeira estrutura dessa proteína, extraída de coração cavalo na forma oxidada, foi determinada³³ no final de década de 60 via Cristalografia de Raios-X com uma resolução de 4 Å. Estruturas em alta resolução foram subsequentemente publicadas³⁴ permitindo, desta forma, uma visão mais detalhada das propriedades estruturais básicas (Figura 1.4). Do ponto de vista estrutural, o cyt c é uma

proteína relativamente simples, constituída por apenas 104 aminoácidos e com massa molecular de 12384 Da. Apresenta, além disso, elevada densidade de carga positiva com carga líquida +8 em pH neutro e ponto isoelétrico (pI) de 9,6.

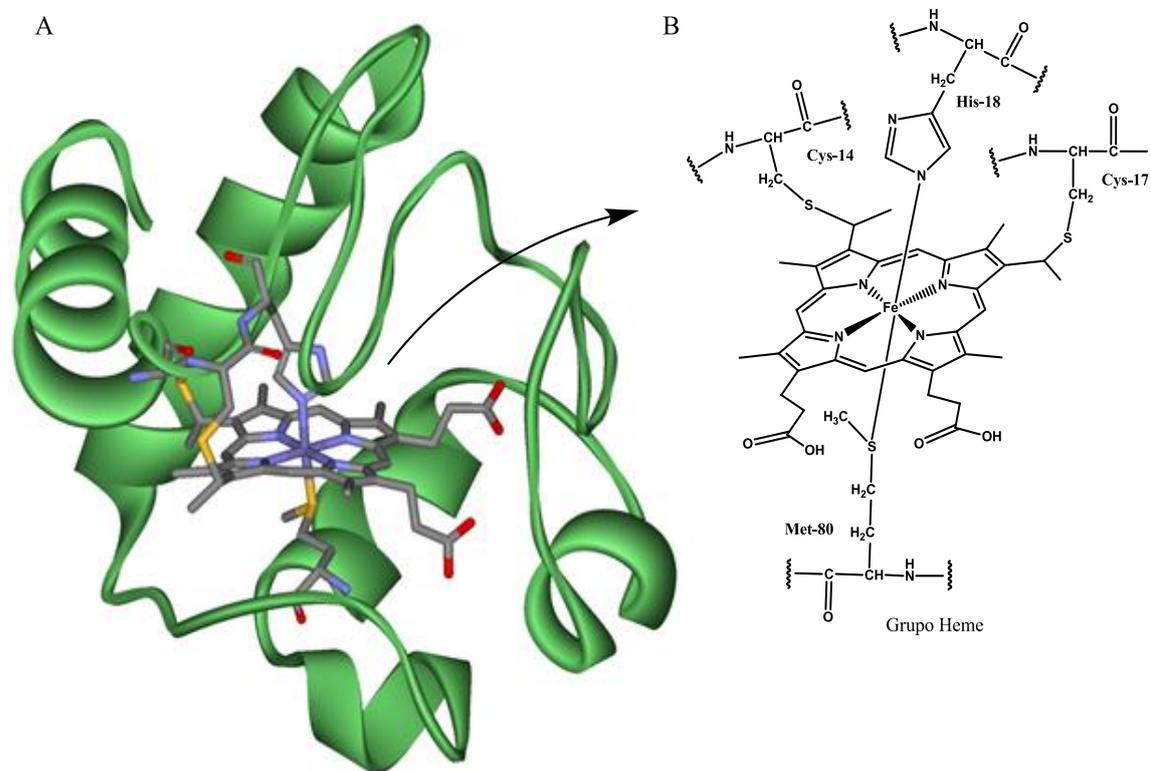


Figura 1.4 – (A) Estrutura tridimensional do cyt c de coração de cavalo³⁴. (B) Estrutura química detalhada do grupo heme.

O grupo heme do cyt c, tanto no estado oxidado Fe(III) como no reduzido Fe(II), apresenta uma configuração hexacoordenada complexada por quatro átomos de nitrogênio do anel porfirínico no plano equatorial, enquanto os aminoácidos histidina (His-18) e metionina (Met-80) atuam como ligantes axiais. Esse grupo é covalentemente ligado à cadeia peptídica por meio de ligações tioéter com os resíduos de cisteína (Cys-14 e Cys-17). A presença de aminoácidos alifáticos e aromáticos nas cadeias laterais da proteína fornece um ambiente hidrofóbico nas vizinhanças do grupo heme. De modo que somente 7,5% deste grupo encontra-se exposto ao solvente³⁴. Nessa região, possivelmente, encontra-se o sítio^{35,36} onde ocorre a transferência de elétrons (TE) para o citocromo c oxidase (CCO) durante o processo de respiração celular.

O cyt c é uma proteína multifuncional³⁷ que está envolvida nas decisões de vida e morte celular. *In vivo*, esta proteína transfere um elétron do complexo III para o complexo IV, componentes da cadeia transportadora de elétrons na membrana mitocondrial, durante a respiração celular. Sendo, portanto, uma parte indispensável do processo de produção de energia. A detecção de quatro sítios³⁸⁻⁴⁰ de fosforilação no cyt c sugere que as funções são reguladas por vias de sinalização celular. Esse efeito tem um papel essencial no controle da quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células com condições saudáveis. Durante estresse celular, em contra partida, o cyt c torna-se desfosforilado⁴⁰ e tem função na morte celular programada, apoptose. O conhecimento das vias específicas que operam estes mecanismos de regulação e os seus efeitos podem se tornar um caminho importante³⁷ para o direcionamento terapêutico de várias doenças humanas, incluindo doenças neurodegenerativas, insuficiência cardíaca congestiva e câncer.

1.3 Estudos Eletroquímicos do cyt c

Os primeiros estudos do cyt c aplicando técnicas eletroquímicas convencionais obtiveram sucesso limitado. A redução eletroquímica do cyt c (Fe(III)) de coração de cavalo utilizando eletrodos de mercúrio^{41,42} e de platina⁴³, por exemplo, apresentaram uma TE lenta com potencial de redução em aproximadamente $-1,0V$ vs. Ag/AgCl/Cl⁻. Resultados publicados posteriormente sugerem que os estudos eletroquímicos de proteínas são dificultados em parte, devido ao fato do grupo heme estar protegido pela superfície da proteína e, também, à forte adsorção em Pt, Hg, Au, Ag e outros eletrodos metálicos^{10,11}.

No final da década de 70, a eletroquímica direta do cyt c foi obtida por Yeh e Kuwana⁴⁴ utilizando eletrodo de estanho dopado com índio (ITO) e por Hill e colaboradores^{13,14} utilizando eletrodos de ouro e introduzindo 4,4'-bipiridina (4,4'-bpy) ou 1,2-bis(4-piridil)etileno à solução da proteína. De acordo com Hill^{45,46}, essas espécies podem formar filmes moleculares condutores sobre a superfície de ouro. Visto que estas apresentam propriedades de condução via sistema de conjugação de elétrons π em complexos polinucleares de metais de transição⁴⁷. Esses autores^{33,34} observaram que as espécies 1,2-bis(4-piridil)etileno e 4,4'-bpy promovem a TE enquanto as espécies 1,2-

bis(4-piridil)etano, piridina, pirazina e 4-fenilpiridina não são efetivas. Desta forma, sugerem que a presença de uma monocamada condutora é importante para a TE entre o cyt c e a superfície de ouro. Neste contexto, a pirazina também deveria ser efetiva. Este fato, todavia, não é bem justificado pelos autores. O potencial formal, $E_{1/2}$, para a reação de TE utilizando promotores efetivos foi determinado em aproximadamente 0,05 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻ com comportamento de sistema quasi-reversível controlado por difusão (coeficiente de difusão, $D = 9,4 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). O acompanhamento espectroeletróquímico da redução e oxidação indica que a proteína se mantém na sua forma nativa e que as espécies 4,4'-bpy e 1,2-bis(4-piridil)etileno não coordenam-se diretamente ao grupo heme.

No início da década de 80, Hill e colaboradores⁴⁸ utilizaram as técnicas de eletrodo de disco rotatório (RDE) e eletrodo de disco-anel rotatório (RRDE) para estudar a oxidação e redução do cyt c utilizando monocamada de 4,4'-bpy sobre ouro. A partir dos resultados obtidos, os autores concluíram que a corrente limite (i_L) não é controlada exclusivamente por difusão indicando uma etapa de adsorção. Esta interação é atribuída às ligações de hidrogênio entre resíduos de lisina positivamente carregados e os pares de elétrons do nitrogênio piridínico da 4,4'-bpy similarmente ao que é sugerido para a reação de TE entre o cyt c e CCO⁴⁹.

Em 1982, Taniguchi e colaboradores⁴ introduziram as espécies bis(4-piridil)dissulfeto (pySSpy) e bis(4-piridil)sulfeto (pySpy) como modificadores de eletrodos de ouro. Estas espécies, em relação à 4,4'-bpy, são mais interessantes, uma vez que apresentam uma interação significativamente maior com a superfície de ouro formando monocamadas (SAM¹) espontaneamente com elevado grau de organização e estabilidade mecânica. O valor de $E_{1/2}$ do cyt c utilizando eletrodo de ouro modificado com pySSpy ou pySpy foi determinado como 0,05V vs. Ag/AgCl/Cl⁻ com comportamento de sistema quasi-reversível controlado por difusão ($D = 6,5\text{-}10,2 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). Os resultados obtidos apresentaram grande concordância com os previamente publicados por Hill¹² (Figura 1.5).

De acordo com Taniguchi⁴, a adição destas espécies sulfuradas em solução de cyt c não apresentaram alterações significativas no espectro eletrônico indicando que estas não se coordenam ao átomo de ferro do grupo heme. Entretanto, um aumento relativo na reversibilidade das reações de TE foi observado quando o eletrodo de ouro foi

previamente imerso em uma solução contendo o modificador para a formação da monocamada.

A partir do trabalho de Taniguchi, compostos sulfurados têm sido os sistemas mais utilizados para modificar eletrodo com o intuito de estudar o processo de TE do cyt c.

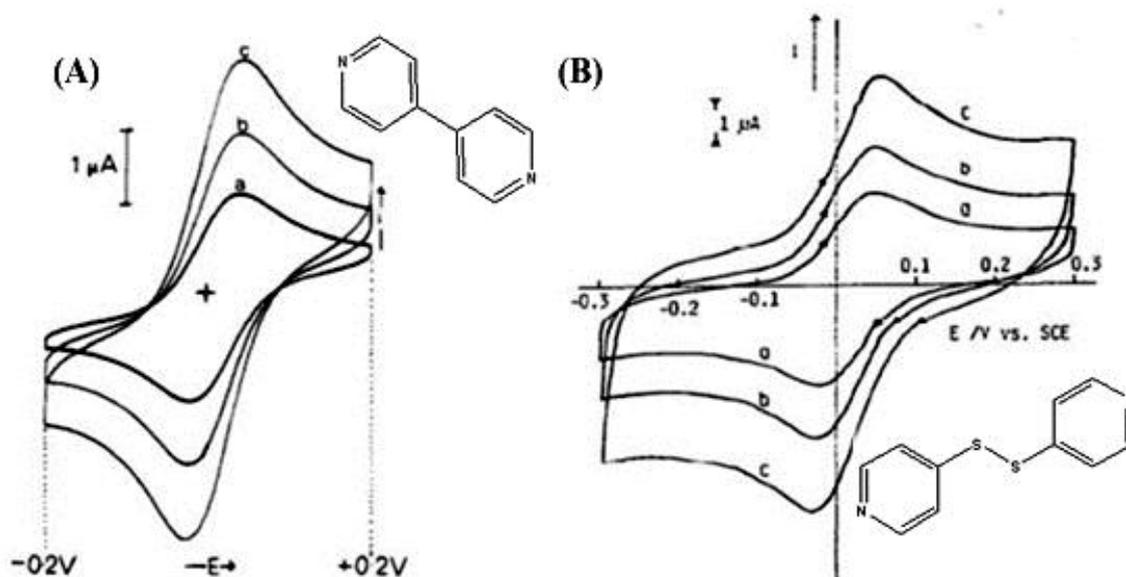


Figura 1.5 – Voltamogramas cíclicos para o eletrodo de ouro na presença de (A) 4,4'-bpy e (B) pySSpy em NaClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e tampão fosfato $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7 contendo cyt c $0,40 \text{ mmol L}^{-1}$. Potencial em V vs. SCE (eletrodo de calomelano saturado - “*saturated calomel electrode*”) e velocidade de varredura (v): (A) [a] 20, [b] 50 e [c] 100 mV s^{-1} e (B) [a] 50, [b] 100, [c] 200 mV s^{-1} . Gráficos obtidos das referências 4 e 46.

1.4 Efeito da Monocamada na TE do cyt c

Bond e colaboradores⁵⁰ estudaram a atividade redox do cyt c em eletrodos rotatórios e ultramicroeletrodos de ouro com e sem presença de pySSpy como modificador. Os autores sugerem que os dados são consistentes com uma ligação específica entre o cyt c e pySSpy. Além disso, sugerem que a adsorção do modificador também pode desbloquear partes da superfície do eletrodo através do deslocamento de proteína adsorvida fornecendo, assim, regiões adequadas para a TE. Uma terceira possibilidade envolveria, ainda, a ocorrência simultânea dos dois processos.

Szücs⁵¹ e colaboradores analisaram, por elipsometria, a adsorção de cyt c sobre ouro, na presença e ausência de pySSpy. Os autores concluíram que a proteína adsorve irreversivelmente tanto no ouro limpo como modificado. O grau de desdobraimento do cyt c em ambas as superfícies, todavia, foi completamente diferente. As medidas elipsométricas indicam que a espessura do filme de cyt c sobre a superfície modificada foi de $38 \pm 3 \text{ \AA}$, conforme esperado para o cyt c na forma nativa. Para a adsorção na superfície não modificada, a espessura foi de apenas $20 \pm 2 \text{ \AA}$. Este fato é consistente a forma desnaturada da proteína. Baseado em medidas de voltametria cíclica realizadas na ausência de cyt c após 120 min de imersão do eletrodo de ouro em solução contendo cyt c e pySSpy os autores observaram uma cobertura parcial de apenas 20% sugerindo que o modificador previne a desnaturação da proteína. Szücs⁵¹ observou que a camada de proteína desnaturada favorece a redução do cyt c em solução com a oxidação, porém, sendo totalmente inexistente. A camada de proteína com mudanças conformacionais ou na forma nativa torna-se, assim, um mediador para TE entre o metal e a proteína em solução. Szücs e colaboradores⁵¹ concluíram, também, que o $E_{1/2}$ da proteína desnaturada desloca cerca de 400 mV para potenciais mais negativos em relação à forma nativa. Ressaltando-se que a proteína adsorvida continua ativa como mediador da TE para a redução do cyt c. Esta conclusão contradiz o modelo de Bond e colaboradores⁵⁰ que considera o cyt c desnaturado como inibidor da TE entre as moléculas desta proteína em solução e a superfície do eletrodo. O estudo de Bond⁵² sugere que a TE controlada por difusão pode ser observado mesmo em eletrodo de ouro não modificado. Os voltamogramas devem, contudo, ser registrados imediatamente após o eletrodo entrar em contato com a solução. A corrente de pico diminui rapidamente ao longo do tempo até torna-se indistinguível daquela observada somente na presença do eletrólito. Para que a resposta se mantenha ao longo do tempo, Bond⁵² indica a necessidade de modificadores que apresentam um sítio de interação específica com o cyt c ou sejam condutores conforme sugerido por Hill⁴⁶.

Alguns modificadores⁴⁶ que inicialmente acreditou-se não preencher os requisitos gerais de um promotor^{46,50}, tais como 2,2'-bipiridina (2,2'-bpy) e pirazina, apresentaram atividades quando adsorvidos sobre eletrodos rugosos após longo tempo de imersão⁵³. Neste caso, não se deve considerar a interação eletrostática entre resíduos protonados de lisina do cyt c. De acordo com estes autores, a diferença no comportamento de facilitar a

TE parece resultar principalmente das diferentes forças de adsorção que exige maiores tempo para formação das monocamadas. Por outro lado, monocamadas com grupos terminais fenila⁵⁴ e fenólico⁵⁵, cujas imagens de STM revelam um grande recobrimento da superfície do eletrodo ouro, não promovem a TE do cyt c. Para a espécie tiofenol⁵⁵, por exemplo, não existe razão óbvia para que este não funcione como um promotor. Outros autores⁵⁶ acessaram a TE do cyt c utilizando alcanotióis. Dessa forma, contrariamente ao que foi sugerido nos primeiros trabalhos, a monocamada não precisa ser condutora para promover a TE entre a proteína e uma superfície metálica. Entretanto, a monocamada precisa interagir com o cyt c de forma que iniba a desnaturação e facilite uma orientação da proteína adequada para que a reação de TE ocorra.

Whitesides e colaboradores⁵⁷ estudaram a TE do cyt c utilizando monocamadas automontadas com diferentes grupos terminais com o objetivo de compreender a relação entre a estrutura destas e a tendência de adsorver a proteína. Conforme ilustrado na Figura 1.6, os autores utilizaram os grupos terminais $-N^+(CH_3)_3$ e $-SO_3^-$ para superfícies carregadas, $-COOH$ e $-NH_2$ para superfícies cujas cargas dependem do estado de protonação e os grupos $-CH_3$ e fenila para superfícies hidrofóbicas. O grupo terminal tris-etilenoglicol ($-(EG)OH$) foi utilizado como controle, devido não adsorver a proteína.

Os voltamogramas indicam que o cyt c foi imobilizado nas monocamadas de $S(CH_2)_{11}N^+(CH_3)_3$ (curva a), $S(CH_2)_{10}COOH$ (curva b), $S(CH_2)_{11}CH_3$, (curva c) $S(CH_2)_{11}(C_6H_4)(C_6H_5)$ (curva e) e $S(CH_2)_{11}NH_2$ (curva g).

As monocamadas constituídas pelas espécies hidrofóbicas $S(CH_2)_{11}CH_3$ (curva c) e $S(CH_2)_{11}(C_6H_4)(C_6H_5)$ (curva e) adsorvem uma camada de cyt c cujos os valores do $E_{1/2}$ foram 400 mV mais negativo do que aquele determinado para a forma nativa⁴⁶. Este deslocamento indica estas monocamadas propiciam a desnaturação da proteína. A monocamada com grupo terminal NH_2 imobilizou, também, o cyt c causando a desnaturação com um valor da diferença entre os potenciais de oxidação e redução em aproximadamente 1,0 V (curva g).

As SAMs formadas por $S(CH_2)_{11}N^+(CH_3)_3$ (curva a) e $S(CH_2)_{10}COOH$ (curva b) imobilizam o cyt c na sua forma nativa, Os processos apresentaram um comportamento quasi-reversível com $E_{1/2}$ de 0,04 e 0,13 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻, respectivamente. Para a monocamada de $S(CH_2)_{11}N^+(CH_3)_3$ é observado um deslocamento positivo do valor de

$E_{1/2}$ em relação à forma nativa. De acordo com os autores⁵⁷, este deslocamento é devido à presença de grupos da monocamada positivamente carregados próximo ao grupo heme.

As SAMs de $S(CH_2)_{11}SO_3^-$ e $S(CH_2)_{11}(EG)_3OH$ não apresentaram resposta eletroquímica para o cyt c.

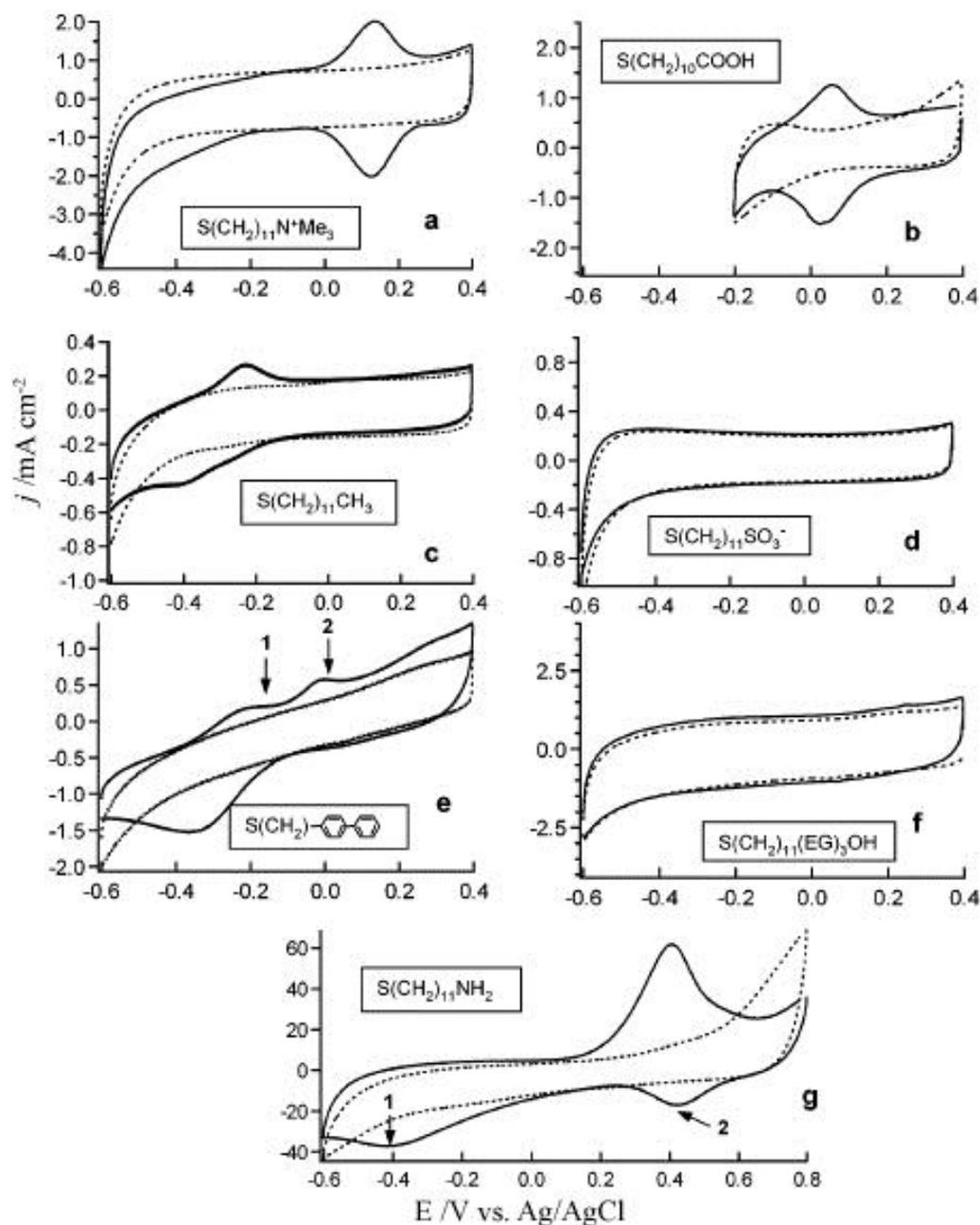


Figura 1.6 - Voltamogramas cíclicos para o eletrodo Au/SR na presença em tampão fosfato 1,0 mmol L⁻¹ pH 7, obtidos após 30 min de imersão em solução contendo cyt c 0,10 mmol L⁻¹. Onde, SR corresponde: (a) $S(CH_2)_{11}N^+(CH_3)_3$, (b) $S(CH_2)_{10}COOH$, (c) $S(CH_2)_{11}CH_3$, (d) $S(CH_2)_{11}SO_3^-$, (e) $S(CH_2)(C_6H_4)-(C_6H_5)$, (f) $S(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OH$, e (g) $S(CH_2)_{11}NH_2$. $\nu = 0,1 \text{ Vs}^{-1}$ em a-f e

1,0 Vs⁻¹ em g. Linha tracejada: voltamogramas cíclicos para o eletrodo modificado com as respectivas monocamadas antes da imersão em solução de cyt c. Obtido da referência 57.

Whitesides e colaboradores⁵⁷ utilizaram, também, a técnica de ressonância de plásmons de superfície, SPR, para avaliar a adsorção de cyt c sobre essas monocamadas. A técnica de SPR baseia-se nas propriedades ópticas e pode ser empregada para estudos de fenômenos de superfície, monitorando a medida da mudança do índice de refração, θ , devido, por exemplo, a adsorção de uma monocamada sobre a superfície do metal. Para a determinação da massa de cyt c irreversivelmente adsorvida por unidade de área os autores utilizaram a relação abaixo, considerando $10 \Delta RU = 1,0 \text{ m}\theta$.

$$120 \text{ m}\theta = 1,0 \text{ ng mm}^{-2} \quad (1.1)$$

Os autores assumem que ΔRU de 2000 (200 m θ) corresponde à cobertura da superfície máxima teórica de uma monocamada de cyt c. Este valor corresponde a uma quantidade de moléculas adsorvidas (Γ) de 14,5 pmol cm⁻². Este valor foi observado para a adsorção do cyt c sobre as SAMs de S(CH₂)₁₁N⁺(CH₃)₃ e S(CH₂)₁₁CH₃ (Figura 1.7).

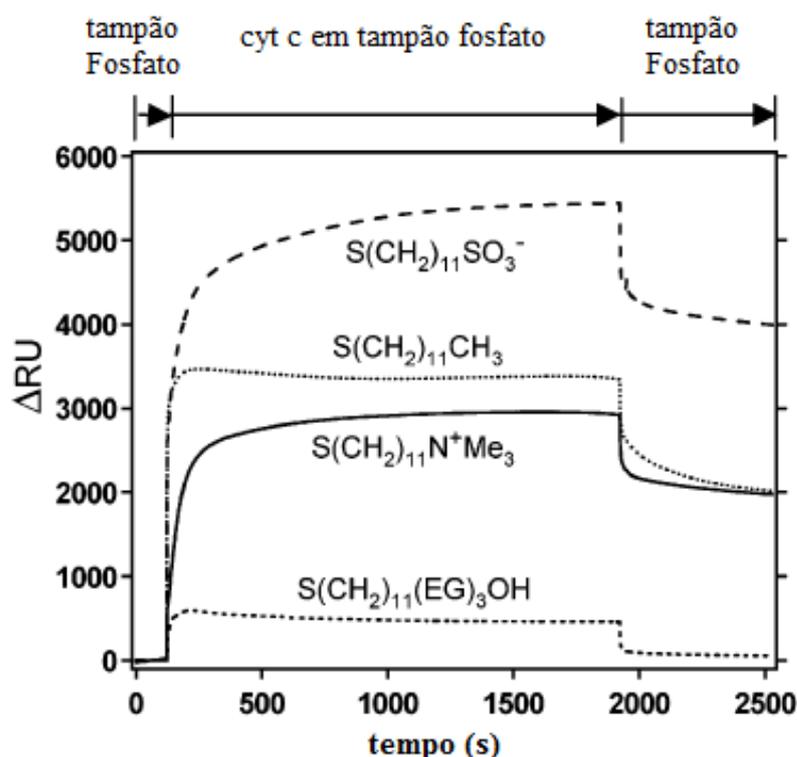


Figura 1.7 – Sensorgramas para a relação entre a variação do ângulo SPR (ΔRU) e o tempo de imersão do eletrodo de ouro modificada com: S(CH₂)₁₁N⁺(CH₃)₃, S(CH₂)₁₁CH₃, S(CH₂)₁₁SO₃⁻ e S(CH₂)₁₁(EG)₃OH na presença de cyt c 0,10 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 1,0 mmol L⁻¹ pH 7. Gráfico adaptado da referência 57.

Entretanto, para a monocamada de $S(CH_2)_{11}CH_3$ o valor de Γ , calculado a partir das áreas dos processos voltamétricos, foi de apenas $3,0 \text{ pmol cm}^{-2}$. Desta forma, somente 20% da monocamada de cyt c é eletroativa. Os autores⁵⁷ sugerem que a proteína desnaturada adsorve com uma orientação aleatória em relação à superfície do eletrodo. Sendo que, somente em algumas orientações, o grupo heme encontra-se próximo a superfície permitindo, assim, a TE.

Os dados de SPR indicam que o cyt c não adsorve $S(CH_2)_{11}(EG)_3OH$, desta forma, a ausência de resposta eletroquímica. Por outro lado, um valor de ΔRU de 4000 indica a adsorção de uma bicamada de cyt c sobre a monocamada de $S(CH_2)_{11}SO_3^-$. Embora, nenhum processo redox tenha sido observado. A adsorção do cyt c com uma orientação exclusivamente desfavorável a TE foi a justificativa encontrada para explicar a inatividade eletroquímica da grande quantidade de massa adsorvida.

Outro ponto de interesse é o mecanismo de TE entre a superfície e o átomo de ferro no interior da proteína. O elétron precisa atravessar a monocamada, a camada de moléculas do solvente e, finalmente, ser transferido através do esqueleto peptídico para alcançar o átomo de Fe. Uma questão importante neste sentido é o efeito da distância entre doador e receptor na cinética de TE considerando o processo de tunelamento. Esforços têm sido realizados para induzir a adsorção de proteínas em eletrodos modificados de modo a preservar as propriedades nativas e proporcionar um ambiente bem definido para que a TE ou características espectrais possam ser estudadas. Miller⁵⁸ utilizou alcanotóis com grupo terminal hidroxila para modificar a superfície de ouro e descobriu que o valor da constante de velocidade da reação heterogênea de TE, k_0 , pode ser controlado pela espessura da monocamada (sem proteína adsorvida). Vários trabalhos^{56,59-62} têm imobilizado o cyt c por associação eletrostática entre o grupo terminal carboxila de monocamadas de alcanotóis e a superfície externa positivamente carregada da proteína resultando na aquisição de uma eletroquímica bem definida. Semelhante ao que acontece com sistemas não proteicos, é esperado que a velocidade de TE para sistemas proteína/SAM/eletrodo seja dependente da distância entre receptor e doador. Estudos eletroquímicos⁶² com SAMs de *n*-alcanotóis confirmam que a cinética de TE depende do comprimento do modificador. Bowden e colaboradores⁶² utilizaram voltametria cíclica para determinar k_0 da reação de TE entre o cyt c e eletrodos de ouro modificados com monocamadas de $HS(CH_2)_nCOOH$. Para as SAMs de comprimento $9 <$

$n < 16$, os valores de k_0 dependem exponencialmente do tamanho da cadeia, de acordo com um mecanismo de tunelamento e decai com um fator de 1,1 por grupo $-\text{CH}_2-$. Quando o comprimento da cadeia é reduzido, os valores de k_0 não aumentam conforme o esperado, sendo proposto que a TE é bloqueada por mudanças de conformação e da orientação da proteína. Independentemente da natureza da interação entre cyt c e a monocamada, a taxa de TE do cyt c tem uma dependência incomum com a espessura SAM. Duas regiões⁵⁹ distintas são identificadas no gráfico de $\log(k_0)$ vs. o número de grupos metileno (n) da monocamada com grupo terminal carboxílico como ilustrado na Figura 1.8.

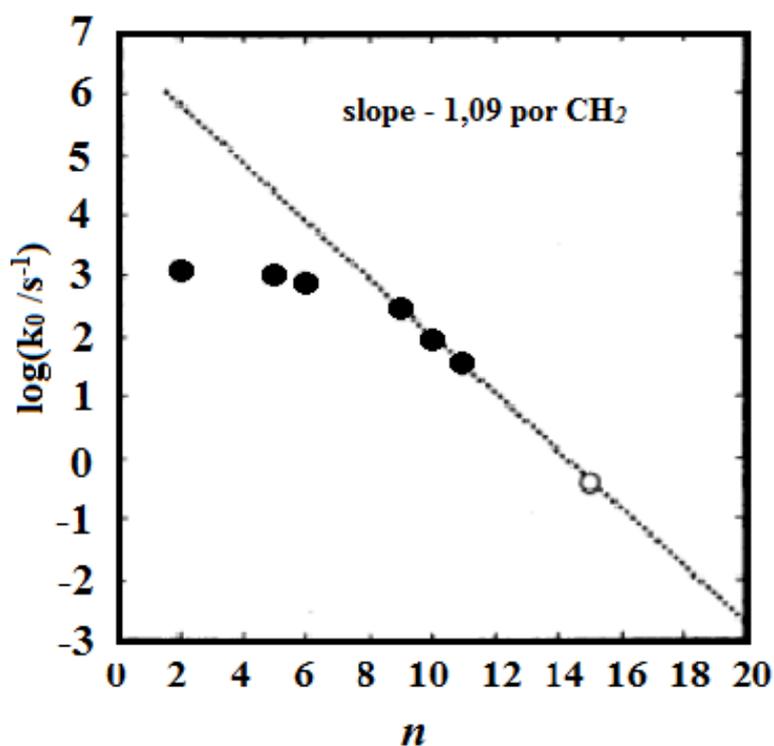


Figura 1.8 – Comportamento do $\log(k_0)$ para o cyt c em função do número de grupos metileno da monocamada composta por $\text{SH}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ sobre ouro⁵⁹.

Para cadeias curtas, a taxa torna-se quase independente da distância. A natureza detalhada do processo de limitação de velocidade permanece sob investigação. Waldeck e colaboradores⁶³ sugerem que esta dependência de k_0 não é incomum e pode ocorrer em geral, impulsionada pelos acoplamentos eletrônicos fortes e a grande intensidade do campo elétrico em curtas distâncias.

1.5 Interação Monocamada/cyt c

A compreensão de como e onde exatamente é estabelecida a interação entre o promotor e proteínas é um dos objetivos principais na bioeletroquímica moderna. *In vivo*, a reação de TE entre cyt c e CCO ocorre após a formação de um complexo entre estas espécies onde o grupo ϵ -amino dos resíduos de lisina do cyt c exerce um papel importante⁴⁹. A importância da lisina na interação proteína/proteína é reforçada ainda pelo efeito da poli-L-lisina⁶⁴, um inibidor competitivo, que pode se ligar ao CCO inibindo a reação de TE com o cyt c. O efeito da modificação química do cyt c na velocidade da reação de TE é um dos pontos relevantes do estudo da cinética da reação heterogênea de TE. Eddowes e Hill⁴⁵ foram os primeiros a propor que ligações de hidrogênio entre lisinas do cyt c e átomo de N da 4,4'-bpy, em vez da coordenação direta ao átomo de Fe do grupo heme, são responsáveis pela rápida TE entre o eletrodo de ouro e a proteína. Hill e colaboradores⁶⁵ constataram que a presença de poli-L-lisina também dificulta a TE entre cyt c e eletrodos de ouro modificados. Os autores⁴⁵ sugerem que a 4,4'-bpy forma uma superfície adequada na interface eletrodo/solução que interage com a proteína de forma semelhante ao observado na reação de TE com CCO, envolvendo os grupos ϵ -amino da lisina. Uma orientação preferencial da proteína é, também, sugerida quando esta adsorve reversivelmente na superfície do eletrodo ou no CCO. A proteína adsorve de forma que a parte exposta do grupo heme fica adjacente à superfície do eletrodo ou ao CCO permitindo, assim, que a TE ocorra rapidamente. Por outro lado, Tominaga⁶⁶ e colaboradores argumentaram que o tratamento químico da lisina no cyt c com ácido 4-cloro-3,5-dinitrobenzóico (CDNP) ou 2,4-dinitrofluorobenzeno (DNP) não apresentam alterações significantes na TE sugerindo que os resíduos lisinas não estão envolvidos neste processo. A modificação química dos grupos lisinas e seus efeitos na capacidade de TE foi, também, estudada por Theodorakis e colaboradores⁶⁷. Estes autores prepararam derivados β -tiopropionil de cyt c (TP cyt c) e modificaram individualmente cada um dos 18 grupos ϵ -amino dos resíduos lisina (Lys) do cyt c. O potencial formal, $E_{1/2}$, para os derivativos com modificações nas Lys-5–8, 13, 22, 25, 27, 39, 53, 60, 86–88 e 100 variou de 0,057 a 0,075 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻, sendo consistente com a forma nativa (0,06 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻) considerado o erro experimental. Este resultado indica que o ambiente do grupo heme permanece inalterado, apesar da modificação em qualquer uma dessas lisinas.

Por outro lado, a modificação das lisinas 72 e 79 (Lys-72, Lys-79), que estão envolvidas na ligação do grupo heme à proteína, afeta tanto o $E_{1/2}$ como a habilidade de ocorrência da reação de TE para o CCO. Os valores de $E_{1/2}$ para os derivados da proteína com modificações nos resíduos Lys-72 e Lys-79 foram -0,004 e -0,009 V *vs.* Ag/AgCl/Cl⁻, respectivamente.

Conforme descrito acima, a modificação química de um único resíduo lisina pode causar alterações insignificantes no valor de $E_{1/2}$ dos derivados de cyt c e causar um efeito relativamente insignificante sobre a cinética de TE entre a proteína e CCO. Similarmente, os resíduos protonados de lisina podem ser importantes na formação na interação com certos tipos de modificadores, entretanto, não são necessariamente fundamentais para que ocorra uma TE rápida.

Estudos mais recentes sugerem diferentes formas de imobilizar o cyt c sobre monocamadas. Os primeiros trabalhos consideraram interações eletrostáticas para justificar a interação entre grupos lisinas positivamente carregados do cyt c e grupos terminais de monocamadas, principalmente piridínico e -COOH. Monocamadas mistas formadas com os grupos terminais (CH₂)₅COOH e (CH₂)₄OH foram capazes de imobilizar o cyt c covalentemente⁶⁸. Neste caso, um reagente de reticulação (1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)-carbodiimida meto-p-tolueno-sulfonato (CMC)) é utilizado para converter ligações de hidrogênio em ligações amida (ver Figura 1.9) resultando em uma configuração em que a difusão rotacional do cyt c na interface monocamada/solução é bastante restrita. Assim, é possível imobilizar a proteína em uma orientação tal que a reação de TE é favorecida.

Waldeck e colaboradores⁶⁹ imobilizaram o cyt c sobre monocamadas de alcanotióis com grupo terminal piridínico e com comprimentos da cadeia alquila com mais de seis unidades de metileno. Um grande deslocamento negativo do potencial redox, em relação à forma nativa, foi observado. Além disso, a resposta eletroquímica não foi reversível, tornando esses sistemas inadequados para estudos detalhados sobre o mecanismo de TE. Posteriormente, estes autores⁷⁰ propuseram um novo método de interação entre o cyt c e grupo terminal piridínico. A imobilização do cyt c, neste caso, ocorre com a coordenação direta do grupo terminal piridínico ou imidazólico ao átomo de ferro do grupo heme, conforme ilustrado na Figura 1.10.

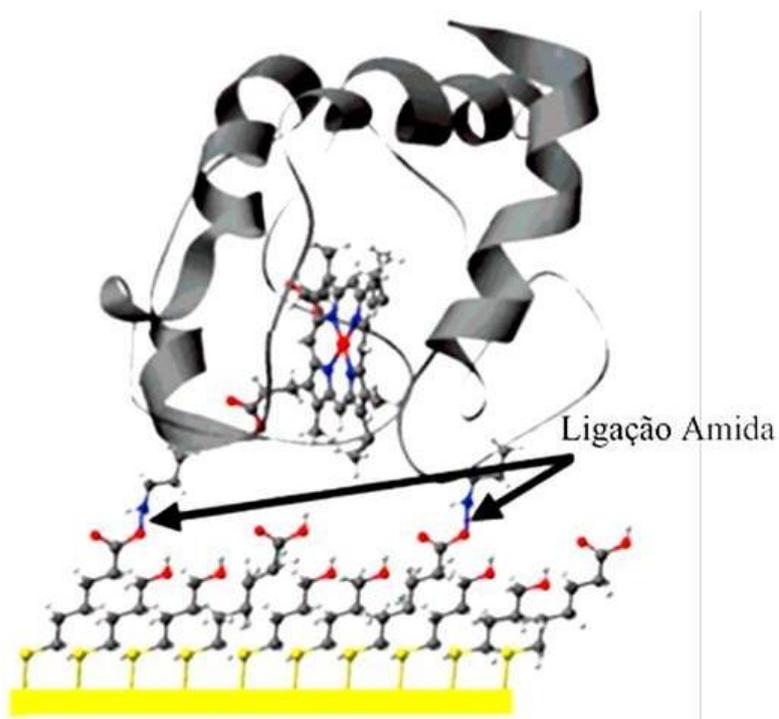


Figura 1.9 – Diagrama da interação covalente entre monocamada/cyt c resultante da formação de ligações amida entre o grupo terminal -COOH da monocamada mista formada pelos grupos $\text{HS(CH}_2)_5\text{COOH}$ e $\text{HS(CH}_2)_4\text{OH}$ e resíduos lisina do cyt c.

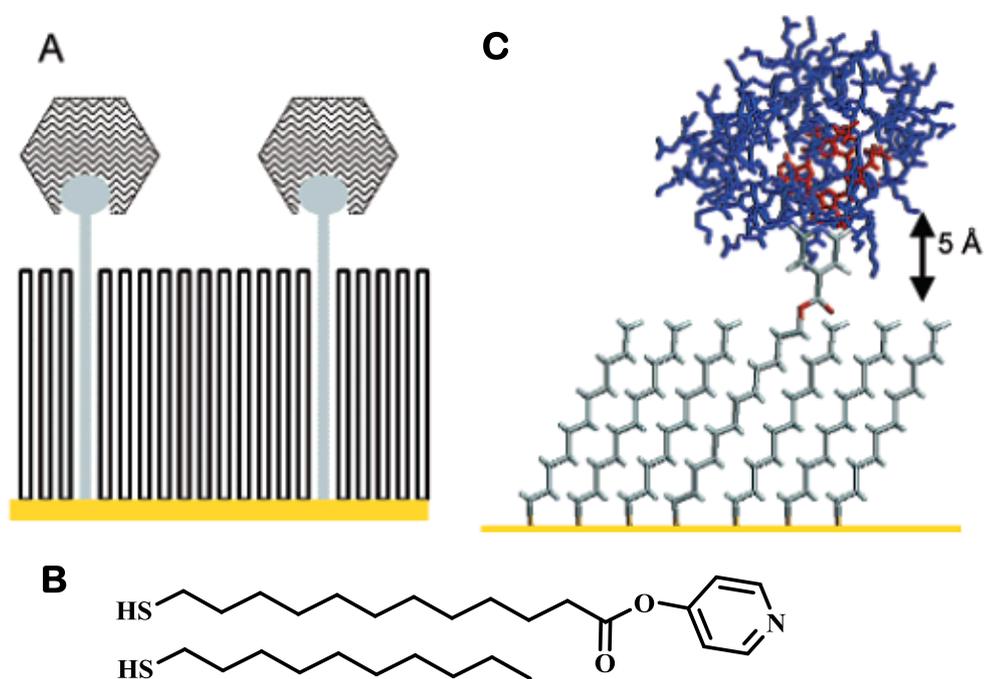


Figura 1.10 – (A) Diagrama esquemático da estratégia de imobilização do cyt c na monocamada mista formada pelos compostos $\text{HS(CH}_2)_9\text{CH}_3$ e $\text{HS(CH}_3)_{11}\text{COOC}_5\text{H}_4\text{N}$ ilustrados em (B). (C) Ilustração da imobilização do cyt c na superfície da monocamada.

A monocamada formada por $\text{HS}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$ e $\text{HS}(\text{CH}_3)_{11}\text{COOC}_3\text{H}_4\text{N}$ de tal modo que os grupos piridínicos encontram-se a uma distância de aproximadamente 10\AA um dos outros e a 5\AA de altura em relação ao grupo CH_3 da outra espécie modificadora. Os autores⁷⁰ atribuem a este arranjo a capacidade do grupo piridínico ou imidazólico de penetrar no interior da proteína podendo se ligar diretamente ao átomo de ferro do grupo heme através de uma reação de substituição do resíduo metionina (met-80). Para estas monocamadas, os $E_{1/2}$ foram $-0,17$ e $-0,34$ V vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$, respectivamente. Estes deslocamentos negativos do potencial redox são consistentes os estudos^{71,72} em meio homogêneo, quando a piridina ou o imidazol está presente em solução de cyt c. Estudos espectroscópicos mostraram que a piridina, imidazol, nitrila podem ligar-se ao centro metálico do cyt c em solução^{71,72}. Consequentemente, a mudança negativa no potencial redox indica uma interação entre o grupo terminal da camada e grupo heme da citocromo.

Waldeck e colaboradores⁶³ estudaram por meio de voltametria cíclica a cinética de TE do cyt c, imobilizado de diferentes maneiras sobre diferentes monocamadas, em função da força iônica. Os autores observaram que o valor de k_0 diminui com o aumento da força iônica do meio para o cyt c eletrostaticamente imobilizado. Em contraste, o valor de k_0 é independente da força iônica quando a proteína está covalentemente ligada por ligações amida e quando o grupo terminal piridínico está diretamente coordenado ao grupo heme substituindo a met-80. Estes resultados foram explicados considerando o modelo de Brønsted-Debye-Hückel (BDH) em que a força iônica afeta o coeficiente de atividade dos reagentes e do complexo ativado de forma diferente. Quando o cyt c é imobilizado formando um sistema de TE unimolecular, o modelo BDH prevê nenhuma dependência da força iônica. A dependência desaparece porque os coeficientes de atividade do complexo ativado e do reagente mudam com a força iônica de modo semelhante para o cyt c ligado à superfície.

Dentre a grande quantidade de espécies utilizadas para promover a TE do cyt c, o aminoácido L-cisteína (cys) é um dos promotores mais notáveis. Monocamadas formadas por cys sobre ouro são capazes de promover a TE com comportamento próximo ao reversível do cyt c em soluções neutras⁷³⁻⁷⁶, ácidas⁷⁷ e alcalinas⁷⁵ e da metaloenzima bovina cobre-zinco superóxido dismutase⁷⁸ (SOD – “*copper-zinc superoxide dismutase*”). A cys apresenta vantagens em relação aos promotores piridínicos que encontram-se protonados em meio ácido ($\text{pH}<6$). Sob tais condições, pode existir

repulsão eletrostática entre a monocamada e proteína. Um fato interessante é que a monocamada de cys sobre ouro foram, também, utilizada em estudos do comportamento eletroquímico do citocromo b5 com carga líquida negativa (-8)⁷⁴. Apesar de vários estudos utilizando a monocamada de cys para imobilizar cyt c e SOD, a interação adsorbato/proteína não é bem compreendida.

Nas últimas quatro décadas, a reação de TE do cyt c tem sido extensivamente estudada. A imobilização sobre monocamadas automontadas, formadas por diversos tipos de compostos sulfurados, tem sido o sistema mais utilizado (Tabela 1.1). A maioria dos estudos do cyt c visa contribuir ao entendimento do mecanismo de TE. Entretanto o mecanismo ainda não é completamente entendido.

Tabela 1.1 – Valores $E_{1/2}$ do cyt c para várias monocamadas de compostos sulfurados sobre ouro.

Adsorbato	$E_{1/2}$ (V vs. Ag/AgCl/Cl ⁻)	Referência
4,4'-bipiridina (4,4'-bpy)	0,05	52
1,2-bis(4-piridil)etileno	0,05	52
bis(4-piridil)sulfeto (pySpy)	0,05	4
bis(4-piridil)dissulfeto (pySSpy)	0,05	4
4-mercaptopiridina (pyS)	0,08	79
HS(CH ₂) ₁₅ COOH	0,01	62
HS(CH ₂) ₁₀ COOH	0,04	56,57
HS(CH ₂) ₁₀ COOH*	0,02	56
HS(CH ₂) ₅ COOH	0,01	62
HS(CH ₂) ₃ OH	0,02	58
cisteína (cys)	0,19	76
metionina (Met)	0,17	75
HS(CH ₂) ₁₁ N ⁺ (CH ₃) ₃	0,13	57
HS(CH ₂) ₁₁ CH ₃	-0,32	57
HS(CH ₂)(C ₆ H ₄)-(C ₆ H ₅)	-0,32	57
HS(CH ₂) ₆ OH	0,04	70
HS(CH ₂) ₂ CO ₂ py	0,01	70
HS(CH ₂) ₁₂ CO ₂ py/HS(CH ₂) ₁₀ CH ₃	-0,17	70
HS(CH ₂) ₁₁ Im/HS(CH ₂) ₇ CH ₃	-0,35	70
HS(CH ₂) ₁₁ CN/HS(CH ₂) ₇ CH ₃	-0,41	70
[Ru(CN) ₅ (pyS)] ⁴⁻	0,03	80
1,4 ditiano (1,4-dt)	0,05	81

py – grupo piridínico, Im – grupo imidazólico.

* Interação covalente com cyt c.

1.6 Mioglobina

A mioglobina, Mb, é encontrada no citoplasma das células de tecido muscular liso e estriado dos animais e tem função no armazenamento de oxigênio. A Mb é caracterizada por sua estrutura globular pertencendo à família das globulinas. Proteínas globulares são caracterizadas pela presença de uma cadeia polipeptídica organizada em uma forma esférica ou globular contendo vários tipos de estrutura secundária. A quantidade de Mb no sangue aumenta quando ocorre uma destruição muscular. Após uma lesão isquêmica da fibra muscular, por exemplo, a Mb é liberada na circulação. A determinação da quantidade desta proteína no sangue ajuda no diagnóstico de infarto do miocárdio⁸². Concentrações elevadas podem ser observadas de uma a duas horas depois da precordialgia, atingindo o pico em 12 h e, em geral, normalizando-se 24 horas após uma isquemia⁸². Esta informação pode ser útil para detecção de um novo infarto em pacientes com dor precordial. O aumento da quantidade de Mb não é específico de lesão cardíaca, ocorrendo, também, em traumas da musculatura esquelética e na insuficiência renal, por exemplo.

Um aspecto importante dessa proteína é que a maioria dos grupos hidrofóbicos encontra-se no interior da proteína, enquanto que os grupos hidrofílicos localizam-se na superfície externa da molécula⁸³. Tem-se, dessa forma, interação com moléculas de água sem, entretanto, afetar o interior da metaloproteína. A Mb, diferentemente do cyt c, tem um pI⁸⁴ de 6,8 não apresentando, dessa forma, elevada densidade de carga positiva em pH neutro. A Mb é uma proteína relativamente pequena com massa molecular de 17600 Da contendo uma cadeia polipeptídica única de 153 aminoácidos residuais e um grupo heme tipo B. Duas moléculas de histidina encontram-se próximas ao átomo de ferro sendo uma ligada diretamente em posição proximal enquanto a outra ocupa a posição distal não estando coordenada, porém, ao centro metálico, como ilustrado na Figura 1.11. A Mb no estado oxidado (Fe(III)) é hexacoordenada com água como sexto ligante. No estado reduzido (Fe(II)), a Mb pode ser pentacoordenada (deoxiMb) ou hexacoordenada, com O₂, CO ou NO como sexto ligante. A função da Mb é armazenar e facilitar a difusão de oxigênio durante a contração e relaxação do tecido muscular. A afinidade da Mb, no estado reduzido, por oxigênio é maior que a da hemoglobina. Mudanças sutis na estrutura

terciária da Mb podem eliminar a capacidade de coordenação de oxigênio ao grupo heme^{85,86}.

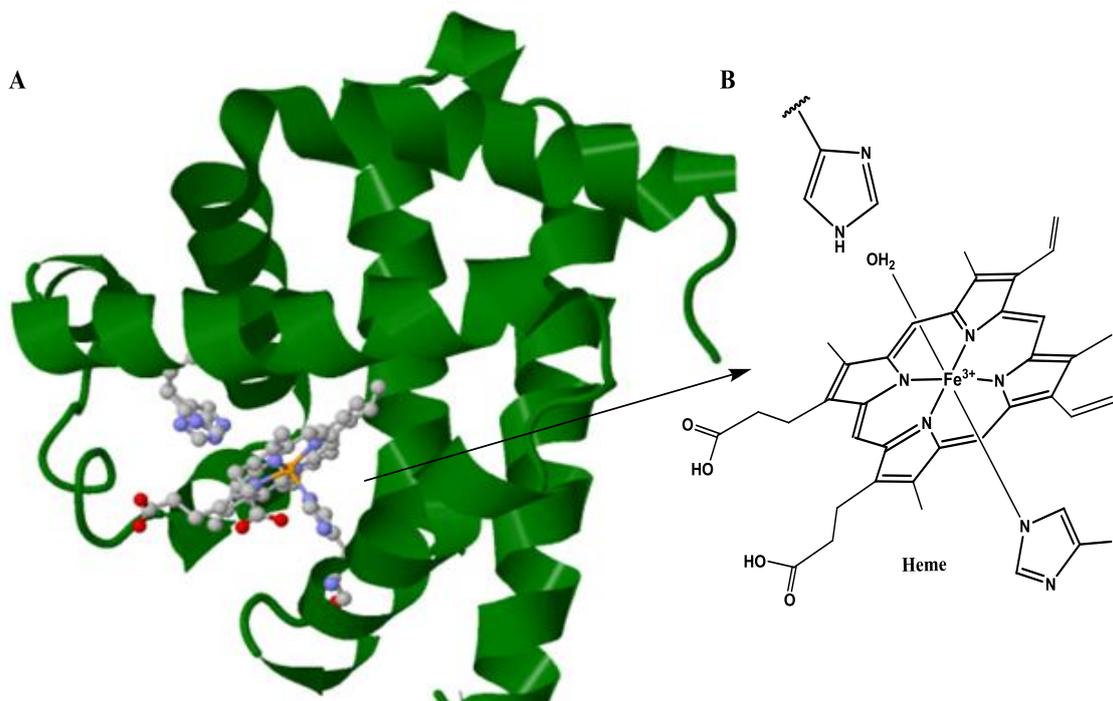


Figura 1.11 – (A) Estrutura tridimensional⁸⁷ da mioglobina (Fe(III)) de músculo esquelético de equinos. (B) Estrutura detalhada do grupo heme tipo B da Mb.

1.7 Estudos eletroquímicos da Mb

O fato da Mb não apresentar elevada densidade de carga positiva, possivelmente dificulta a interação com os principais grupos terminais utilizados para estudar o cyt c. Além disso, o grupo heme da Mb é mais protegido pela estrutura peptídica da proteína em comparação ao cyt c. Logo, a interação com a superfície é dificultada. O estudo eletroquímico da Mb foi primeiramente observado em eletrodos de mercúrio⁸⁸, de ouro modificado com metil viologênio⁸⁹ e de óxido de índio^{47,48} ultra limpo e hidrofílicos. O comportamento eletroquímico foi instável e extremamente sensível à pureza da amostra e as condições da superfície do eletrodo⁹⁰. Grandes esforços têm sido realizados para acessar a TE por meio de mediadores, promotores ou alguns materiais especialmente modificados⁹¹⁻¹⁰¹. Estudos eletroquímicos da Mb utilizando vários surfactantes como brometo de didecildimetilamônio (DDAB), lipídios, dentre outros^{93,95,102}, demonstram

que o filme surfactante pode aumentar a taxa de TE entre a proteína e o eletrodo. Filmes de complexo surfactante/polieletrólito que combinam as propriedades de surfactantes anfifílicos com as de polímeros tem sido utilizado para facilitar a TE da Mb¹⁰³. Os componentes poliméricos podem oferecer resistência mecânica e boa estabilidade, enquanto os surfactantes mantêm a sua tendência para a formação de estruturas de bicamadas^{104,105}. Wang e Hu¹⁰³ prepararam um complexo de polieletrólito reagindo o surfactante aniônico dihexadecilfosfato (DHP) com o policatiônico poli(dialildimetilamônio) (PDDA). O estudo eletroquímico da Mb incorporada neste filme sobre grafite pirolítico apresenta um comportamento quasi-reversível com $E_{1/2}$ de $-0,26$ V vs. Ag/AgCl/Cl⁻ indicando que a TE da Mb é facilitada neste microambiente. Muitos trabalhos têm sido publicados seguindo diferentes abordagens, incluindo a adição de líquidos iônicos¹⁰⁶ a temperatura ambiente, nanotubos de carbono¹⁰⁷, nanopartículas (Au^{101,108} e Ag¹⁰⁹), dentre outros, para superar as desvantagens e conseguir acessar a reação de TE de forma eficiente. Materiais mesoporosos¹¹⁰⁻¹¹², também, têm despertado grande interesse devido a grande área superficial e poros uniformes. Nestes sistemas, a localização das moléculas de Mb ocorre não apenas na superfície externa, mas também no interior dos poros resultando em uma elevada densidade e, portanto, em maior sensibilidade. Além disso, foi observado um aumento de estabilidade quando da utilização destes materiais.

A utilização de monocamadas de compostos sulfurados sobre ouro para o estudo da TE da Mb tem sido muito restrito. Zhang e Li¹¹³ estudaram a TE da Mb utilizando eletrodo de ouro modificado com DL-homocisteína (Hcy) e observaram um par redox bem definido com $E_{1/2}$ em $-0,01$ V vs. Ag/AgCl/Cl⁻ para a proteína adsorvida sobre a SAM de Hcy. Cerda e colaboradores¹¹⁴ observaram via QCM que as moléculas da proteína adsorvem sobre a monocamada formada por 6-mercaptop-1-hexanol. Entretanto, a Mb não apresentou processos redox. Por outro lado, Tian e colaboradores¹⁰¹ observaram a TE direta e reversível da Mb utilizando uma superfície nanopiramidal de ouro sem modificador com valor de $E_{1/2}$ em $0,21$ V vs. Ag/AgCl/Cl⁻.

As dificuldades relatadas acima explicam, provavelmente, o baixo número de publicações envolvendo o estudo da reação de TE da Mb utilizando monocamadas (apenas onze (11) quando se utiliza “SAM and MYOGLOBIN” como critério de busca no banco de dados “ISI WEB OF SCIENCE” considerando a pesquisa por os anos até 2011).

Ainda assim, os trabalhos publicados não apontam claramente para o tipo de interação existente entre as moléculas modificadoras e as da proteína. Adicionalmente, os valores de $E_{1/2}$ reportados variam de $-0,4$ a $+0,21$ vs. Ag/AgCl/Cl⁻ dependendo da superfície em estudo, do pH do meio eletrolítico, dentre outros aspectos experimentais^{113,115-118}, como exemplificado na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 – Valores $E_{1/2}$ da Mb para vários eletrodos.

Eletrodo	pH	$E_{1/2}$ (V vs. Ag/AgCl/Cl ⁻)	Referência
TiO ₂ /MWCNTs	7,0	-0,33	119
PG/AQ	5,5	-0,26	117
GC/DDAB	5,6	-0,12	115
GC/DDAB	7,0	-0,15	115
Au/Hcys	6,7	-0,01	113
PG/DMSO	7,0	-0,02	120
NPAu	7,0	0,21	101

MWCNTs – nanotubos de carbono com multicamadas, PG – Grafite pirolítico, GC – Carbono vítreo AQ – poli(ester ácido sulfônico), DDAB - brometo de didecildimetilamônio, hcys – DL-homocisteína, DMSO- *dimetilsulfóxido* e NPAu – ouro nanopiramidal.

2. OBJETIVOS

Neste trabalho objetiva-se estudar o fenômeno de adsorção espontânea (SAMs) de moléculas sulfuradas sobre substratos de ouro e a posterior aplicação destes substratos modificados para o estudo de reações de heterogêneas de transferência de elétrons (TE) do cyt c e Mb. Os estudos serão realizados com as seguintes moléculas 1,4-ditiano (1,4-dt), 4-mercaptopiridina (pyS), 5-(4-piridil)-1,3,4-oxadiazol-2-tiol (Hpyt), tionicotinamida (TNA) e isotionicotinamida (iTNA), cujas estruturas encontram-se representadas na Figura 2.1.

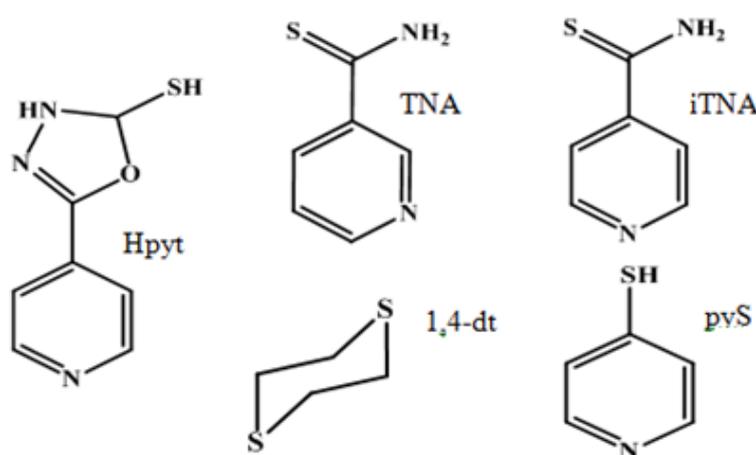


Figura 2.1 – Estruturas dos compostos sulfurados: 1,4-ditiano (1,4-dt), 4-mercaptopiridina (pyS), 5-(4-piridil)-1,3,4-oxadiazol-2-tiol (Hpyt), tionicotinamida (TNA) e isotionicotinamida (iTNA).

Os objetivos específicos estabelecidos foram:

2.1 Formação e caracterização das monocamadas

- Estudo cinético e termodinâmico de formação das monocamadas das moléculas sulfuradas 1,4-dt, pyS, Hpyt, TNA e iTNA sobre eletrodos policristalinos de ouro;
- Análise estrutural das monocamadas formadas;
- Avaliação do efeito do pH nas monocamadas formadas.

2.2 Aplicação das Monocamadas Formadas

2.2.1 Estudo da reação de TE do cyt c

- Estudo eletroquímico do cyt c aplicando as monocamadas formadas;
- Estudo da interação entre o cyt c e as monocamadas sintetizadas por meio das técnicas de QCM e SPR.

2.2.2 Estudo da reação de TE da Mb

- Estudo eletroquímico da Mb aplicando as monocamadas formadas;
- Estudo da interação entre a Mb e as monocamadas formadas por meio da técnica de SPR.

2.3 Estudo da Reação de TE da Mb utilizando a monocamada de cisteína (cys)

2.3.1 Imobilização da Mb na monocamada de cys

- Estudo eletroquímico da proteína Mb utilizando a monocamada de cys;
- Estudo cinético e termodinâmico da adsorção da Mb sobre a monocamada de cys;
- Estudo da adsorção da Mb sobre a monocamada de cys por meio das técnicas de QCM.

2.3.2 Aplicação do eletrodo Au/cys/Mb

- Eletrocatalise do ácido ascórbico (AA).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e Soluções

- Tionicotinamida (Aldrich)
- Isotionicotinamida (Aldrich)
- 4-mercaptopiridina (Aldrich)
- 1,4-ditiano (Aldrich)
- 5-(4-piridil)-1,3,4-oxadiazol-2-tiol (Aldrich)
- Ácido ascórbico (Aldrich)
- Ácido fosfórico - H_3PO_4 (Vetec)
- Ácido sulfúrico - H_2SO_4 (Merck)
- Citocromo c (Sigma)
- Cloreto de potássio - KCl (Aldrich)
- Etanol (Merck)
- Ferricianeto de Potássio $K_3[Fe(CN)_6]$ e Ferrocianeto de potássio $K_4[Fe(CN)_6]$ (Merck)
- Fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) e fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4) (Synth)
- Hidróxido de potássio - KOH (Aldrich)
- Hidróxido de sódio- NaOH (Synth),
- Mioglobina (Sigma)
- Peróxido de Hidrogênio - H_2O_2 (Synth)
- Permanganato de potássio - $KMnO_4$ (Synth)

Todas as soluções foram preparadas utilizando água purificada em sistema Milli-Q da Millipore Inc.

- Soluções aquosas de 10KMnO₄:1KOH (m:m) e 3H₂SO₄:1H₂O₂ (v:v) (solução “piranha”) foram empregadas na limpeza das vidrarias, principalmente das células eletroquímicas, para eliminar possíveis contaminações com material orgânico.
- As soluções de tampão fosfato usadas como eletrólito de suporte foram preparadas a partir da mistura 1:1 de soluções de K₂HPO₄ e de KH₂PO₄ com a mesma concentração desejada para o tampão. O pH foi ajustado com H₃PO₄ ou KOH de acordo com a necessidade.
- As soluções de citocromo c foram preparadas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. As soluções de mioglobina foram preparadas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 6,5 e depois foram filtradas para remoção de resíduos sólidos. A concentração das soluções de Mb Fe(III) com massa molecular de 17,600 g mol⁻¹ foi calculada espectroscopicamente considerando uma absorvidade molar de 188 L mmol⁻¹ cm⁻¹ para a banda em 409 nm (pH 6,5)⁸⁵. Estas soluções foram armazenada em baixa temperatura (~2°C) durante no máximo uma semana. As medidas eletroquímicas utilizando estas soluções foram realizadas a 25 °C.

3.2 Materiais e instrumentos

3.2.1 Medidas Eletroquímicas

Eletrodos de ouro policristalinos (Bioanalytical System Inc., BAS, $A_{\text{geom}} = 0,0314 \text{ cm}^2$). Foram utilizados como substratos para modificação. Fio de platina e um eletrodo de Ag/AgCl/Cl⁻ (em KCl 3,5 mol L⁻¹, BAS) foram utilizados como eletrodos auxiliar e de referência, respectivamente. Todos os potenciais citados no texto referem-se ao sistema Ag/AgCl/Cl⁻ (em KCl 3,5 mol L⁻¹, BAS).

As medidas eletroquímicas foram obtidas em uma célula convencional de vidro ou Teflon[®] (experimentos de desorção redutiva em meio alcalino) com entrada para os três eletrodos e entrada e saída de gases. Um potenciostato EC *Epsilon* (BAS) foi utilizado para a aquisição destas medidas. Um sistema Pine Instruments rotating disk electrode

system com um eletrodo policristalino de ouro (EMC² – Energy Materials Center at Cornell, $A_{\text{geom}} = 0,26 \text{ cm}^2$) foi utilizado nas medidas de eletrodo de disco rotatório (RDE).

Todas as soluções utilizadas como eletrólito de suporte foram desaeradas previamente com N₂ ou Ar de alta pureza durante 15 minutos. Durante os experimentos, a atmosfera de N₂ ou Ar também foi mantida.

3.2.2 Pré-tratamento do Eletrodo de Ouro Policristalino

O pré-tratamento da superfície do eletrodo é uma das etapas mais importante para a formação de monocamadas de alta qualidade. Dessa forma a limpeza utilizada neste trabalho consistiu-se de três: um procedimento químico, o polimento mecânico, seguido de uma etapa eletroquímica.

Inicialmente os eletrodos de ouro foram imerso em solução “piranha” por 3 minutos. Posteriormente, os eletrodos foram previamente polidos com pasta de alumina de diferentes granulações até obtenção de uma superfície com aspecto especular. Em seguida, foram submetidos às seguintes etapas: (1) ultrassom com água Milli-Q por 10 minutos para retirada de possíveis partículas de alumina, (2) imersão em solução piranha para eliminar possível contaminação orgânica, (3) lavagem com água Milli-Q, (4) ultrassom por 5 min em água Milli-Q. Finalmente, após esses procedimentos, os eletrodos foram limpos em solução de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹, variando o potencial entre -0,4 V a 1,5 V a 100 mV s⁻¹ durante vários ciclos até a obtenção da curva voltamétrica característica¹²¹ do ouro policristalino limpo. Somente após esse tratamento a modificação da superfície foi realizada.

3.2.3 Avaliação da Área Ativa do Eletrodo de Ouro Policristalino

A área eletroquimicamente ativa do eletrodo policristalino de ouro e o fator de rugosidade ($f_r = A_{\text{ativa}}/A_{\text{geom}}$) foram determinados a partir da carga decorrente do processo de formação de óxido. Este método é aplicado para metais que mostram regiões bem definidas para a formação e redução de uma monocamada de óxido. O oxigênio é

adsorvido em uma monocamada antes da evolução de O₂ com uma correspondência atômica de 1:1 com os átomos do metal na superfície. De acordo com a literatura¹²², o valor de carga por unidade de área do Au policristalino é de 390 μC cm⁻². A carga (*Q*) do processo de adsorção foi obtida da razão entre a área referente ao processo de formação de óxido e a velocidade de varredura.

3.2.4 Cálculos teóricos

Os orbitais HOMO e o valor do momento de dipolo foram calculados utilizando o programa Gaussian03W versão 6.1 revisão D.01. A Teoria do Funcional da Densidade (DFT) com o funcional B3LYP restrito e conjunto de bases 6-311G⁺⁺ foi utilizada como condições de cálculo para a minimização da energia do estado fundamental.

3.2.5 Formação das Monocamadas Automontadas

A adsorção das espécies sulfuradas nas superfícies devidamente limpas foi realizada por imersão em uma solução aquosa contendo a espécie modificadora. Após imersão, o eletrodo foi lavado com água, para remoção de moléculas fisicamente adsorvidas, antes de serem utilizados nos experimentos. O tempo de imersão necessário para o equilíbrio de adsorção em foi avaliado em diferentes concentrações (0,02 a 2,0 mmol L⁻¹) das espécies modificadoras.

3.2.6 Impedância Eletroquímica (EIS – “Electrochemical Impedance Spectroscopy”)

As medidas de impedância foram obtidas em um potenciostato AUTOLAB PGSTAT302N acoplado a um microcomputador. As medidas foram obtidas em uma célula convencional de vidro utilizando os eletrodos descritos no Item 3.2.1.

As medidas de EIS foram realizadas para o eletrodo sem modificador e após imersão em solução contendo 2,0 mmol L⁻¹ da espécie modificadora. As medidas foram

obtidas para vários tempos de imersão. Após imersão na solução modificadora, o eletrodo foi lavado com água e foi, então, utilizado para as medidas de EIS na presença de uma solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $8,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ e $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$. Foi utilizado uma variação na frequência de 10 mHz a 10 kHz com uma perturbação de amplitude de 10 mV.

3.2.7 Microbalança de Cristal de Quartzo(QCM)

A frequência foi medida por um frequencímetro (PM-740, Maxtek) responsável pelo monitoramento das variações na frequência de oscilação do cristal e um computador para obtenção e tratamento dos dados. Nas medidas piezoelétricas foram utilizados eletrodos comerciais com ouro depositado sobre cristais piezoelétricos de quartzo de corte AT (Stanford Research Systems[®], 5 MHz Ti/Au polished) com diâmetro de 24,5 mm. O eletrodo de ouro depositado apresenta áreas geométricas de $1,370 \text{ cm}^2$ na parte frontal e $0,317 \text{ cm}^2$ na parte inferior para estes eletrodos.



Figura 3.1 – Frequencímetro (PM-740, Maxtek) e eletrodos comerciais com ouro depositado sobre cristais piezoelétricos.

Estes cristais piezoelétricos de quartzo também foram utilizados como eletrodo de trabalho em experimentos eletroquímicos. O cristal foi anexado ao suporte (TPS-550, Maxtek) feito de Teflon[®], do qual o circuito oscilador é incluso. Nos experimentos foi utilizada uma célula conectada a um banho termostático (“*Digital Temperature Controller*” 9101, Fisher Scientific) que mantém a solução com temperatura constante em 25°C . Antes das análises, a limpeza do eletrodo depositado sobre o cristal piezoelétrico foi

avaliada por meio de voltametria em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. O eletrodo limpo foi, então, imerso em 50 mL de H_2O $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Uma quantidade de 1,0 mL foi removido e utilizado para dissolver a amostra. Em seguida, após a estabilização da frequência a amostra foi injetada utilizando uma seringa. A concentração final utilizada nos experimentos para as espécies modificadoras: iTNA, TNA, Hpyt, pyS e 1,4-dt foi $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Durante a adsorção o sistema ficou sob agitação lenta com o auxílio de uma barra magnética com o intuito de facilitar a homogeneização da solução após injeção da amostra. A agitação lenta e constante não causa mudanças na frequência. Uma vez alcançada o estado estacionário da frequência, o eletrodo foi removido, lavado com água e utilizado para medidas subsequente. Medidas de desorção foram realizadas, conforme descrito no item 3.2.1, logo após o processo de formação das monocamadas descrito acima. A quantidade de moléculas adsorvidas foi determinada e comparadas com aquelas determinada via QCM.

Para os estudos com as metaloproteínas (cyt c e Mb) o mesmo procedimento descrito acima foi realizado, porém, o eletrodo já modificado foi usado em vez do eletrodo limpo e a concentração foi de $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ das proteínas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 7. Medidas eletroquímicas foram realizadas durante o monitoramento da adsorção via QCM. O efeito da varredura de potencial na frequência é muito pequeno (0,1 Hz) e, desta forma, pode ser negligenciado.

3.2.8 Ressonância de Plásmons de Superfície

As medidas do ângulo SPR foram obtidas empregando um instrumento AUTOLAB ESPRIT Eco Chemie B. V., Utrecht, Netherlands equipado com sistema eletroquímico e injeção automática de amostra, (Figura 3.2). Um laser de diodo ($\lambda = 670\text{nm}$) foi empregado como fonte de radiação e um fotodiodo como detector. Discos de Au depositado sobre um cristal foram utilizados como substrato. Para assegurar a confiabilidades dos resultados, os discos não foram reutilizados.

Medidas de SPR foram realizadas com o intuito de avaliar a adsorção das proteínas cyt c e Mb sobre as monocamadas de iTNA, TNA, Hpyt, pyS e 1,4-dt. Inicialmente, água foi injetada na célula devidamente limpa durante alguns minutos até a estabilização do sinal SPR. Após a estabilização, a água foi removida e $100 \text{ } \mu\text{L}$ da solução $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$

do modificador foi adicionada. O sinal foi monitorado até o estado estacionário do sinal, logo em seguida deixou um fluxo de água sobre o disco durante 5 min para remoção de moléculas fracamente adsorvidas. Após a limpeza, foi injetado tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e o sinal foi medido como linha de base. Uma vez alcançada a estabilização do sinal, a célula foi esvaziada e uma solução $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ da proteína (cyt c e Mb) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O sinal foi novamente monitorado até o estado estacionário e seguido pela lavagem com tampão fosfato. O sinal novamente é medido e comparado com o sinal em tampão fosfato antes da adição da proteína. Durante o monitoramento do sinal SPR, medidas eletroquímicas foram realizadas com o objetivo de estudar a TE das proteínas.

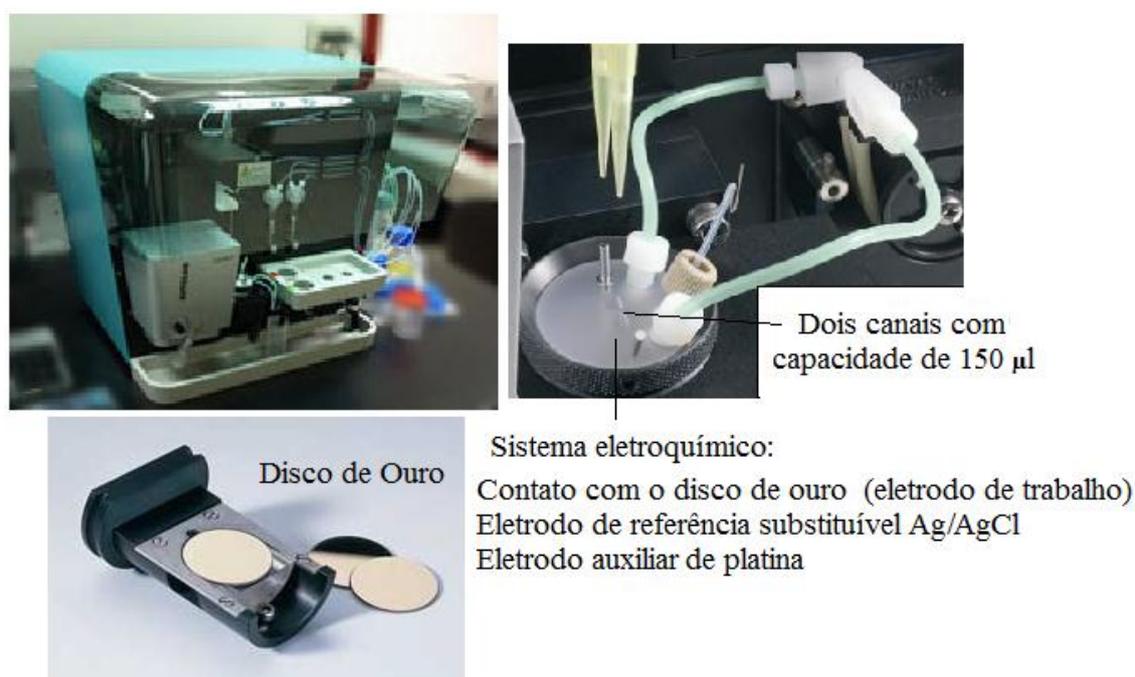


Figura 3.2 – Instrumento AUTOLAB ESPRIT Eco Chemie B. V., Utrecht, Netherlands.

3.2.9 Microscopia de Varredura por Tunelamento (STM –“Scanning Tunneling Microscope”)

O equipamento utilizado para realizar as medidas de STM foi um microscópio de tunelamento modelo Nanoscope IIIA, capaz de ler correntes de tunelamento de 30 pA . Um fio de Tungstênio de $0,25 \text{ mm}$ cortado mecanicamente foi utilizado como sonda.

Filmes de Au(111) depositados sobre mica foram utilizados como substrato. Para a limpeza, os filmes foram recozidos à chama (*“flame-annealing”*) por aproximadamente 1 min. Para a formação das monocamadas, estes filmes foram imersos em soluções aquosas contendo 2,0 mmol L⁻¹ dos compostos sulfurados. O tempo de imersão variou de 5 min a 24h, após imersão os filmes foram lavados com água e etanol e, então, as medidas foram realizadas. Todas as imagens foram obtidas em condições ambientes no modo de altura constante. As imagens de STM foram obtidas pela pesquisadora Dra. Lucidalva Pinheiro no laboratório de microscopia do departamento de Física da Universidade Federal do Ceará.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Formação e Caracterização das Monocamadas Automontadas

Monocamadas podem ser utilizadas em diversas aplicações técnicas. A modulação de monocamadas permite desde a proteção da superfície contra corrosão até o uso como elemento ativo em sensores. Propriedades como tempo de formação, protonação, defeito e estabilidade das monocamadas podem ser determinantes para a aplicação desejada. Em todos os casos, o entendimento da formação e da estrutura da monocamada é um pré-requisito para o uso bem sucedido em aplicações técnicas.

Monocamadas formadas por moléculas sulfuradas são os sistemas mais utilizados para a modificação de superfícies de ouro. Dentre os substratos utilizados, o ouro, seja na forma de filme fino ou coloidal, tem sido o mais largamente empregado. Esta vasta utilização é atribuída, fundamentalmente, a facilidade de obtenção dos filmes e a grande inércia química, exceto com compostos que possuem enxofre. Neste caso a reação é altamente espontânea. Além disso, o ouro pode ser empregado como substrato em várias técnicas, como: voltametria cíclica, SPR, QCM, SERS, STM e EIE, dentre várias outras.

As espécies aromáticas TNA, iTNA, Hpyt e pyS e a espécie 1,4-dt são compostos sulfurados, logo apresentam a possibilidade de adsorverem irreversivelmente sobre a superfície de ouro. A interação destas espécies com a superfície de ouro é esperada ocorrer pelo átomo enxofre. Adicionalmente, os orbitais HOMO (“*Highest Occupied Molecular Orbital*”), calculados para estas espécies, estão distribuídos majoritariamente sobre o átomo de S, conforme ilustrado na Figura 4.1. É possível, entretanto, a contribuição de outros grupos destas moléculas na interação com a superfície.

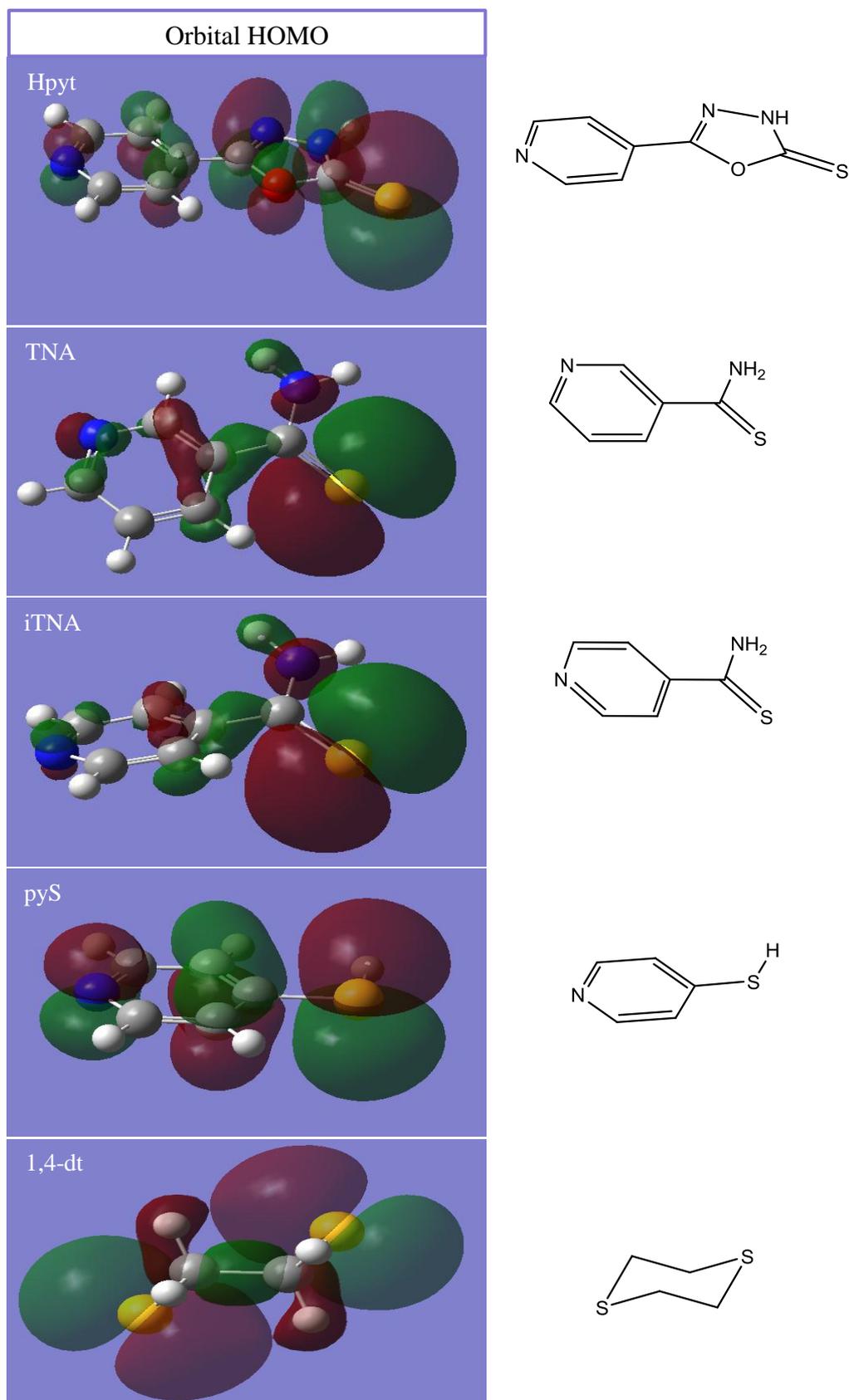


Figura 4.1 – Representação da distribuição do orbital HOMO calculado via DFT para as moléculas Hpyt, TNA, iTNA, pyS e 1,4-dt.

4.1.1 Desorção Redutiva

A varredura linear de potencial de 0 a -1200 mV da superfície de ouro modificada com compostos sulfurados (RS) na presença de KOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, geralmente, apresenta um único processo atribuído à seguinte reação de desorção redutiva^{27,79,123,124}:



O processo de desorção indica o limite da estabilidade eletroquímica das monocamadas com a aplicação de potencial no sentido negativo. Dessa forma, o valor do potencial de desorção redutiva (E_{dr}) deve ser determinado antes da realização de estudos eletroquímicos envolvendo monocamadas automontadas.

E_{dr} é um parâmetro que pode ser utilizado para avaliar a força da interação Au-S. Para moléculas, como por exemplo, a 4-mercaptopiridina¹²⁵ (pyS) adsorvida em ouro policristalino, o valor de E_{dr} é observado em aproximadamente -560 mV. Para esta monocamada é atribuída¹²⁵ uma interação predominantemente σ entre os átomos de Au e S da pyS. Por outro lado, para a monocamada formada pela espécie 1,4-ditiano⁸¹ (1,4-dt), o valor de E_{dr} é observado em aproximadamente -870 mV. Este deslocamento negativo do valor de E_{dr} indica uma interação mais forte entre os átomos de Au e S. Esta interação mais forte é atribuída a uma contribuição π adicional na ligação Au-S.

Para a monocamada de pyS sobre Au(111) um processo em -900 mV aparece após longo período de imersão e com uma tendência a dominar completamente o voltamograma. Este processo foi atribuído^{79,126} à desorção de espécies atômicas e/ou oligoméricas de enxofre resultantes da clivagem oxidativa da ligação C-S. Estas espécies apresentam interação mais forte com a superfície justificando o deslocamento de E_{dr} .

Os voltamogramas de varredura linear para o eletrodo de ouro modificado com as espécies isotiocotinamida (iTNA), tionicotinamida (TNA) e 5-(4-piridil)-1,3,4-(oxadiazol)-2-tiol (Hpyt) estão apresentados na Figura 4.2. Os valores de E_{dr} foram determinados e comparados com valores para outras espécies anteriormente citadas na literatura^{81,125}, conforme apresentado na Tabela 4.1.

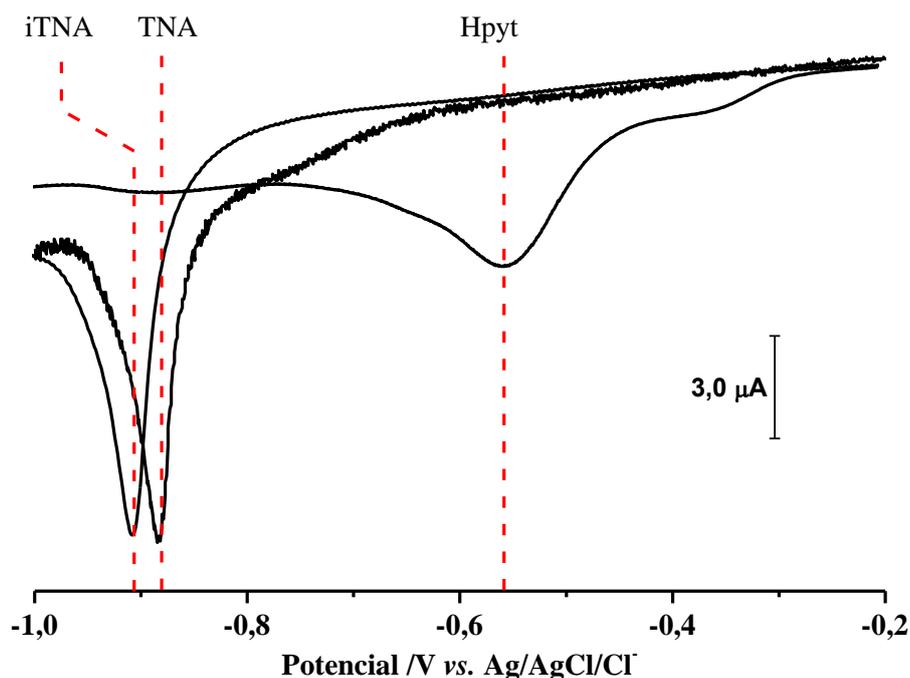


Figura 4.2 – Voltamogramas de varredura linear (LSV – “*Linear Sweep Voltammetry*”) a 50 mV s^{-1} para o eletrodo de ouro modificado com as espécies iTNA, TNA e Hpyt obtidos em KOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Tempo de imersão (valores descritos na Tabela 4.1) na solução modificadora ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$).

Tabela 4.1 – Valores dos potenciais de desorção redutiva, E_{dr} , para algumas moléculas sulfuradas obtidos na presença de KOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Adsorbato	$E_{dr}(\text{mV})$	Tempo de Imersão (min)	Referências
iTNA	- 905	30	Este trabalho
TNA	- 880	30	Este trabalho
1,4-dt	- 870	30	81
pyS	- 560	10	125
Hpyt	- 550	60	Este trabalho

Como pode ser observado na Figura 4.2, o valor de E_{dr} determinado para a espécie Hpyt foi de -550 mV sendo semelhante ao observado para a pyS. Sugere-se, portanto, que a interação entre Hpyt e ouro tem contribuição predominantemente σ . Por outro lado, os

valores de E_{dr} para as espécies iTNA e TNA foram observados em -905 e -880 mV, respectivamente. Estes valores sugerem que estas moléculas, comparativamente a Hpyt e pyS, encontram-se mais fortemente ligadas à superfície. Baseando-se nos resultados reportados para a adsorção de moléculas de 1,4-dt, sugere-se que a interação destas espécies com a superfície de ouro envolve ligações π .

A carga do processo de desorção redutiva (Q_{dr}) é outro parâmetro importante que pode ser obtido a partir das medidas de desorção redutiva. O valor de Q_{dr} pode ser obtido a partir da razão entre a área do processo referente à desorção redutiva e a velocidade de varredura (v). Uma vez determinado o valor de Q_{dr} é possível, então, calcular a quantidade de moléculas adsorvidas sobre a superfície (Γ). O valor de Γ pode ser determinado aplicando o valor de Q_{dr} a seguinte equação:

$$\Gamma = \frac{Q_{dr}}{nFA_{ativa}} \quad (4.2)$$

onde n é o número de elétrons envolvidos da reação de redução, F é a constante de Faraday (96485 C mol^{-1}) e A_{ativa} é a área eletroquimicamente ativa do eletrodo.

A determinação de Γ em função do tempo de imersão e da concentração da espécie modificadora em solução permite uma avaliação cinética e termodinâmica do processo de adsorção.

4.1.2 Cinética e Termodinâmica de Adsorção

O entendimento do processo de adsorção em uma interface metal/solução requer o conhecimento tanto da situação de equilíbrio, que é termodinâmico, como do tempo de adsorção, ou seja, da cinética. O processo de adsorção pode ser entendido como uma competição entre íons e/ou moléculas do solvente e do adsorbato pelo sítio de adsorção na superfície do substrato. Desta maneira, a competição pode ser expressa¹²⁷ como um equilíbrio de forma geral:



onde A_{sol} representa as moléculas do adsorbato em solução; S_{ads} as moléculas de solvente e/ou íons pré-adsorvidos na superfície do substrato; A_{ads} as moléculas do adsorbato na

superfície e S_{sol} as moléculas do solvente e/ou íons na superfície deslocados para a solução. A condição de equilíbrio diante deste formalismo pode ser dada por:

$$\bar{\mu}_{A(sol)} + \bar{\mu}_{S(ads)} = \bar{\mu}_{A(ads)} + \bar{\mu}_{S(sol)} \quad (4.4)$$

onde $\bar{\mu}$ representa o potencial eletroquímico das espécies anteriormente mencionadas. Expandindo a equação em termos de potenciais eletroquímicos padrões e atividades, a seguinte equação é obtida:

$$\mu_{A(sol)}^0 + RT \ln a_{A(sol)} + \mu_{S(ads)}^0 + RT \ln a_{S(ads)} = \mu_{A(ads)}^0 + RT \ln a_{A(ads)} + \mu_{S(sol)}^0 + RT \ln a_{S(sol)} \quad (4.5)$$

onde R e T são, respectivamente, constante dos gases e temperatura absoluta. Rearranjando, obtém-se a seguinte equação:

$$\frac{a_{A(ads)}}{a_{S(ads)}} = \left[\left(e^{-\frac{\mu_{A(ads)}^0 + \mu_{S(sol)}^0 - \mu_{S(ads)}^0 - \mu_{A(sol)}^0}{RT}} \right) \frac{1}{a_{S(sol)}} \right] a_{A(sol)} \quad (4.6)$$

onde, $a_{A(ads)}$ e $a_{S(ads)}$ representam as atividades da espécie $A(ads)$ e $S(ads)$, respectivamente, na superfície do substrato e $a_{A(sol)}$ e $a_{S(sol)}$ representam as atividades do adsorbato em solução e do solvente e/ou íons presentes na solução, respectivamente. O numerador do termo exponencial representa a energia livre padrão de adsorção, ΔG_{ads}^0 . Para temperatura constante o termo entre colchetes é constante e pode ser expresso como:

$$\frac{a_{A(ads)}}{a_{S(ads)}} = \beta a_{A(sol)} \quad (4.7)$$

onde β é dado por:

$$\beta = \left[e^{-\frac{\Delta G_{ads}^0}{RT}} \right] \frac{1}{a_{S(sol)}} \quad (4.8)$$

A Equação 4.7 expressa a relação entre a atividade das espécies em solução com as espécies adsorvidas. Esta é uma expressão geral que não depende de uma isoterma específica e nem de um modelo cinético específico.

A relação de equilíbrio entre $a_{A(sol)}$ e $a_{A(ads)}$ pode ser descrita por uma isoterma de adsorção. O modelo de isoterma de Langmuir é o mais simples e descreve um processo de adsorção no qual não há interação entre as moléculas do adsorbato. Portanto, é assumido que a energia livre de adsorção, ΔG_{ads} , é independente de Γ . A isoterma de Langmuir é descrita por¹²⁸:

$$\beta C^* = \frac{\theta}{1-\theta} \quad (4.9)$$

onde β é o coeficiente de adsorção, C^* é a concentração do adsorbato em solução, θ é a taxa de recobrimento da superfície definida como Γ/Γ_s , onde Γ_s é a quantidade de moléculas adsorvidas na condição de saturação. Por outro lado, se interações atrativas ou repulsivas adsorbato/adsorbato estão presentes, um termo exponencial é adicionado à isoterma de Langmuir. Uma das isotermas mais simples, onde interações atrativas ou repulsivas são consideradas, foi proposta por Frumkin. Esta isoterma é descrita por¹²⁹:

$$\beta C^* = \frac{\theta}{1-\theta} e^{-2g\theta} \quad (4.10)$$

onde g é o parâmetro de interação considerando as interações adsorbato/adsorbato. A isoterma de Frumkin é reduzida a isoterma de Langmuir quando $g = 0$, enquanto $g > 0$ e $g < 0$ indica, respectivamente, interações atrativas e repulsivas entre as moléculas do adsorbato. Ao contrário da isoterma de Langmuir, a energia livre de adsorção é dependente da cobertura superficial.

A monocamada formada por pyS apresenta uma decomposição espontânea relativamente rápida^{40,43}. Logo, os valores de Γ não representam a quantidade real de moléculas adsorvidas na superfície. Dessa forma, estudos termodinâmicos não foram realizados para esta espécie. Para a monocamada de 1,4-dt o comportamento do processo de desorção apresentou um comportamento atípico. O processo de desorção em grande parte dos experimentos não foi observado ou foi observada uma quantidade relativamente pequena. Os valores de Γ determinados por desorção não apresentaram nenhuma tendência com a concentração, temperatura e tempo de imersão. Por esta razão, os estudos termodinâmicos não foram concluídos. Por outro lado, os valores de Γ , determinados a partir de medidas de desorção reductiva, para as monocamadas formadas por iTNA, TNA e Hpyt apresentaram dependência com a concentração, temperatura e tempo de imersão.

Os dados experimentais obtidos para iTNA, TNA e Hpyt apresentaram uma boa concordância com o modelo teórico da isoterma de Langmuir como pode ser visto na Figura 4.3.

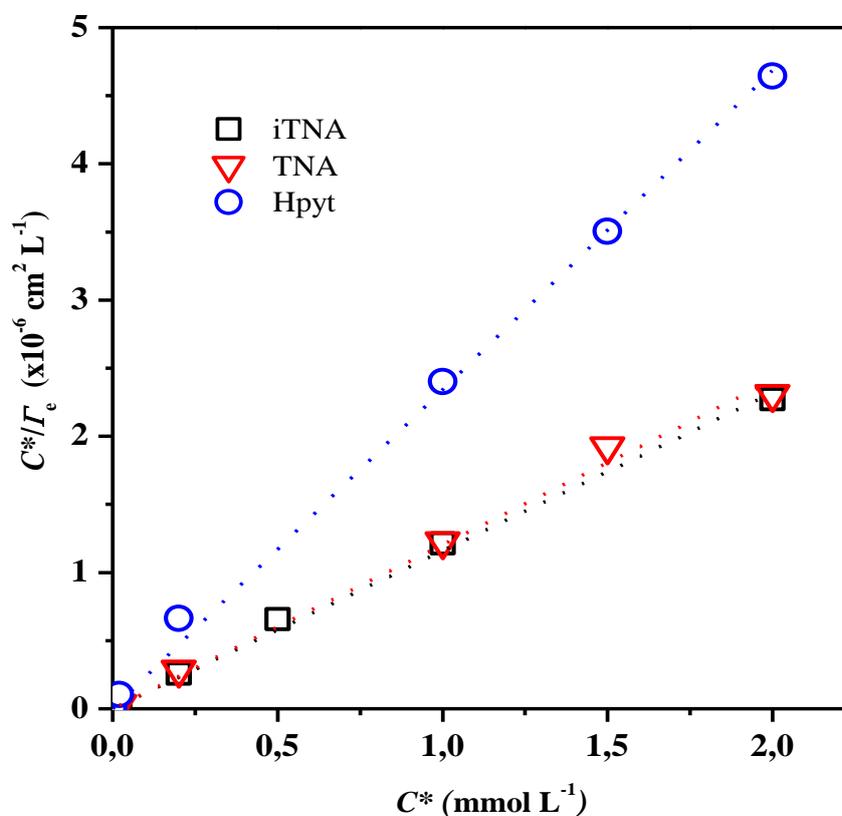


Figura 4.3 – Dados experimentais para a adsorção de (∇)TNA, (\circ) Hpyt e (\square) iTNA sobre o eletrodo Au a 20 °C e dados simulados (linha tracejada) para a isoterma de Langmuir linearizada

Inicialmente, os valores do coeficiente de adsorção, β , e a quantidade máxima de moléculas adsorvidas, Γ_s , foram determinados graficamente a partir da equação de Langmuir (Equação 4.9) linearizada. Assim, o gráfico de C^*/Γ vs. C^* contém $1/\Gamma_s$ e $1/\Gamma_s\beta$ como inclinação e intersecção, respectivamente. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 4.2.

O coeficiente de adsorção β foi utilizado para calcular a energia livre de adsorção, ΔG_{ads} (Tabela 4.2), de acordo com a Equação 4.8, considerando a_s como a concentração da água (55,5 mol L⁻¹) e o coeficiente de atividade incluso em β . O valor médio de ΔG_{ads} , que fornece uma medida quantitativa da força de adsorção, foi calculado como -34,9, -38,5 e -35,9 kJ mol⁻¹, para iTNA, TNA e Hpyt, respectivamente. Estes valores são

coerentes com resultados posteriormente publicados que consideram uma interação forte entre adsorbato e substrato. Abruña e colaboradores¹²⁹ reportaram um valor de ΔG_{ads} em aproximadamente $-50,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ para a quimissorção de complexos de ósmio sobre platina. Abruña¹³⁰ também sugere que a magnitude de $-21,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ para ΔG_{ads} é indicativo de uma interação moderadamente forte para moléculas de *o*-hidroquinona com a superfície de platina. Hong¹³ calculou o valor de ΔG_{ads} em $-38,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ para a adsorção de 2-(*n*-mercaptoalquil)hidroquinona ($n = 4,6,8,10,12$) sobre ouro.

Tabela 4.2 – Parâmetros termodinâmicos para o processo de adsorção das espécies iTNA, TNA e Hpyt sobre ouro.

<i>SAM</i>	<i>T</i> (°C)	Γ_s ($\times 10^{10} \text{ mol cm}^{-2}$)	$\beta \times 10^3$ (L mol^{-1})	ΔG_{ads} (kJ mol^{-1})	<i>g</i>
Hpyt	10	4,29	6,9	$-35,9 \pm 2,4$	-0,45
	20	4,37	7,6		
	30	4,48	7,0		
	40	4,59	5,2		
	50	4,69	4,9		
TNA	10	7,94	108,0	$-38,5 \pm 1,7$	-0,30
	20	8,33	99,7		
	30	7,81	41,5		
	40	8,47	83,4		
	50	9,09	77,3		
iTNA	10	8,74	17,8	$-34,9 \pm 1,5$	-0,10
	20	8,87	23,8		
	35	9,89	15,6		
	50	10,10	18,8		

A Figura 4.4 mostra os gráficos dos valores de Γ no equilíbrio (Γ_e) em função da concentração do adsorbato em solução, C^* . As curvas sólidas representam as melhores correlações dos dados experimentais para a isoterma de Langmuir. As curvas tracejadas representam os melhores ajustes para a isoterma de Frumkin. Os valores usados para β e

Γ_s foram aqueles obtidos a partir da correlação linear da isoterma de Langmuir considerando o fato que a diferença entre esses dois modelos é o grau da interação entre as moléculas do adsorbato. A isoterma de Frumkin foi calculada variando o parâmetro de interação, g , até alcançar a melhor correlação com os dados experimentais e, dessa forma, determinar se ocorrem interações repulsivas ou atrativas entre as cadeias das moléculas adsorvidas.

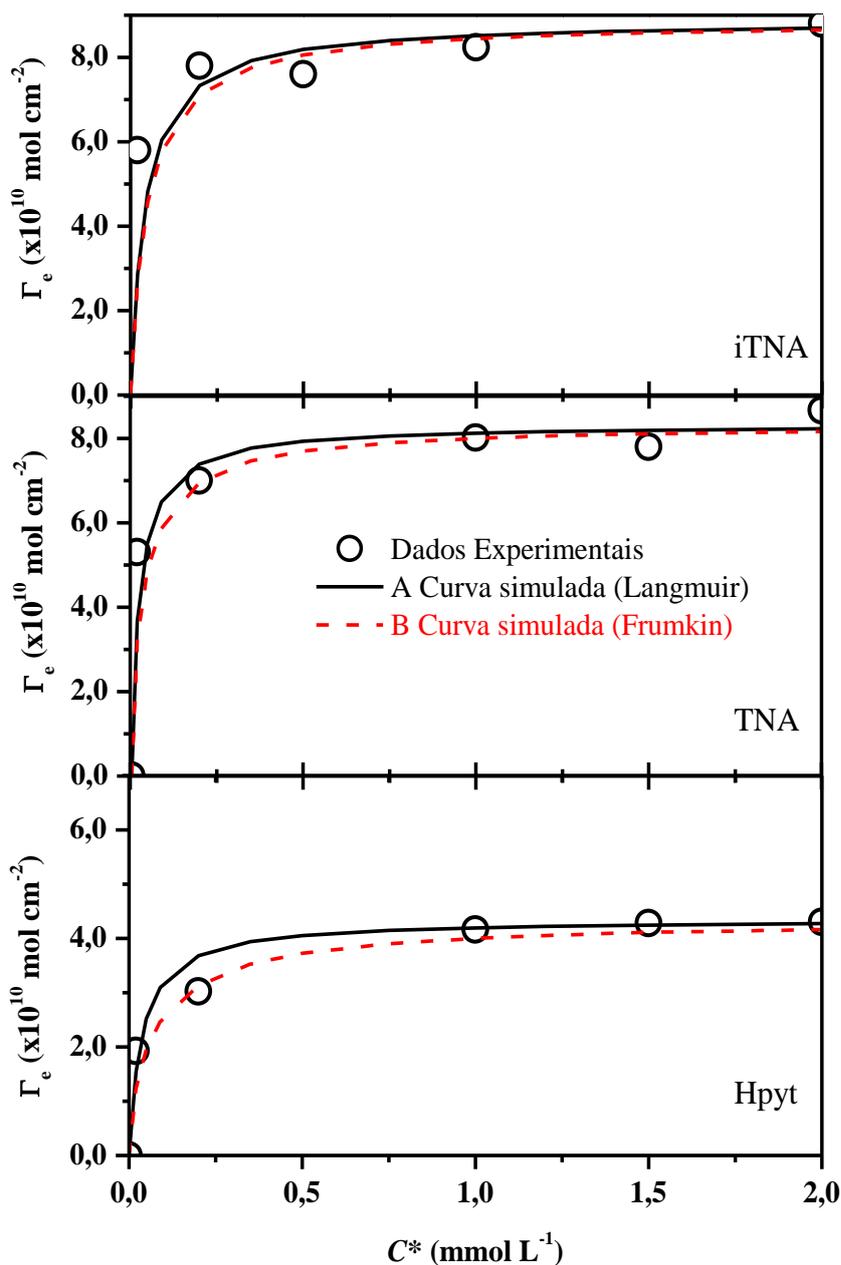


Figura 4.4 – Dados experimentais (o) e as curvas teóricas para a isoterma de Langmuir (curvas sólidas) e Frumkin (curvas tracejadas), com $g = -0,10$, $-0,30$ e $-0,45$ para a adsorção das monocamadas de iTNA, TNA e Hpyt, respectivamente. $T = 20^\circ\text{C}$.

Aplicando-se a isoterma de Frumkin (Equação 4.10), o melhor ajuste aos dados experimentais foi obtido quando o valor médio do parâmetro de interação, g , foi considerado como $-0,10$, $-0,30$ e $-0,45$ para iTNA, TNA e Hpyt, respectivamente, como pode ser visto na Tabela 4.3. Estes valores indicam uma pequena¹²⁹ interação repulsiva entre as moléculas do adsorbato. Uma maior repulsão entre as moléculas na monocamada de Hpyt é esperada, pois apresenta maior densidade eletrônica em comparação às espécies TNA e iTNA.

A determinação de Γ em função do tempo de imersão a uma temperatura constante permite o estudo cinético do processo de adsorção de monocamadas automontadas.

As velocidades de adsorção e desorção, respectivamente, podem ser escritas como:

$$v_{ads} = k_{ads} a_{A(sol)} a_{S(ads)} \quad (4.11)$$

$$v_{des} = k_{des} a_{A(ads)} a_{S(sol)} \quad (4.12)$$

A partir das equações acima, pode-se aplicar um modelo específico de isoterma para determinar a relação $a_{A(ads)}/a_{S(ads)}$.

Dois modelos baseados no equilíbrio de adsorção são considerados para explicar a cinética de adsorção¹²⁷. O primeiro assume que o sistema é controlado cineticamente, enquanto o outro considera uma adsorção rápida com o sistema controlado então pelo transporte de massa. Para um sistema cineticamente controlado, seguindo-se o modelo de Langmuir, assume-se que o parâmetro de interação g é pequeno e que a cobertura superficial é relativamente baixa. Sob essas condições, os modelos de isoterma de Langmuir e Frumkin se convergem. Desta forma, o número de variáveis ajustáveis é minimizado. Quando o modelo de Langmuir é aplicado, $a_{A(ads)}$ é geralmente expressa como θ , $a_{S(ads)}$ como $(1 - \theta)$ e a atividade de A em solução como $a_{A(sol)} = \gamma_{A(sol)} C^*$, onde γ é o coeficiente de atividade. A Equação 4.11 pode ser escrita como:

$$v = k' C^* (1 - \theta) = \frac{d\theta}{dt} \quad (4.13)$$

onde, $k' = \vec{k} \gamma_{A(sol)}$. Após a integração da Equação 4.13 e assumindo forte interação entre o adsorbato e o substrato para que a desorção seja negligenciada, a dependência de Γ em função do tempo é obtida como:

$$\Gamma = \Gamma_s \left(1 - e^{-k' C^* t} \right) \quad (4.14)$$

A equação acima é um caso específico da expressão geral:

$$\Gamma = \Gamma_e \left(1 - e^{-k' C^* t} \right) \quad (4.15)$$

onde Γ_e é Γ no equilíbrio para uma dada concentração. Quando a concentração é aumentada, o valor Γ_e aumentará até atingir o valor máximo, Γ_s . No entanto, até atingir a saturação, Γ_e será controlado pela concentração de $A_{(sol)}$.

No caso de controle por transporte de massa, considerando-se apenas difusão, o pressuposto básico é a difusão semi-infinita linear de uma espécie na solução em direção a um plano estacionário na superfície do eletrodo, seguida de uma adsorção descrita pelo modelo de Langmuir. Neste modelo, é assumido que a adsorção é rápida e a concentração do adsorbato em solução na camada adjacente à superfície do substrato é imediatamente reduzida a zero até que a superfície atinja o estado de saturação. Nestas condições, a variação da quantidade de moléculas adsorvidas em função do tempo é descrita por:

$$\frac{\Gamma_t}{\Gamma_s} = K \left(\frac{C^*}{\Gamma_s} \right) (Dt)^{1/2} \quad (4.16)$$

onde D é o coeficiente de difusão do adsorbato, t é o tempo, Γ_t e Γ_s são, respectivamente, a quantidade de moléculas adsorvidas em um tempo t e no estado de saturação da superfície e K é uma constante que equivale a $2\pi^{1/2}$.

Os resultados obtidos para a variação de Γ em função do tempo de imersão do eletrodo de ouro em soluções contendo iTNA, TNA ou Hpyt estão apresentados na Figura 4.5. A correlação dos dados experimentais foi obtida a partir da Equação 4.15 com Γ_e e k' como parâmetros ajustáveis.

Tabela 4.3 – Parâmetros cinéticos para a adsorção das monocamadas de iTNA, TNA e Hpyt.

Adsorbato	Γ_e ($\times 10^{-10}$ mol L $^{-1}$)	k' (L mol $^{-1}$ s $^{-1}$)
iTNA	3,2	90,0
TNA	7,0	65,0
Hpyt	8,2	6,9

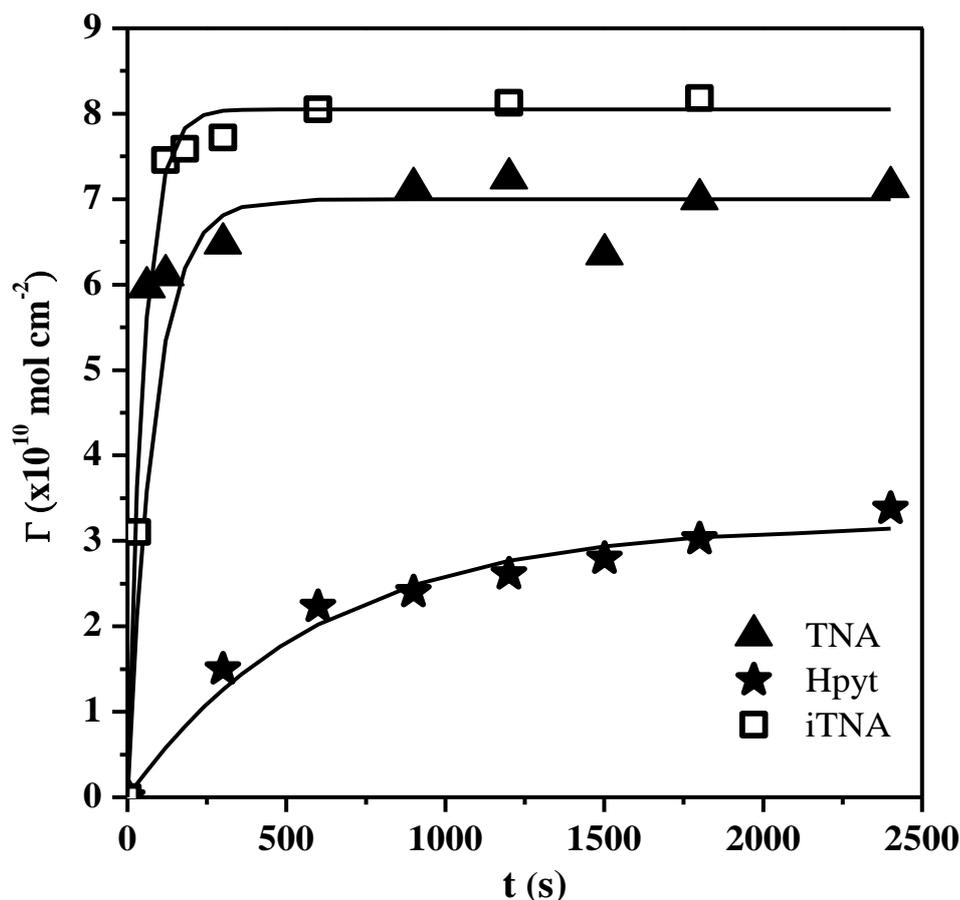


Figura 4.5 – Variação de Γ em função do tempo de imersão para o processo de adsorção de iTNA, TNA e Hpyt a 20°C com a concentração das soluções modificadoras de 0,2 mmol L⁻¹. Dados experimentais para (▲) TNA, (□) Hpyt e (★) iTNA e curva simulada (linha sólida) a partir da Equação 4.15 com k' e Γ_e como parâmetro ajustável (Tabela 4.3).

Os resultados experimentais para os processos de adsorção das espécies iTNA, TNA e Hpyt tiveram boa concordância com a curva teórica simulada da Equação 4.15. Desta forma, estes resultados sugerem que, em todos os processos, a reação de adsorção é cineticamente controlada. A partir do modelo que sugere a adsorção cineticamente controlada, os valores de k' foram calculados para os processos de adsorção a 20°C das monocamadas de iTNA, TNA e Hpyt como 90,9, 65,0 e 6,9 L mol⁻¹s⁻¹, respectivamente. Estes valores indicam que a velocidade de adsorção das espécies TNA e iTNA é significante maior em relação a adsorção de Hpyt.

Adicionalmente, os gráficos de Γ normalizado (Γ/Γ_e) vs. $t^{1/2}$ (Figura 4.6) não apresentaram uma relação linear conforme esperado para adsorção controlada por difusão

(Equação 4.16). Este resultado reforça a sugestão de adsorção cineticamente controlada para o processo de adsorção das espécies estudadas sobre ouro.

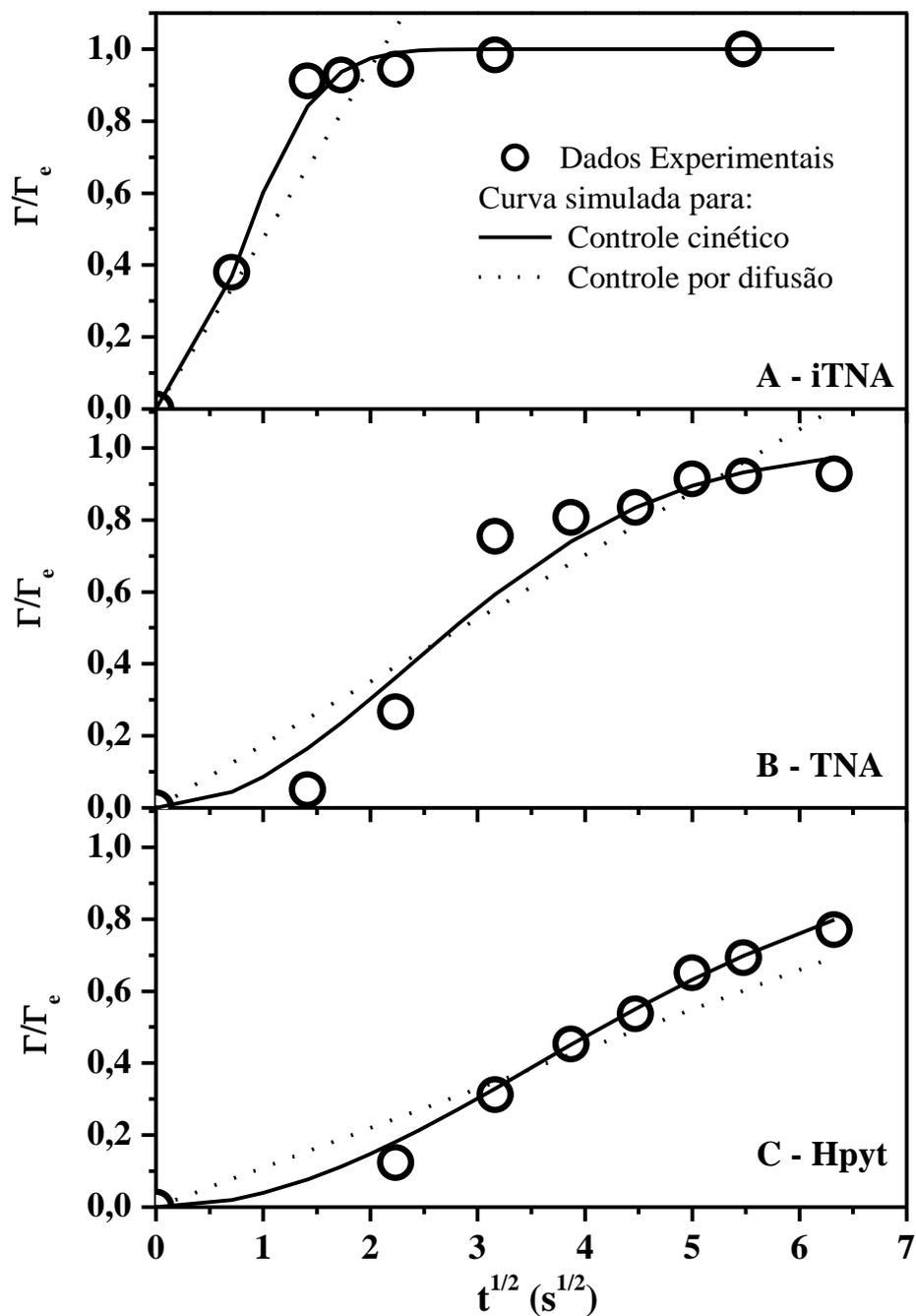


Figura 4.6 $-\Gamma/\Gamma_e$ vs. $t^{1/2}$ para a adsorção de (A) iTNA, (B) TNA e (C) Hpyt sobre o eletrodo de Au a 20°C e com a concentração da espécie modificadora de 0,2 mmol L⁻¹. As curvas sólidas e pontilhadas referem-se à simulação, respectivamente, para um processo controlado cineticamente (Equação 4.15) e por difusão (Equação 4.16).

4.1.3 Microbalança de Cristal de Quartzo (Quartz Crystal Microbalance - QCM)

A Microbalança de Quartzo (QCM) é uma técnica gravimétrica utilizada para o monitoramento em tempo real de mudanças ocorridas na superfície de um transdutor piezoeletrico. Um disco de cristal piezoeletrico de quartzo coberto por uma película metálica é acoplado a um circuito de oscilação que aplica um campo elétrico alternado ao cristal e diretamente ligado a um medidor de frequência¹³¹. Mudança de massa na superfície desse disco decorrente da deposição de um material acarreta na redução da amplitude da onda e na frequência de ressonância.

A variação de massa, Δm , adsorvida na superfície em função da variação de frequência, Δf , foi primeiramente proposta por Sauerbrey¹³² que propôs a seguinte equação.

$$\Delta m = \left(\frac{A \sqrt{\mu_c \rho_c}}{2 f_0^2} \right) \Delta f = -C_f \Delta f \quad (4.17)$$

onde μ_c é o módulo de cisalhamento ($2,95 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$), A é a área geométrica piezoeletricamente ativa em cm^2 definida pela projeção dos filmes metálicos depositadas sobre o cristal, f_0 é a frequência fundamental do cristal, ρ_c é a densidade do quartzo ($2,65 \text{ g cm}^{-3}$) e C_f é a constante de proporcionalidade ($C_f = 17,7 \text{ ng Hz}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ para cristais de 5 MHz utilizados nesse trabalho).

A técnica é extremamente sensível sendo capaz de medir variações de massa na ordem de alguns nanogramas por cm^2 . Deste modo, permite o acompanhamento *in situ* de processos de formação de monocamadas sobre a superfície do disco. A variação da frequência resultante da adsorção de moléculas sobre o eletrodo permite uma medição direta da taxa de formação de SAMs. Neste contexto, a técnica de QCM foi utilizada para o monitoramento dos processos de adsorção das moléculas sulfuradas iTNA, TNA, Hpyt, pyS e 1,4-dt sobre ouro a temperatura de 25 °C. Os valores de Δf em função do tempo de imersão para cada molécula estão ilustrados na Figura 4.7.

As soluções contendo as espécies modificadoras foram injetadas após a estabilização da frequência (cerca de 10 min). No geral, após a injeção, observou-se uma rápida diminuição de frequência nos primeiros 5 min. Para os processos de adsorção das

moléculas de iTNA e TNA de Δf , após 5 min, aumentam gradualmente até atingir valores constantes. Para moléculas de Hpyt, pyS e 1,4-dt, de forma contrária, os valores de Δf continuam a diminuir, após 5 min iniciais, até atingir um valor constante. Depois de aproximadamente 30 minutos sem variação da frequência é assumido que os processos de adsorção e desorção estão em equilíbrio e a variação de massa obtida via QCM (Δm_{QCM}) em g cm^{-2} foi calculada a partir da equação 4.17, conforme mostrado na Tabela 4.4:

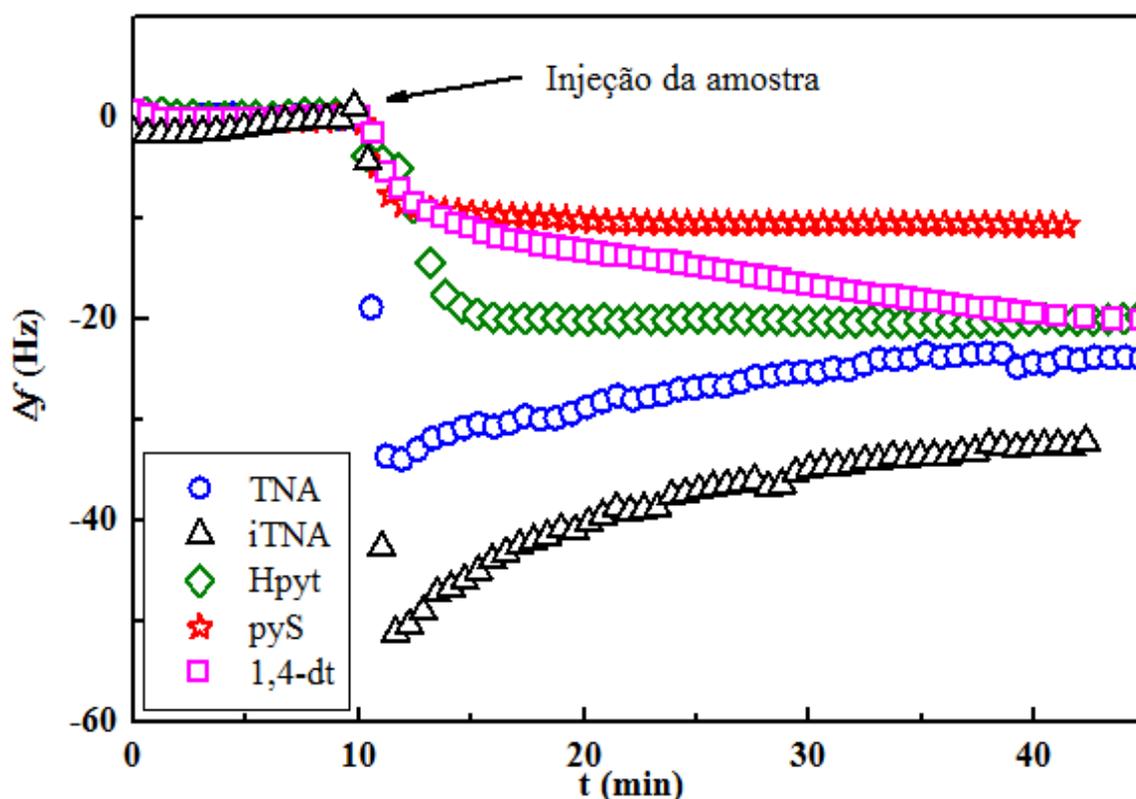


Figura 4.7 – Gráfico de variação da frequência do cristal em relação ao tempo de imersão em soluções aquosas contendo $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ dos compostos: (●)TNA, (Δ)iTNA, (◇)Hpyt, (★)pyS e (□) 1,4-dt a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Após alcançar o equilíbrio, o eletrodo foi transferido para uma célula contendo KOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ onde o potencial foi aplicado ao eletrodo de trabalho no sentido negativo de $0,0$ a $-1,2\text{V}$ a fim de observar a desorção redutiva da monocamada. A partir da carga do processo de desorção observado, foram calculados os valores de Γ_e utilizando a Equação 4.2. O produto entre Γ_e e a massa molecular do adsorbato equivale a variação

de massa calculada via desorção redutiva (Δm_{DR}) em g cm^{-2} . A variação de massa observada via QCM foi superior à calculada por desorção redutiva. Comportamento similar (34 moléculas de H_2O) foi observado por Abruña e Takada ao estudar o processo de adsorção de complexos de ósmio sobre platina utilizando QCM em conjunto com eletroquímica. Estes autores atribuíram o excesso de massa à presença de moléculas de água co-adsorvidas ou a adsorção de eletrólito não dissociado. Visto que, além da amostra somente água está presente no sistema, o excesso de massa adsorvido foi atribuído à presença de moléculas de água co-adsorvidas. A partir da divisão do excesso de massa, ou seja, a diferença entre Δm_{QCM} e Δm_{DR} , pelo peso molecular da água e Γ_e , determinou-se a quantidade de moléculas de água adsorvidas por moléculas do adsorbato, conforme apresentado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Comparação dos valores da variação de massa (Δm_{QCM}) observada via QCM e calculada por voltametria (Δm_{DR}).

SAM	$\Delta m (\mu\text{g cm}^{-2})$		$\Gamma_e \times 10^{10}$ (mol cm^{-2})	Moléculas de H_2O *
	(QCM)	(DR)		
TNA	$0,48 \pm 0,05$	$0,10 \pm 0,005$	7,7	29 ± 8
iTNA	$0,65 \pm 0,07$	$0,12 \pm 0,003$	9,0	34 ± 4
Hpyt	$0,49 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,022$	5,5	28 ± 7
pyS	$0,35 \pm 0,15$	$0,07 \pm 0,036$	6,5	17 ± 6
1,4-dt	$0,39 \pm 0,07$	$0,11 \pm 0,057$	9,1	17 ± 3

$$*\text{cálculo: moléc.}(\text{H}_2\text{O}) = \Delta m_{QCM} - \Delta m_{DR} / 18(\text{g mol}^{-1}) \Gamma_e$$

Conforme apresentado na Tabela 4.4, a variação de massa observada via QCM não apresenta os mesmos valores calculados por eletroquímica. Isto pode ser decorrente da diferença no grau de hidrofiliicidade das moléculas estudadas. O valor do momento

dipolar destas moléculas livre de adsorção foram calculados* e comparados com a quantidade de moléculas de água co-adsorvida, conforme ilustrado na Figura 4.8.

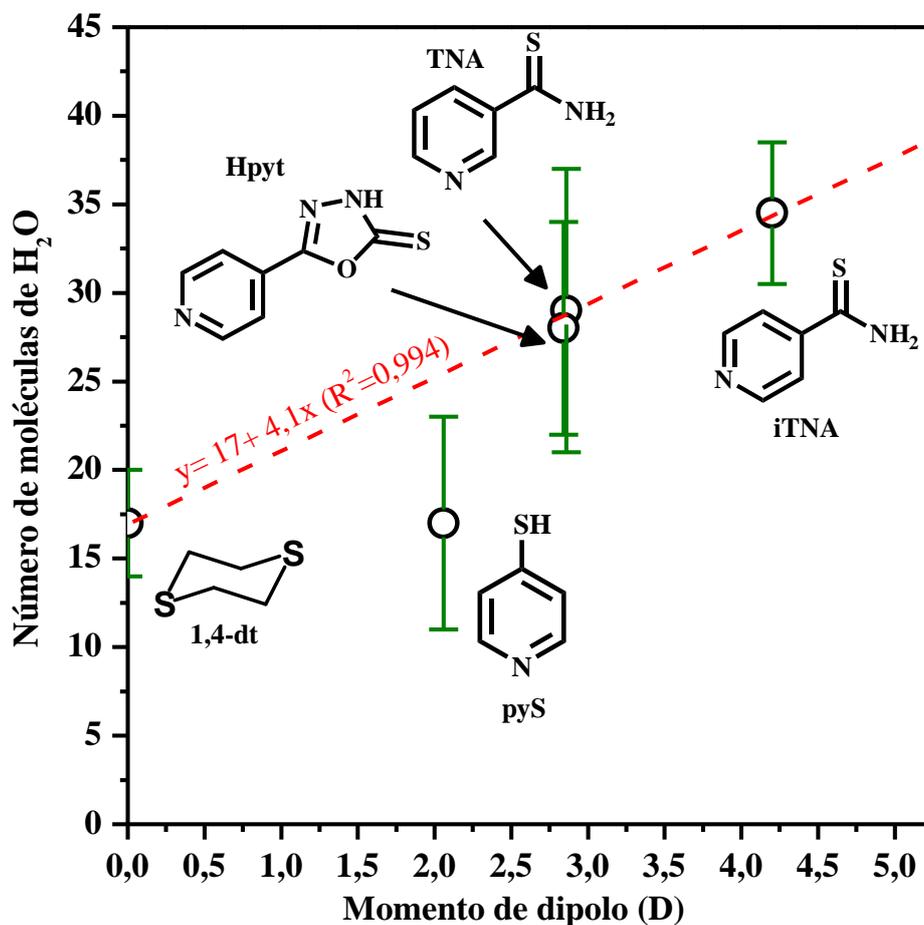


Figura 4.8 – Valores do momento de dipolo calculados para as moléculas de TNA, iTNA, Hpyt, pyS e 1,4-dt em função da quantidade de moléculas de água co-adsorvidas nas respectivas monocamadas.

Como pode ser visto na Figura 4.8 (linha pontilhada), desconsiderando a espécie pyS o comportamento da quantidade de moléculas adsorvidas nas monocamadas apresenta uma boa concordância com o valor do momento de dipolo, ainda que após adsorção, o momento dipolar destas espécies possa ser modificado. A molécula pyS não apresenta correlação com as demais espécies estudadas. Várias são as possibilidades para

* O valor do momento de dipolo foi calculado utilizando o programa Gaussian03W versão 6.1 revisão D.01. A Teoria do Funcional da Densidade (DFT) com o funcional B3LYP restrito e conjunto de bases 6-311G⁺⁺ foi utilizada como condições de cálculo para a minimização da energia do estado fundamental.

esta observação, podendo-se citar: o equilíbrio tautomérico - caso a espécie tiona seja considerada, o valor do momento de dipolo seria 8,6 o que resultaria em aproximadamente 50 moléculas de H₂O; a decomposição da monocamada – a literatura^{79,126} sugere que a oxidação da ligação C–S resulta em uma monocamada formada por espécies atômicas e/ou oligoméricas de enxofre; irregularidades da monocamada.

4.1.4 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica envolve a aplicação de uma perturbação de potencial ou de corrente no sistema sob investigação. A perturbação do sistema é realizada mediante a aplicação de um potencial contínuo (potencial central aplicado) sobre a qual é superimosta uma variação senoidal de potencial com pequena amplitude. Este método de aplicação do potencial possibilita que o sistema seja perturbado empregando poucos milivolts de forma a tornar possível a investigação de fenômenos eletroquímicos próximos ao estado de equilíbrio. Adicionalmente, é possível perturbar o sistema usando diferentes valores de frequência, pois a onda de potencial é senoidal resultando em uma corrente de natureza, também, senoidal. Mediante o monitoramento da relação entre o potencial aplicado e a corrente obtém-se a impedância do sistema e o ângulo de fase (defasagem da corrente em relação ao potencial aplicado). O conceito de impedância, originalmente introduzido para descrever a resposta de sistemas compostos por capacitâncias, resistências e indutâncias, estendeu-se aos sistemas eletroquímicos. Assim, a partir das medidas da impedância e ângulo de fase, é possível avaliar processos como transportes de carga (incluindo estimativa de velocidade de transferência), condutividade de filmes, capacitância do sistema redox e da dupla camada, entre outros. Em estudos relacionados à monocamadas automontadas de compostos sulfurados sobre ouro, EIE tem sido empregada no estudo da cinética de adsorção, na caracterização de defeitos, na avaliação do grau de cobertura e para a obtenção de coeficiente de velocidade de transferência de carga. Usualmente, o diagrama de Nyquist (Figura 4.9), o mais utilizados para representar os fenômenos eletroquímicos, apresenta os dados de impedância por meio da relação entre os valores de impedância imaginária ($Z_{\text{imaginária}}$) vs. real (Z_{real}). Nesse diagrama a presença de espécies eletroativas em solução,

é observada, geralmente, por um semicírculo (arco capacitivo) visível na região de mais alta frequência. Esse arco está relacionado ao processo de transferência de carga das espécies eletroativas na interface eletrodo/solução. Na região de mais baixas frequências, pode ser visualizada uma distribuição linear dos pontos experimentais em função da frequência que está relacionada ao processo difusional dessa espécie eletroativa.

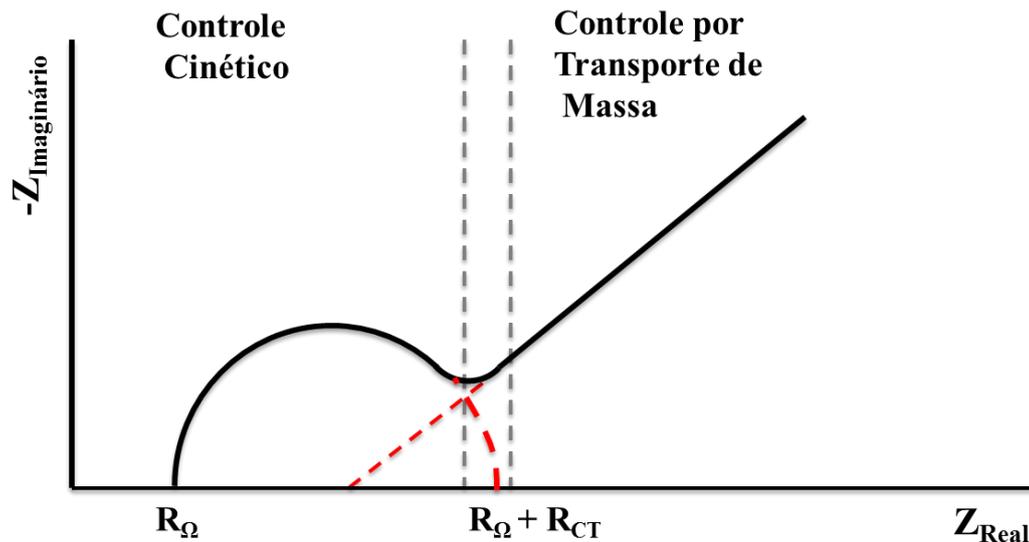


Figura 4.9 - Representação esquemática de uma resposta de impedância eletroquímica para um sistema onde ocorre transferência de carga de uma espécie eletroativa controlada por difusão.

$$Z_{Real} = R_{\Omega} + \frac{R_{CT}}{1 + \omega^2 C_d^2 R_{CT}^2} \text{ e } Z_{Imaginário} = \frac{\omega^2 C_d^2 R_{CT}^2}{1 + \omega^2 C_d^2 R_{CT}^2} \text{ onde } R_{\Omega} - \text{resistência da solução, } R_{CT} -$$

resistência à transferência de carga, ω - frequência angular e C_d - capacitância da dupla camada elétrica.

Os processos de adsorção das monocamadas formadas por pyS e 1,4-dt por EIS foram publicados anteriormente^{133,134}. Neste trabalho, foi realizado o acompanhamento apenas dos processos de formação das monocamadas de iTNA, TNA e Hpyt. Os diagramas EIE obtidos para a superfície de ouro modificada com estas espécies, após diferentes tempos de imersão estão apresentados na Figura 4.10.

Como pode ser visto na Figura 4.10, os arcos capacitivos nas regiões de mais altas frequências são maiores para os eletrodos modificados do que para o eletrodo não-modificado. Observando a região correspondente a altas frequências, há um acréscimo

dos valores de impedância como indicado pelo alargamento do arco capacitivo em função do aumento do tempo imersão do eletrodo de ouro nas soluções modificadoras. Os valores de resistência à transferência de carga (R_{CT}) foram determinados a partir do diâmetro do arco capacitivo no eixo real dos diagramas.

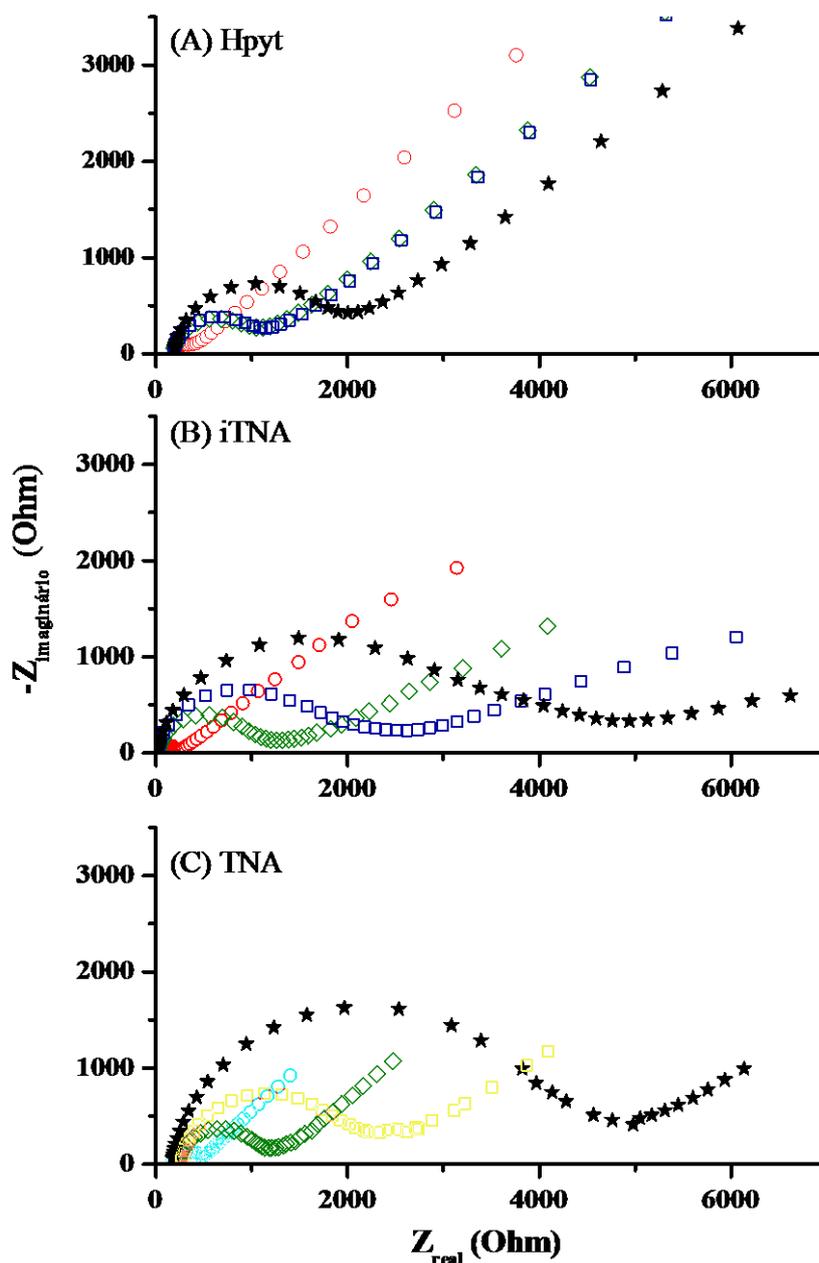


Figura 4.10 – Diagramas de EIE obtidos em solução contendo $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} + 8,0 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ para o eletrodo de ouro limpo (\bullet) e para os eletrodos modificados com (A) Hpyt, (B) iTNA e (C) TNA após 5 min (\diamond), 30 min (\square) e 1440 min (\star) de imersão em solução $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ das espécies modificadoras.

Considerando que a corrente faradáica do processo redox das espécies eletroativas ocorre somente sobre os sítios ativos (defeitos) existentes no eletrodo modificado, pode-se calcular a taxa de recobrimento (θ) pela Equação 4.18¹³⁵:

$$\theta = 1 - \frac{R_{CT}}{R_{CT}^*} \quad (4.18)$$

onde R_{CT} e R_{CT}^* são, respectivamente, os valores da resistência a transferência de carga para o ouro limpo e para a superfície modificada obtidos a partir dos diagramas de impedância. A partir dos resultados experimentais de EIE foi possível calcular as constantes de velocidade de transferência de elétrons (k_{app}) para o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ baseando-se na Equação 4.19¹³⁵:

$$k_{app} = \frac{RT}{F^2 R_{CT} C^*} \quad (4.19)$$

onde C^* (em mol cm^{-3}) é a concentração do par redox em solução, considerando que a concentração das espécies que sofrerá oxidação ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) e redução ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) são iguais e estão em equilíbrio. Os valores de R_{CT} , θ e k_{app} em relação aos tempos de imersão estão apresentados na Tabela 4.4.

Como pode ser visto na Tabela 4.5, os valores de k_{app} apresentados decrescem com o aumento do tempo de imersão do eletrodo de ouro na solução modificadora. A redução da velocidade dos processos de transferência de carga das espécies eletroativas ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) sobre a superfície modificada está associada à diminuição dos sítios ativos em consequência do efeito de bloqueio causado pela adsorção da espécie modificadora. As monocamadas de TNA e iTNA apresentam maior redução de R_{TC} e maior taxa de recobrimento superficial após 24 h. Este resultado indica que essas monocamadas apresentam maior grau de organização em relação às espécies Hpyt, pyS e 1,4-dt. Os resultados indicam que, em todos os casos estudados, a cobertura total não é alcançada. Dessa forma, as monocamadas apresentam uma densidade de defeitos através dos quais os íons de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ acessam a superfície do eletrodo e experimentam a reação de TE. Além disso, o contorno de grão pode permitir o acesso à superfície.

Tabela 4.5 – Correlação dos valores de resistência a transferência de carga (R_{TC}), taxa de recobrimento (θ) e constante de velocidade de transferência de carga (k_{app}) do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em função do tempo de imersão do eletrodo de ouro nas soluções modificadoras de Hpyt, iTNA, TNA, pyS¹³³ e 1,4-dt¹³⁴.

Adsorbato	Tempo de imersão (min)	* R_{TC} ($\Omega \text{ cm}^{-2}$)	θ	$k_{app} \times 10^5$ (cm s^{-1})
Hpyt	0	9,2	-	359,9
	5	37,1	0,75	89,6
	30	39,2	0,77	84,9
	1440	71,7	0,88	46,4
iTNA	0	8,2	-	404,1
	5	40,9	0,79	81,3
	30	73,5	0,88	45,2
	1440	136,4	0,94	24,4
TNA	0	15,4	-	218,0
	5	38,2	0,60	87,9
	30	80,9	0,81	41,4
	1440	217,9	0,93	15,4
pyS ¹³³	0	4,6	-	742
	1	11,5	0,60	301
	5	8,7	0,48	393
	10	5,5	0,16	635
1,4-dt ¹³⁴	0	23,8	-	145,0
	1	55,0	0,58	55,9
	30	75,0	0,68	44,4
	1440	180,0	0,87	18,5

*Os Valores de R_{CT} foram divididos pela área ativa do eletrodo de ouro. $T = 25^\circ\text{C}$.

Para a monocamada de pyS, todavia, este comportamento não é observado. Esta técnica, entretanto, permite a aquisição, apenas, de uma interpretação macroscópica não possibilitando, ainda, o entendimento do processo de formação e/ou decomposição da monocamada de pyS^{80,113}, conforme discussão anterior (pag. 37).

4.1.5 pKa de Superfície Modificada

O pKa de um ácido adsorvido sobre uma superfície pode ser diferente do pKa em solução podendo resultar em significativas alterações na sensibilidade e seletividade da superfície em diferentes soluções. Poucos métodos foram propostos para a determinação do pKa de uma espécie adsorvida, podendo-se citar: a titulação de ângulo de contato^{136,137}, titulação de força química utilizando microscopia de força atômica (AFM)^{138,139}, QCM¹⁴⁰, métodos espectroscópicos¹⁴¹ e eletroquímicos¹⁴². Dentre estes, os métodos eletroquímicos fornece uma abordagem mais simples e conveniente. No trabalho de Brajter-Toth¹⁴², a resposta de corrente para eletrodos modificados em função dos valores pH da solução foi tomada como indicador para determinar o ponto final da titulação em uma titulação ácido-base forte. O valor de pH da solução, porém, é muito difícil de ser controlado com precisão na região de transição não sendo adequado, portanto, para determinar o valor de pKa de superfície com precisão. Outro método eletroquímico utilizado para determinar o pKa de uma superfície modificada foi proposto por Zhao e colaboradores¹⁴³. Este método envolve a realização de uma série de voltamogramas cíclicos para um eletrodo modificado na presença do íon $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em diferentes valores de pH (Figura 4.11).

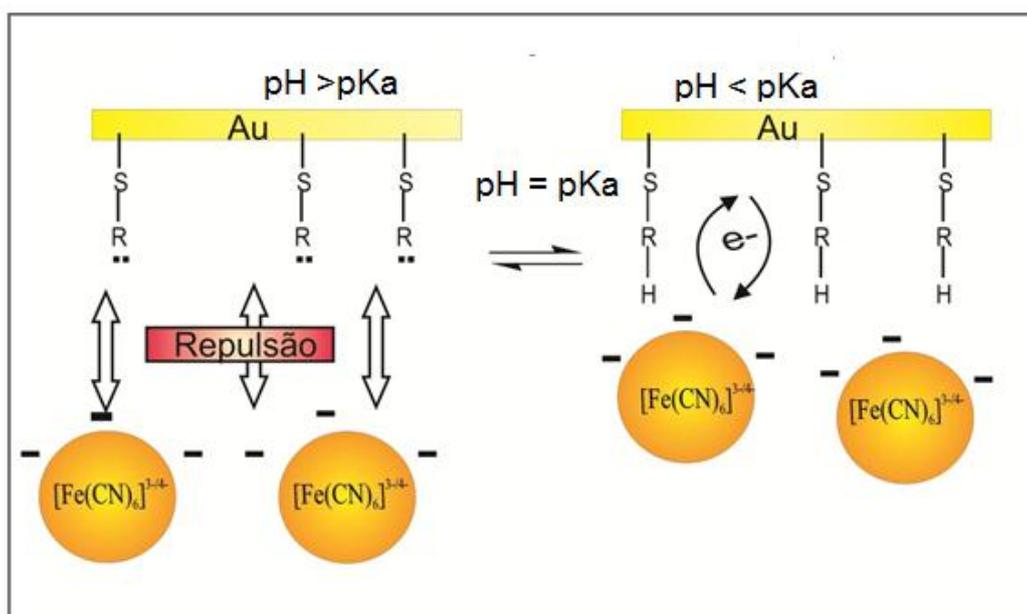


Figura 4.11 – Representação esquemática da interação da monocamada com o íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em função do pH da solução eletrolítica.

O pKa de superfície de uma monocamada pode ser definido como o equilíbrio de ionização do grupo terminal da monocamada, de acordo com a Equação Henderson-Hasselbach:

$$pKa = pH + \log\left(\frac{[AH]}{[A^-]}\right) \quad (4.20)$$

onde $[A^-]$ e $[AH]$ são as concentrações, respectivamente, das espécies desprotonada e protonada.

Assumindo que a corrente total aparente (i) do íon $[Fe(CN)_6]^{3-}$ é constituída do somatório das respostas atribuídas à monocamada dissociada $[A^-]$ e não dissociada $[AH]$, então a expressão de i pode ser descrita¹⁴⁴ como:

$$i = i_{A^-}[A^-] + i_{AH}[AH] \quad (4.21)$$

onde i_{A^-} e i_{AH} correspondem às correntes de pico da espécie de prova para a superfície desprotonada $[A^-]$ e protonada $[AH]$, respectivamente. Neste caso, $[AH]$ representa a concentração de moléculas adsorvidas ou recobrimento superficial. Admitindo-se que o recobrimento superficial é igual a 1, tem-se que $[A^-] + [AH] = 1$. Usando essa expressão e as equações 4.20 e 4.21, a seguinte equação¹⁴⁴ é obtida[†]:

$$pKa = pH - \log\left[\left(\frac{i_{AH} - i_{A^-}}{i - i_{A^-}}\right) - 1\right] \quad (4.22)$$

onde i_{A^-} e i_{AH} podem ser determinadas pelos valores médios obtidos nos diferentes patamares da curva i vs. pH, tal como ilustrado esquemático na Figura 4.12.

†

$$\begin{aligned} \Rightarrow i &= i_{A^-}[A^-] + i_{AH}[AH] \quad \therefore [A^-] + [AH] = 1 \\ \Rightarrow i([A^-] + [AH]) &= i_{A^-}[A^-] + i_{AH}[AH] \quad \Rightarrow i[A^-] + i[AH] = i_{A^-}[A^-] + i_{AH}[AH] \\ \Rightarrow i[A^-] - i_{A^-}[A^-] &= i_{AH}[AH] - i[AH] \quad \Rightarrow [A^-](i - i_{A^-}) = [AH](i_{AH} - i) \\ \Rightarrow \frac{[A^-]}{[AH]} &= \frac{i_{AH} - i}{i - i_{A^-}} = \frac{(-i_{A^-} + i_{A^-}) + i_{AH} - i}{i - i_{A^-}} = \frac{i_{AH} - i_{A^-} - (i - i_{A^-})}{i - i_{A^-}} = \frac{i_{AH} - i_{A^-}}{i - i_{A^-}} - \frac{i - i_{A^-}}{i - i_{A^-}} \\ \Rightarrow \frac{[A^-]}{[AH]} &= \frac{i_{AH} - i_{A^-}}{i - i_{A^-}} - 1 \end{aligned}$$

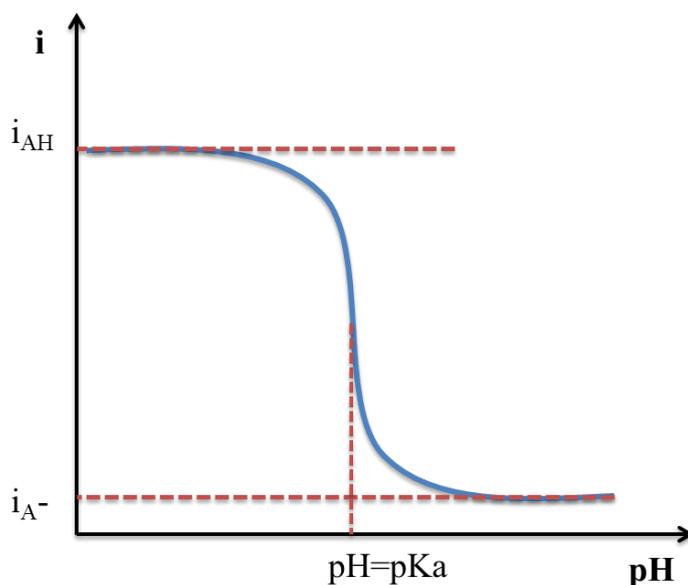


Figura 4.12 – Representação esquemática da curva i vs. pH .

De acordo com o modelo proposto por Zhao¹⁴³, o valor do pK_a da monocamada automontada pode ser estimado^{143,144} a partir dos valores da corrente de pico obtidos por voltametria cíclica na presença de $[Fe(CN)_6]^{3-}$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em vários valores de pH . A determinação precisa da linha de base e do máximo de corrente é dificultada em alguns voltamogramas, principalmente quando a monocamada apresenta um efeito de bloqueio à reação de TE. Porém, para uma melhor análise dos resultados, a carga (Q) foi o parâmetro utilizado considerando que tanto a carga como a corrente do processo é proporcional à concentração da espécie eletroativa em solução. Então, a Equação 4.22, pode ser reescrita como:

$$pKa = pH - \log \left[\left(\frac{Q_{AH} - Q_{A^-}}{Q - Q_{A^-}} \right) - 1 \right] \quad (4.23)$$

onde Q_{A^-} e Q_{AH} correspondem à carga do processo redox da espécie de prova para a superfície desprotonada $[A^-]$ e protonada $[AH]$, respectivamente. Reorganizando-se, tem-se uma equação que representa o comportamento de Q em função do pH :

$$Q = \left[\left(\frac{Q_{AH} - Q_{A^-}}{10^{pKa - pH} + 1} \right) + Q_{A^-} \right] \quad (4.24)$$

Para algumas monocamadas estudadas, existe a possibilidade de protonação em dois grupos diferentes. Não há na literatura, todavia, a proposição de uma expressão que represente o equilíbrio de protonação de superfícies que contêm monocamadas compostas por esse tipo de moléculas. Para monocamadas com dois valores de pKa, o valor de Q em função do pH foi determinado como segue[‡]:

$$Q = \left[\left(\frac{Q_{AH_2} - Q_{AH^-}}{10^{pKa1 - pH} + 1} \right) + \left(\frac{Q_{AH^-} - Q_{A^{2-}}}{10^{pKa2 - pH} + 1} \right) + Q_{A^{2-}} \right] \quad (4.25)$$

onde $Q_{A^{2-}}$ e Q_{AH_2} correspondem à carga do processo redox da espécie de prova para a superfície completamente desprotonada $[A^{2-}]$ e parcialmente protonada $[AH^-]$, respectivamente (Figura 4.13).

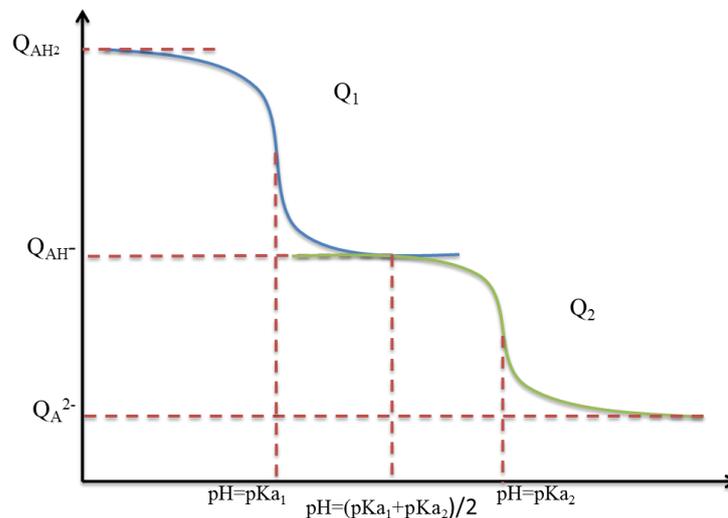


Figura 4.13 – Representação esquemática da curva Q vs. pH para espécies com dois valores de pKa .

‡

$$\Rightarrow Q_1 = \left(\frac{Q_{AH_2} - Q_{AH^-}}{10^{pKa1 - pH} + 1} \right) + Q_{AH^-} \quad \therefore \quad Q_2 = \left(\frac{Q_{AH^-} - Q_{A^{2-}}}{10^{pKa2 - pH} + 1} \right) + Q_{A^{2-}}$$

$$\Rightarrow Q = Q_1 + Q_2 - Q_{AH^-}$$

$$\Rightarrow Q = \left[\left(\frac{Q_{AH_2} - Q_{AH^-}}{10^{pKa1 - pH} + 1} \right) + Q_{AH^-} + \left(\frac{Q_{AH^-} - Q_{A^{2-}}}{10^{pKa2 - pH} + 1} \right) + Q_{A^{2-}} - Q_{AH^-} \right]$$

$$\Rightarrow Q = \left[\left(\frac{Q_{AH_2} - Q_{AH^-}}{10^{pKa1 - pH} + 1} \right) + \left(\frac{Q_{AH^-} - Q_{A^{2-}}}{10^{pKa2 - pH} + 1} \right) + Q_{A^{2-}} \right]$$

Os experimentos realizados nas condições descritas na literatura¹⁴³, não foram aplicados para as monocamadas com mais de um pKa (TNA e iTNA). A monocamada de TNA, por exemplo, a determinação dos valores de pKa torna-se impreciso seguindo o modelo de Zhao, conforme ilustrado na Figura 4.14.

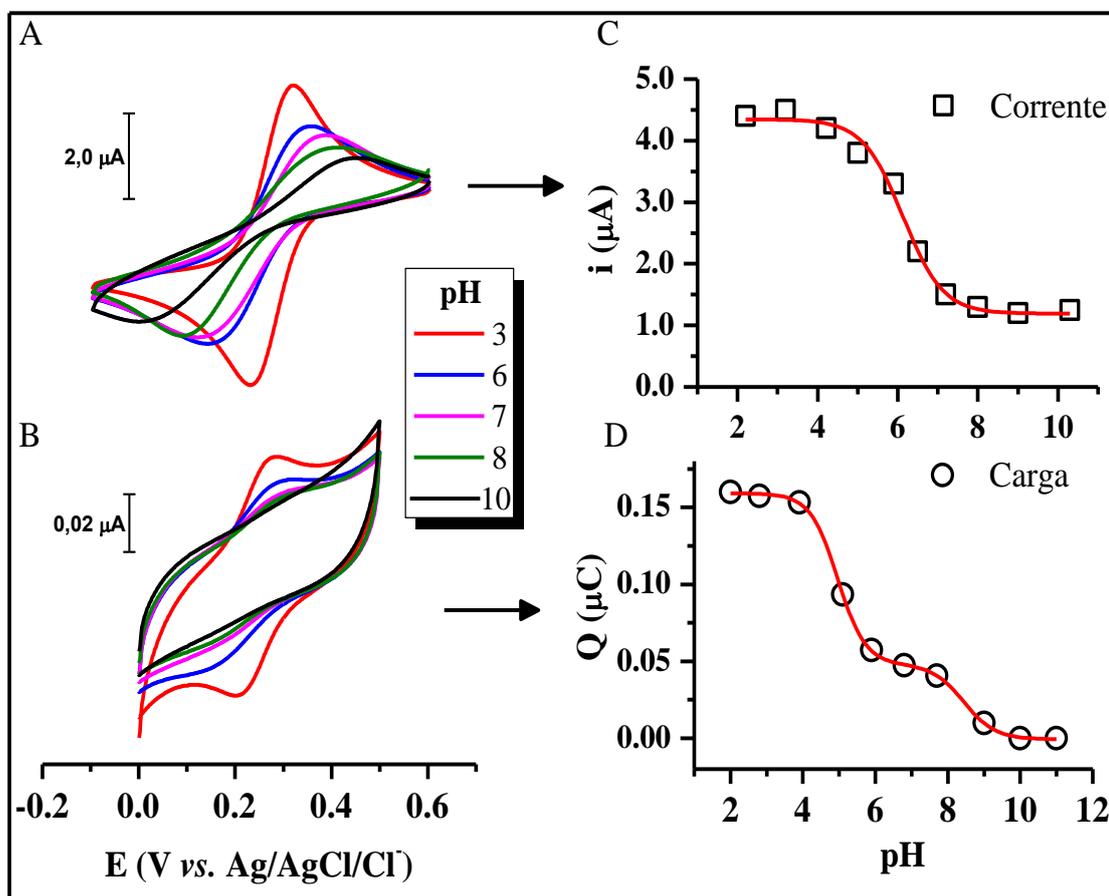


Figura 4.14 – Voltamogramas cíclicos para o eletrodo Au/TNA na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em (A) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e KCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ a 100 mV s^{-1} (método de Zhao) e (B) $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e KCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ a 15 mV s^{-1} . Comportamento em função do pH da solução eletrolítica para corrente de pico anódica (C) dos voltamogramas em A e da carga anódica (D) nos voltamogramas em B.

O gráfico para a determinação de pKa (i vs. ou Q vs. pH) apresenta apenas um valor quando o método de Zhao é utilizado (gráfico C). O método proposto neste trabalho, por outro lado, apresenta dois pontos de inflexão (gráfico D) indicando dois valores distintos de pKa sendo consistente com a existência de dois grupos terminais protonáveis (R-NH_2 e

piridínico). O resultado apresentado ilustra o ganho de sensibilidade do método proposto neste trabalho comparativamente ao método da literatura. Comparativamente ao método de Zhao, foram reduzidas a concentração da espécie redox ativa em solução (de 1,0 mmol L⁻¹ para 10 μmol L⁻¹) e a velocidade de varredura (de 100 mV s⁻¹ para 15 mV s⁻¹). Embora aumentando o comprimento de Debye, a diminuição da concentração das espécies redox ativa e da força iônica da solução eletrolítica teve como objetivo diminuir a interferência da repulsão entre os íons em solução favorecendo, assim, a interação efetiva entre a monocamada e as espécies redox ativa em solução. Dado o grau de diluição imposto ao sistema, a diminuição da velocidade de varredura tornou-se necessária a fim de acessar a reação de eletrodo respeitando-se os limites difusionais.

A protonação de grupos presentes na monocamada acarreta na redução da densidade de carga negativa na superfície. Essa condição facilita a aproximação de espécies de prova aniônicas, tal como [Fe(CN)₆]³⁻. Esse processo é evidenciado por meio do aumento da corrente de pico ou da carga em função da variação do valor de pH. Espera-se que o complexo [Fe(CN)₆]³⁻, por ser uma espécie aniônica, experimente repulsão quando a monocamada apresentar densidade de carga negativa no grupo terminal, o que afetará o processo heterogêneo de TE.

O comportamento da carga do processo do [Fe(CN)₆]³⁻ em função do pH para o eletrodo modificado com iTNA, TNA, Hpyt, pyS e 1,4-dt estão ilustrados na Figura 4.15.

De fato, como ilustrado na Figura 4.15 os valores de carga apresentam uma forte diminuição com aumento do valor do pH. A espécie 1,4-dt, entretanto, não apresenta variação significativa da carga em função do pH. Este comportamento pode ser atribuído à inexistência de equilíbrio de protonação para esta molécula na faixa de pH estudado. Dessa forma, pode-se concluir que a difusão das moléculas de [Fe(CN)₆]³⁻ através dos defeitos da monocamada de 1,4-dt não é significativamente afetada pela repulsão imposta pela densidade de carga negativa na interface. Por outro lado, as monocamadas formadas por TNA, iTNA, Hpyt e pyS apresentaram uma dependência da carga do processo em função do pH da solução eletrolítica. Os dados experimentais obtidos para as monocamadas de Hpyt e pyS apresentaram uma grande concordância com a curva simulada (linha tracejada) a partir da Equação 4.24 com pKa como parâmetro variável. Conforme discutido as monocamadas formadas pelas espécies TNA e iTNA apresentam dois valores de pKa. Neste caso, dados experimentais apresentaram grande concordância

com a curva simulada (linha pontilhada) a partir da Equação 4.25 com pK_{a1} e pK_{a2} como parâmetros variáveis. Os valores de pK_a calculados estão comparados com os valores determinados¹⁴⁵⁻¹⁴⁸ para as espécies em solução, conforme apresentado na Tabela 4.6.

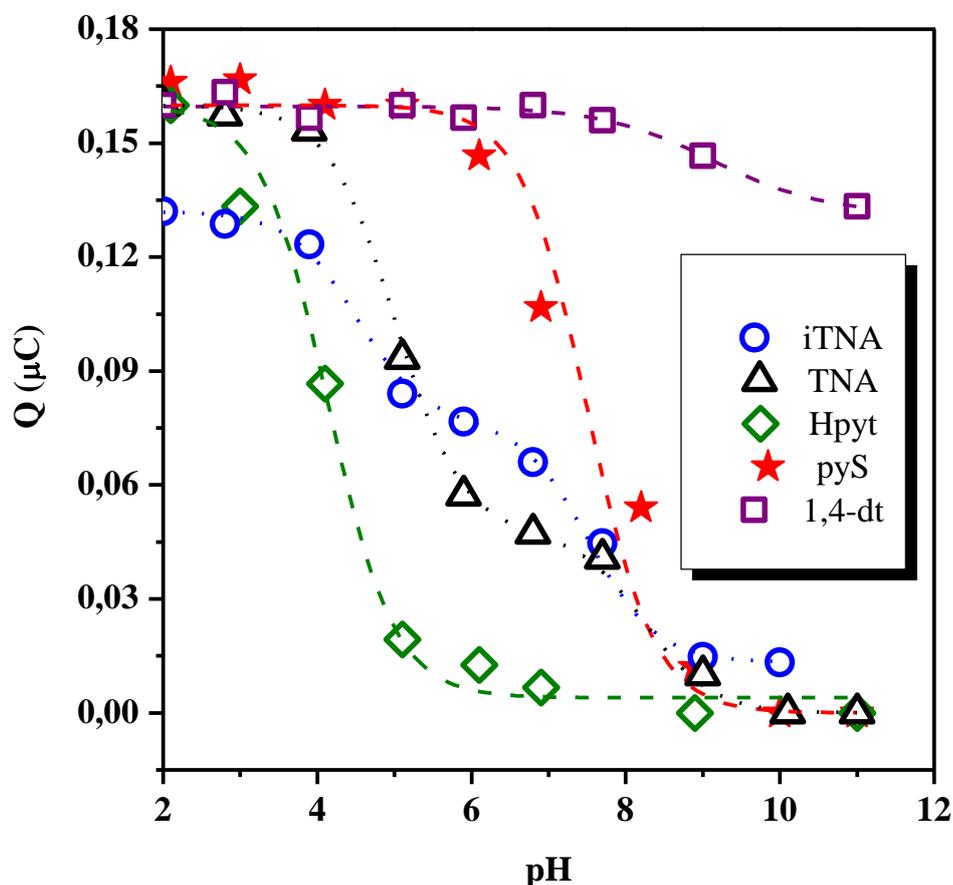


Figura 4.15 – Relação entre a carga e o valor do pH da solução eletrolítica. Dados experimentais para as monocamadas formadas por: (Δ) iTNA, (\circ) TNA, (\diamond) Hpyt, (\square) 1,4-dt e (\star) pyS e Curvas simuladas a partir das Equações 4.24 para Hpyt e pyS (linhas tracejadas) e 4.25 para TNA e iTNA (linhas pontilhada). Tempo de imersão de 1h.

Os valores de pK_a calculados para o átomo de N piridínico das moléculas que encontram-se próximos ao valor reportado para a piridina ($pK_a = 5,2$) em solução¹⁴⁸, conforme discriminado na Tabela 4.7. Derivados piridínicos, entretanto, podem apresentar valores de pK_a diferentes dependendo da presença de grupos ligados ao anel piridínico, como pode ser observado na Tabela 4.7, grupos retiradores de elétrons reduzem o pK_a ao passo que grupos doadores de densidade eletrônica elevam o valor.

Tabela 4.6 – Valores de pKa em solução e de superfície para as monocamadas automontadas formadas por: iTNA, TNA, Hpyt, pyS e 1,4-dt.

Adsorbato	pKa de superfície		pKa em Solução ¹⁴⁵⁻¹⁴⁸	
	-N _{py}	-NH ₂	-py	-NH ₂
1,4-dt	x	x	x	x
Hpyt	4,2	x	-	x
pyS	7,5	x	1,4	x
TNA	5,0	8,5	3,2	-
iTNA	4,5	7,9	3,7	10,6

(N_{py}) Nitrogênio piridínico, (x) valores inexistentes e (-) valores não determinados

Tabela 4.7 – Valores de pKa em solução para alguns derivados piridínicos^{145,146,148}.

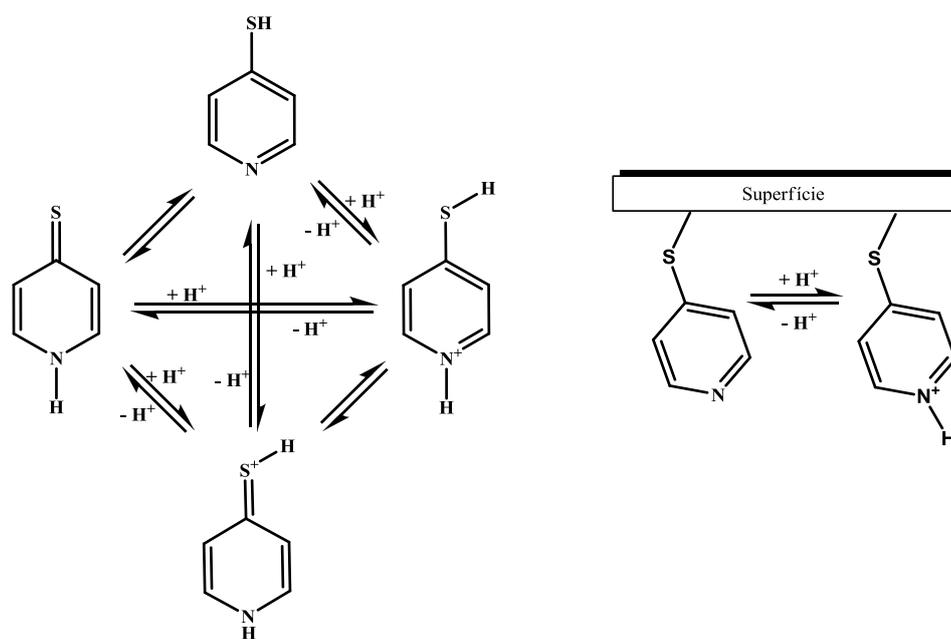
Espécie	pKa do N piridínico	pKa2
Piridina	5,23	-
2-metilpiridina	5,97	-
3-metilpiridina	5,68	-
4-metilpiridina	6,08	-
2,3-dimetilpiridina	6,57	-
2,4-dimetilpiridina	6,99	-
3-cianopiridina	1,45	-
3-fluoropiridina	2,97	-
3-cloropiridina	2,84	-
3-bromopiridina	2,84	-
2-hidroxipiridina	0,75	11,65
3-hidroxipiridina	4,79	8,75
4-hidroxipiridina	3,20	11,12
ácido 2-piridinocarboxílico	0,99	5,40
ácido 3-piridinocarboxílico	2,00	4,80
ácido 4-piridinocarboxílico	1,77	4,84
4-mercaptopiridina (pyS)	1,40	-
2-mercaptopiridina	1,07	-
Tionicotinamida (TNA)	3,23	-
Isonicotinamida (iTNA)	3,67	10,61*
Nicotinamida	3,54	-

(-) valores inexistentes ou indeterminados

* referente ao grupo NH₂

Comparando-se os valores reportados em solução (Tabela 4.7) para as moléculas de pyS, TNA e iTNA com aqueles determinados após a adsorção (Tabela 4.6), observou-se um aumento no valor do pKa atribuído ao N piridínico. De forma contrária, o segundo pKa observado para as moléculas TNA e iTNA após adsorção diminuiu em relação à espécie TNA em solução. Ressalta-se, neste caso, que o segundo valor de pKa é atribuído ao grupo NH₂, de acordo com a literatura¹⁸. Para a molécula Hpyt, o valor de pKa observado é atribuído ao átomo de N piridínico baseando-se em resultados obtidos para moléculas similares.

A análise dos resultados obtidos para as moléculas que apresentam equilíbrio tautomérico, todavia, envolve um maior grau de complexidade. O pKa calculado teoricamente para a molécula pyS^{145,149}, por exemplo, é de 6,0, ao passo que o determinado experimentalmente¹⁵⁰ é de 1,4 em solução. Essa discrepância é atribuída às diferentes contribuições do equilíbrio conforme ilustrado no esquema 4.1 tendo em vista que o valor calculado não considerou o equilíbrio tautomérico.



Esquema 4.1 – Diferentes equilíbrios sugeridos para a molécula pyS.

Após a adsorção, o equilíbrio tautomérico é desfavorecido implicando, portanto, em maiores valores de pKa. O valor de pKa da monocamada de pyS sobre ouro foi determinado^{151,152} como 5,3 e 4,6 a partir de experimentos de SERS e medidas de

capacitância, respectivamente. Estes valores, embora menores, encontram-se próximo ao valor calculado teoricamente (6,0), uma vez que o equilíbrio tautomérico, conforme já discutido, é desfavorecido em superfície o que reduz a margem de erro do cálculo. Este é, de fato, o comportamento observado para as moléculas de pyS, TNA e iTNA, após a adsorção. Para a monocamada de pyS foi observado um valor de pKa 7,5 que é superior ao esperado. Após as medidas de pKa, foi realizada a desorção reductiva da monocamada e o E_{dr} foi observado em -850 mV. Sendo diferente daquele observado para a monocamada de pyS recém preparada ($E_{dr} = -0,55V$, Tabela 4.1). Este resultado indica um interação mais intensa podendo ser resultante da presença de átomos de S atômicos e/ou oligoméricos na superfície em consequência da decomposição da monocamada de pyS. A fim de se verificar esta hipótese, o eletrodo de ouro foi imerso em solução aquosa saturada de Na_2S por 1h. O eletrodo assim modificado foi colocado em uma célula eletroquímica contendo $[Fe(CN)_6]^{3-}$ a fim de mimetizar as condições experimentais anteriores. O valor de pKa calculado para esta monocamada foi de 6,8 estando, portanto, consideravelmente próximo ao valor calculado para a monocamada de pyS (7,5). Adicionalmente, após este procedimento, realizou-se a desorção reductiva (de 0 a -1,2 V) em KOH 0,5 mol L⁻¹ e o valor de E_{dr} foi de aproximadamente -900 mV (Figura 4.16). Este resultado sugere que a monocamada de pyS experimental, efetivamente, uma clivagem oxidativa da ligação Au-S resultando na decomposição da monocamada.

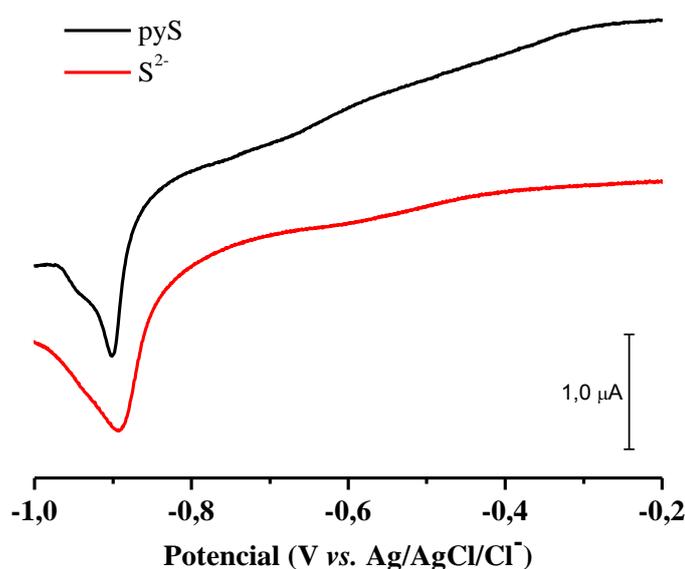


Figura 4.16 – Voltamogramas de varredura linear (LSV) a 50 mV s^{-1} para o eletrodo de ouro modificado com as espécies pyS (após as medidas para determinação do pKa) e S^{2-} obtidos em KOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

4.1.6 Microscopia de Varredura por Tunelamento (STM)

O STM foi desenvolvido por Gerd Binnig e Heinrich Rohrer, da IBM de Zurich, em 1981 e foi o primeiro instrumento capaz de gerar imagens de superfícies com resolução atômica baseado no tunelamento de elétrons que é um dos fenômenos quânticos que não se enquadram nos formalismos clássicos. A mecânica quântica prevê que uma partícula como um elétron, pode ser descrito por uma função de onda. Assim sendo, tem uma probabilidade finita de entrar em uma região classicamente proibida e, por conseguinte, essa partícula pode tunelar através de uma barreira de potencial que separa duas regiões classicamente permitidas. A probabilidade de tunelamento é exponencialmente dependente da largura da barreira de potencial de modo que a observação experimental dos eventos de tunelamento só é mensurável para barreiras bastante finas, já para a mecânica clássica, por outro lado, uma barreira apresenta dimensões macroscópicas tais que uma partícula só será capaz de ultrapassá-la caso possua cinética suficiente.

A dependência exponencial da corrente de tunelamento I com a distância d é dada pela a seguinte equação¹⁵³:

$$I = Ve^{(A\phi^{1/2}d)} \quad (4.26)$$

onde $A \cong 1,025 \text{ (eV)}^{-1/2} \text{ \AA}^{-1}$, no caso do vácuo, ϕ é a altura da barreira de potencial (função dos materiais constituintes da sonda e da amostra) que representa a diferença entre o nível de energia de tunelamento e o nível de energia máximo do sistema sonda/amostra, d é a distância de separação entre a amostra e a sonda, V é o potencial de polarização e I é a corrente total de tunelamento entre a amostra e a ponta.

No STM, o sensor de tunelamento mede a corrente I que passa entre a amostra e a sonda metálica, posicionada suficiente próxima da superfície da amostra (que deve ser condutora). Quando a distância sonda/amostra é aproximadamente de 10\AA , os elétrons da amostra começam a tunelar na direção da sonda ou vice-versa, dependendo da polaridade da voltagem aplicada entre a sonda e a amostra. A corrente varia com a distância entre elas sendo diretamente proporcional à voltagem V aplicada e exponencialmente proporcional à distância d , ou seja, a resolução do STM reduz com o aumento de d . Um aspecto fundamental para a operação do STM é a extrema sensibilidade da corrente de

tunelamento à separação entre os eletrodos. Uma sonda muito fina e muito próxima da amostra varre a superfície transferindo elétrons e levantando assim a topografia dos átomos na superfície da amostra, ou seja, registrando o relevo¹⁵⁴.

O desenvolvimento do STM possibilitou não só obter imagens em nível atômico, mas medir e manipular átomos ou moléculas. A compreensão da estrutura básica que é composta a matéria tem se apresentado ao longo do tempo como um desafio aos pesquisadores. Este microscópio é uma das ferramentas mais importantes para a física e química superficial devido à capacidade de mostrar a estrutura da camada mais externa de átomos ou moléculas de uma superfície. Essa ferramenta²⁸ tem sido utilizada para estudar filmes sobre superfícies condutoras ou semicondutoras a partir do efeito de tunelamento entre uma sonda e a superfície. Imagens em resolução nanométrica permite a avaliação em nível atômico. Desta forma, é possível observar a organização molecular e revelar a presença de defeitos em monocamadas.

Imagens para a superfície modificada com as espécies pyS foram previamente publicadas^{155,156}. As imagens obtidas sugerem uma estrutura ordenada com distâncias intermoleculares de 1,42 e 0,49 nm consistente com uma unidade de célula retangular $p(5 \times \sqrt{3}R-30^\circ)$ para o Au(111)/pyS. Desta forma, o empacotamento é menor que o observado para alcanotióis²⁸ com unidade de célula hexagonal $(\sqrt{3} \times \sqrt{3}R-30^\circ)$ com distâncias intermoleculares de 0,5 nm.

A Figura 4.17 ilustra a imagem em baixa resolução obtida para Au(111) após imersão em solução de Hpyt. Para a monocamada de Hpyt as imagens de STM em baixa resolução apresentaram uma superfície que apresenta algumas ilhas espalhadas aleatoriamente. A formação de ilhas em ouro após a adsorção é frequentemente observado para outros tióis aromáticos¹⁵⁷. Na imagem em baixa resolução permite definir a organização das moléculas do adsorbato como pode ser observado na Figura 4.17.

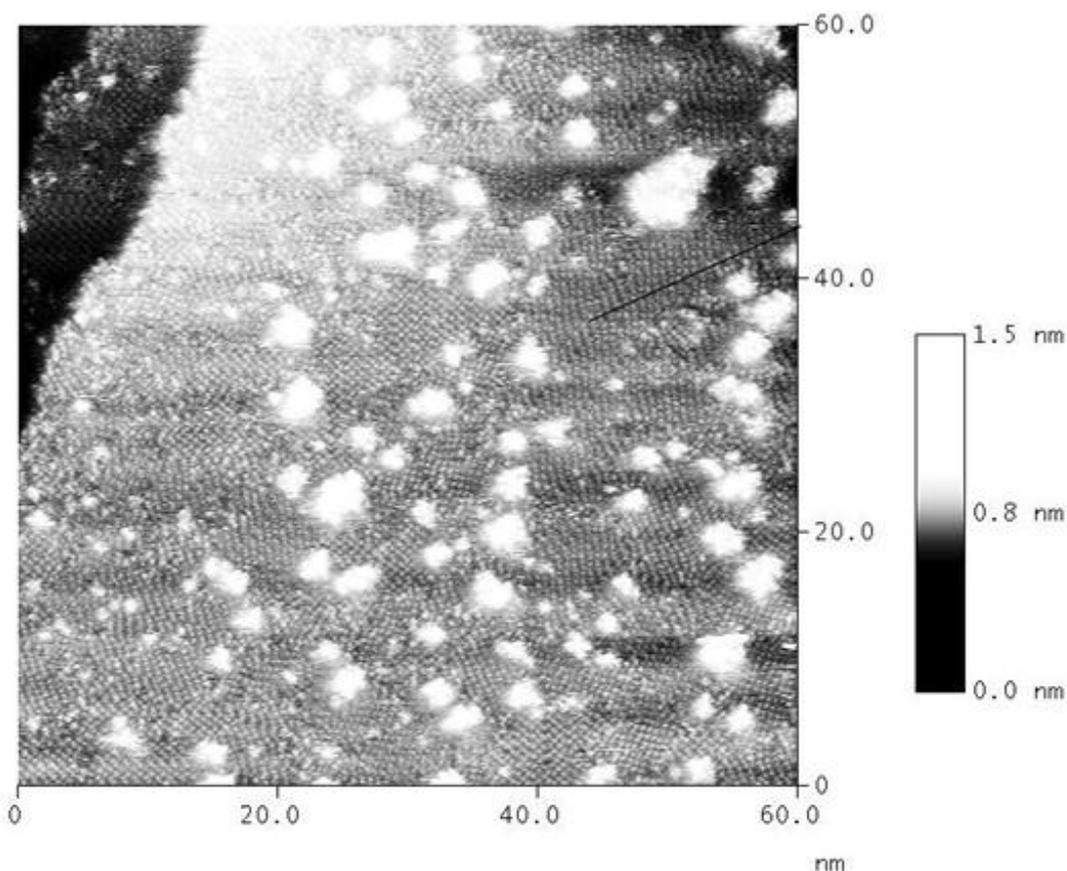


Figura 4.17 – Imagem de STM em baixa resolução para Hpyt sobre Au(111). Tempo de imersão de 24h em solução de Hpyt 2,0 mmol L⁻¹.

A imagem em alta resolução de STM obtida para a monocamada de Hpyt apresenta uma organização molecular hexagonal quase regular, conforme ilustrado na Figura 4.18 (a). Esta organização é semelhante àquela observada para a superfície do Au(111) sem modificador (Figura 4.18 (b)). A periodicidade média dos átomos, todavia, de ouro é de aproximadamente 0,29 nm para a superfície limpa, enquanto a distância entre os átomos de enxofre na monocamada de Hpyt é de $5,5 \pm 0,4 \text{ \AA}$, o que corresponde a uma área ocupacional média de $19,6 \text{ \AA}^2$ por molécula. A organização molecular da monocamada de Hpyt não apresentou dependência com o tempo de imersão. As imagens foram similares para 5 min e 24h de imersão.

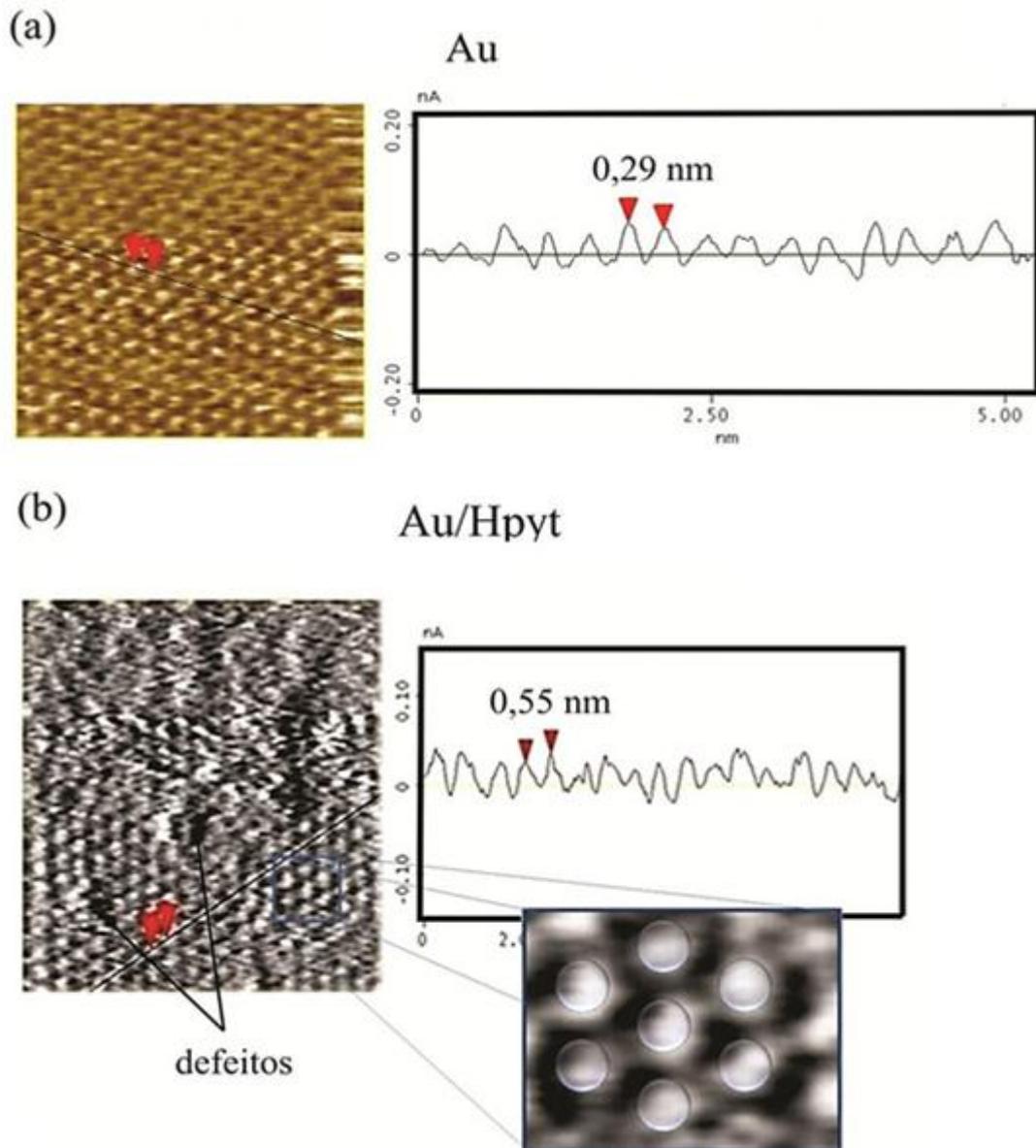


Figura 4.18 – Imagens de STM em alta resolução para amostra de Au(111) limpa (a) e modificada com Hpyt (b) após 30 min de imersão em solução de Hpyt $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Para a monocamada de TNA as imagens de STM em baixa resolução (Figura 4.19) obtidas após 24h de imersão, também apresentaram uma superfície que apresenta algumas *ilhas* espalhadas aleatoriamente com altura variando entre $2,0$ e $2,5 \text{ \AA}$.

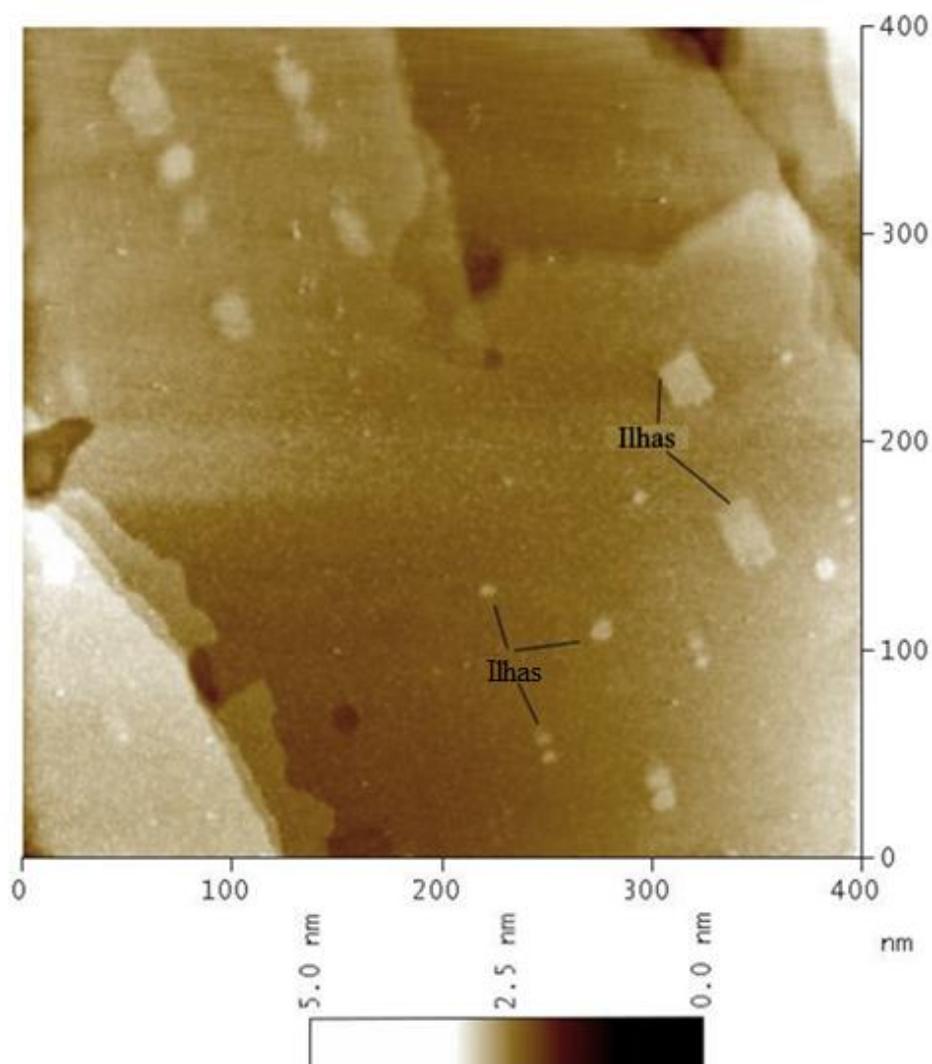


Figure 4.19 – Imagem de STM em baixa resolução para TNA sobre Au(111). Tempo de imersão de 24h em solução de TNA 2,0 mmol L⁻¹.

Para o eletrodo modificado com TNA, as imagens são consistentes com a adsorção de compostos aromáticos sulfurados conforme previsto na literatura¹⁵⁷.

A imagem obtida em alta resolução (Figura 4.20) apresenta um padrão que se assemelha a listras paralelas com periodicidade de 5,5 –8,5Å.

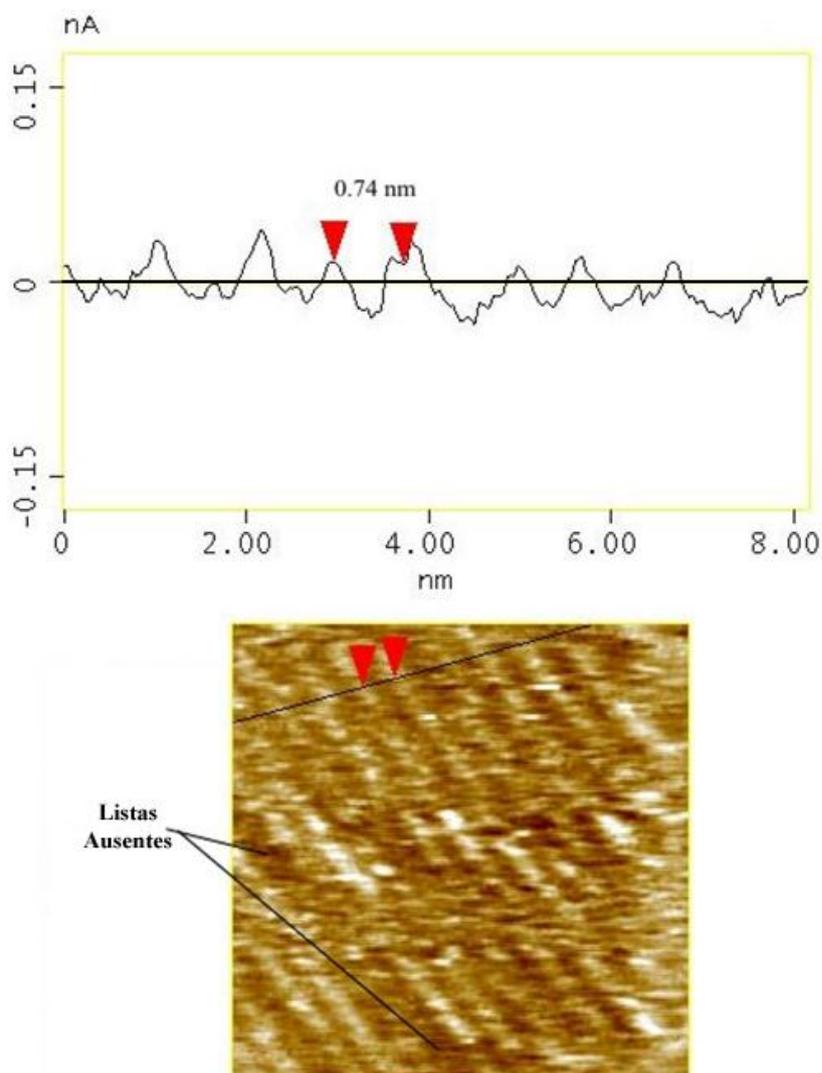


Figura 4.20– Imagem de STM em alta resolução para TNA sobre Au(111). Tempo de imersão de 30 min em solução de TNA 2,0 mmol L⁻¹.

A imagem, ilustrada acima, permite visualizar uma organização molecular com algumas listras distorcidas e descontínuas, onde se sugere a presença de defeitos. A curta periodicidade (5,5 a 6,0 Å) indica que uma camada densa está em processo de formação nesta região de maneira similar a de alcanotióis com uma inclinação normal de 30° em relação à superfície. Periodicidades maiores (7,0 a 8,5 Å) supõem a existência de uma estrutura onde o eixo da molécula tem um menor ângulo em relação à superfície com o plano molecular mais próximo do eletrodo. As moléculas nestas condições (até 30 min) ligam-se a superfície através do átomo de S com uma orientação em relação à superfície do ouro. Esta estrutura, conhecida como estrutura aberta¹⁵⁸, é mais sensível a interações

com a ponta (sonda) sendo destruída durante a varredura, o que resulta em maiores dificuldades para a aquisição de imagens com maior resolução dentro das listras. A faixa de resistência possível para a aquisição das imagens sem destruição da monocamada foi de 0,4 a 5,0 G Ω .

Os processos de adsorção das moléculas de TNA mostraram-se dependentes do tempo de imersão ao contrário da adsorção das moléculas de Hpyt. A imagem em alta resolução ilustrada na Figura 4.21 foi obtida após 24h de imersão.

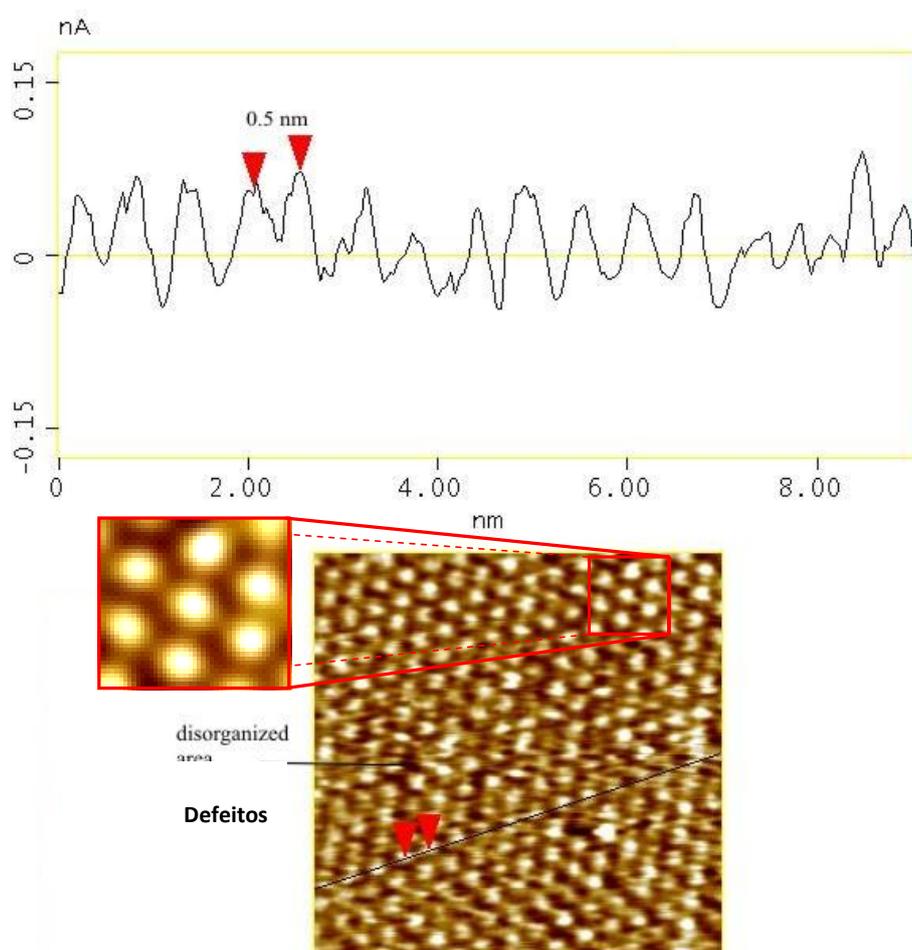


Figura 4.21 – Imagem de STM em alta resolução para TNA sobre Au(111). Tempo de imersão de 24 h em solução de TNA 2,0 mmol L⁻¹.

Após 24h, a organização molecular observada é hexagonal, cada ponto claro é atribuída a uma molécula de TNA. Esta estrutura molecular é consistente com uma organização hexagonal quase perfeita do tipo $\sqrt{3} \times \sqrt{3} R 30^\circ$. Esse mesmo comportamento foi observado para outros tióis aromáticos sobre superfície de ouro (111)^{157,159} e para *n*-

alcanotióis de cadeias longas. A pequena distorção da organização hexagonal observada pode ser designada¹⁵⁷ ao movimento térmico e também a uma desordem na direção da inclinação das moléculas em relação ao átomo de enxofre (sítio de adsorção). A influência do grupo NH₂ na desorganização da forma hexagonal ideal não pode ser rejeitada. Este grupo pode estar mais distante ou próximo à superfície atuando, neste caso, como um segundo sítio de adsorção. Defeitos típicos de estruturas moleculares (áreas mais escuras e desorganizadas) são observados indicando a falta de moléculas em algumas regiões ou em sítios energéticos distintos. O perfil da seção transversal mostra uma periodicidade de $5,4 \pm 0,4$. Para TNA, após 24h de imersão, também foi observada uma distribuição hexagonal quase regular com uma área ocupacional média de $18,9 \text{ \AA}^2$ por molécula.

A Figura 4.22 ilustra a imagem obtida para Au(111) após 24h de imersão em solução de iTNA. A superfície é coberta por cavidades que em sua grande maioria tem a dimensão da altura do degrau do Au(111) que é $2,56 \text{ \AA}$. Foram realizados experimentos em alta resolução afim de melhor visualizar a superfície modificada. As imagens obtidas, entretanto, não permitiram a visualização de nenhuma estrutura molecular sugerindo algum tipo de interação entre as moléculas de iTNA e a sonda. Outro parâmetro experimental alterado foi a resistência de tunelamento. Aumentou-se esta de 133 para 240 GΩ, mas, infelizmente não se obteve melhoria de resolução. As imagens obtidas em baixa resolução apresentaram-se similares para diferentes tempos de imersão (5min a 24h) aumentando apenas a densidade de áreas escuras com o aumento do tempo de imersão. Correlacionando-se com os resultados de impedância e desorção, onde tem-se o aumento de recobrimento com o aumento do tempo de imersão ($\theta = 0,94$ para 24h de imersão, Tabela 4.4) sugere a existência de sítios energéticos distintos sobre a superfície de ouro após a modificação. De fato a literatura sugere que a adsorção de compostos aromáticos sulfurados induz a formação de ilhas de alturas mais elevadas ao passo que alcanotióis resultam em depressões¹⁶⁰. As imagens obtidas para a adsorção das moléculas de iTNA podem sugerir que estas induzem a formação de depressões na superfície mesmo, sendo estas moléculas, espécies aromáticas. No caso das moléculas de iTNA, porém o átomo de enxofre encontra-se fora do anel aproximando-se, portanto da estrutura de alcanotiól.

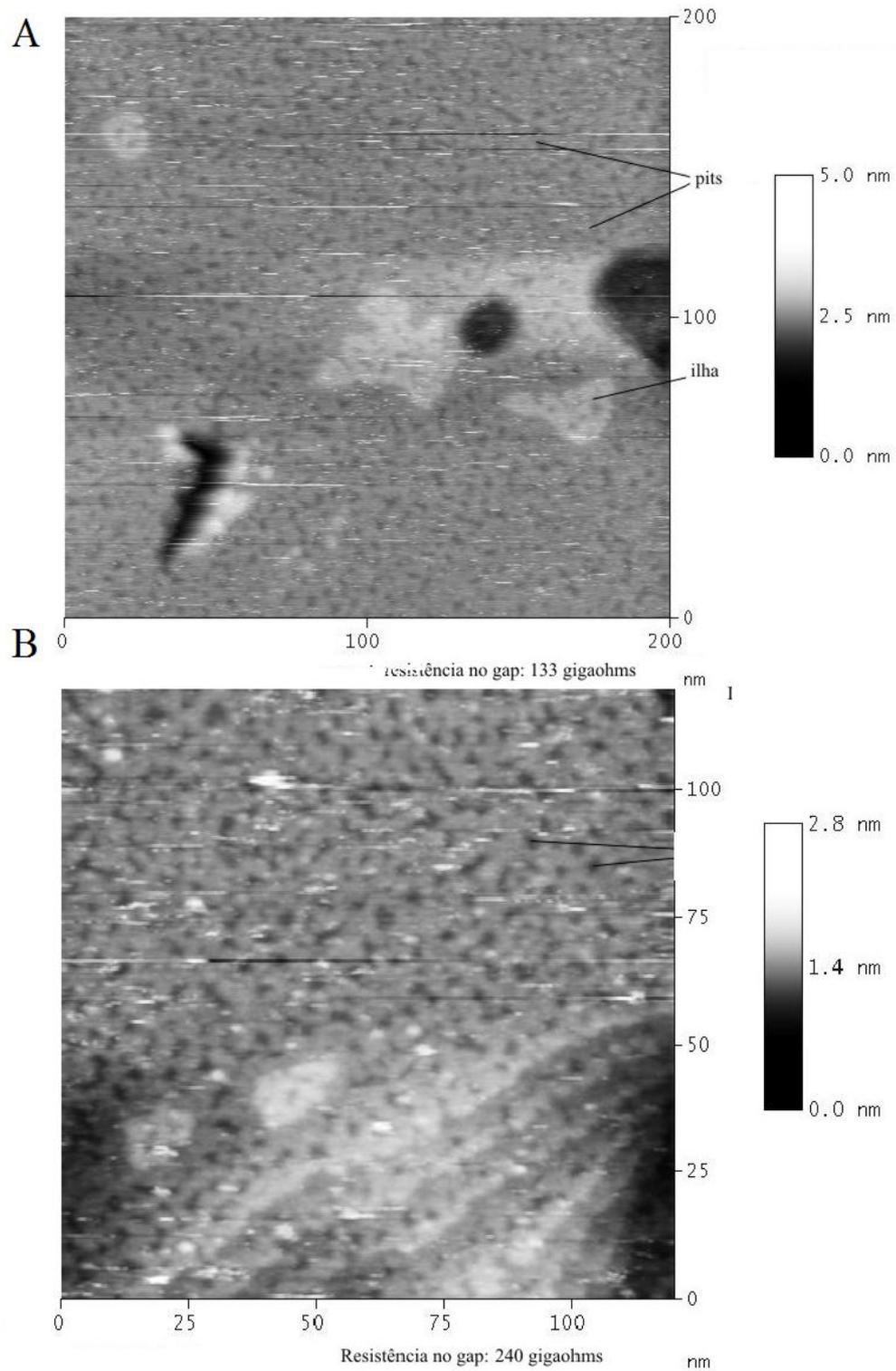


Figura 4.22 – Imagem de STM em baixa resolução para iTNA sobre Au(111). Tempo de imersão de 24h em solução de iTNA 2,0 mmol L⁻¹. Resistência de tunelamento (A)133 e (B) 240 GΩ.

4.2 Aplicação das monocamadas

4.2.1 Estudos da TE do citocromo c (cyt c)

O cyt c é uma proteína extensivamente estudada, principalmente, por apresentar uma estrutura relativamente simples. Diversos tipos de compostos sulfurados adsorvidos sobre ouro foram avaliados como promotor da reação de TE desta proteína. Resultados da literatura indicam que as monocamadas formadas por pyS^{4,79} e 1,4-dt⁸¹, por exemplo, acessam satisfatoriamente a reação de TE do cyt c apresentando valores de $E_{1/2}$ em 0,08 e 0,05 V *vs.* Ag/AgCl/Cl⁻, respectivamente. Estes valores são consistentes com o valor sugerido para a forma nativa da proteína de ~ 0,05V⁴⁶. Além disso, em ambos os casos, os autores sugerem que os processos são controlados pelo transporte de massa.

Neste trabalho, as monocamadas formadas por TNA, iTNA e Hpyt foram avaliadas como promotores para a reação heterogênea de TE do cyt c. Os voltamogramas obtidos para estas monocamadas estão apresentados na Figura 4.23.

A monocamada de Hpyt, em comparação às formadas por TNA e iTNA, apresenta melhor resposta para o acesso a reação heterogênea de TE do par redox Fe^{3+/2+} do cyt c com $E_{1/2}$ em ~ 0,05 V, sendo consistente com a forma nativa⁴⁵. Esta monocamada apresenta, também, melhor relação de corrente, visto que todos os voltamogramas (Figura 4.23) foram obtidos em solução do cyt c com a mesma concentração. Para a monocamada de TNA, o valor de $E_{1/2}$ de ~0,2V do cyt c encontra-se deslocado aproximadamente 200 mV do potencial para a proteína na forma nativa⁴⁵. A espécie TNA apresenta, como grupo terminais, o átomo de N piridínico e o fragmento NH₂ cujos valores de pKa de superfície são, respectivamente 5,0 e 8,5 (Tabela 4,5). Dessa forma, na solução eletrolítica utilizada nos estudos do cyt c (pH 7,0), é possível a protonação do grupo amina de algumas moléculas para a forma NH₃⁺. O aumento da densidade de carga positiva na interface, portanto, justifica o deslocamento positivo do potencial observado para a metaloproteína. Resultado semelhante foi obtido por Yang⁷⁶ para o cyt c imobilizado sobre uma monocamada de cys que, além do grupo COOH, apresenta um grupo NH₂. De acordo com Whitesides⁵⁷, este deslocamento positivo do $E_{1/2}$ é decorrente do efeito repulsivo entre grupos positivos nas estruturas da monocamada e o cyt c.

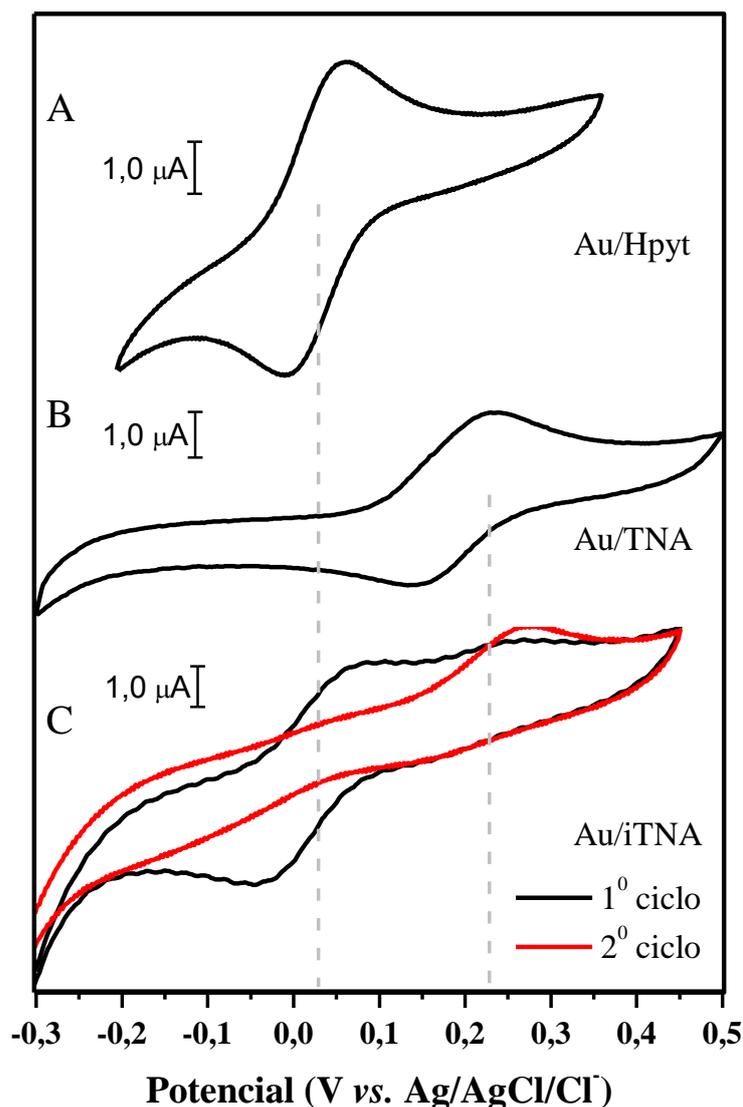


Figura 4.23– Voltamogramas cíclicos a 100 mV s^{-1} em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 7,0, contendo cyt c $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para o eletrodo de ouro policristalino, após a imersão por 60 min em soluções contendo (A) Hpyt, (B) TNA e (C) iTNA (—) 1^o e (—) 2^o ciclo de varredura.

Para a monocamada de iTNA, os voltamogramas obtidos apresentam uma dependência com o número de varreduras de potencial. Na primeira varredura são observados dois processos redox com valores de $E_{1/2}$ centrados em 0,03 e 0,20 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻, respectivamente. O par de ondas centrado em 0,03 é consistente com o estado *in natura* da proteína é observado apenas no primeiro ciclo. Na segunda varredura, apenas o processo irreversível em 0,20 V é observado. Este valor é próximo àquele observado para o eletrodo modificado com TNA, apresentando cinética de TE mais lenta,

entretanto, está muito provavelmente, relacionada à posição do átomo de N piridínico em função do potencial aplicado ao eletrodo. Espectros de SERS publicados para a monocamada de TNA indicam que a distância do grupo NH_3^+ é dependente do potencial aplicado. Para esta monocamada, todavia, a variação do grupo NH_3^+ não afeta a eletroquímica do cyt c, uma vez que, virtualmente a mesma direção do átomo de N piridínico em relação às moléculas de cyt c em solução. Para a molécula de iTNA, por outro lado, a posição do grupo NH_3^+ em relação à superfície afeta fortemente a posição do átomo de N piridínico tornando a interação com as moléculas de cyt c em solução menos efetiva em potenciais positivos conforme representado na Figura 4.24.

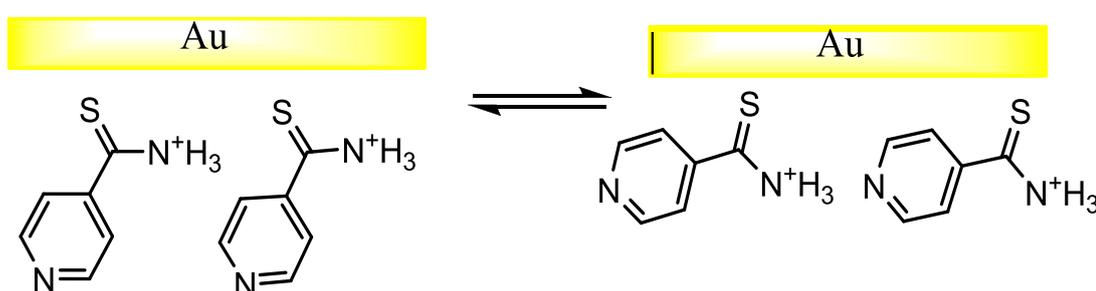


Figura 4.24 – Representação hipotética da orientação da monocamada de iTNA.

Outra possibilidade para a redução da cinética da reação de TE do cyt c seria a desorção da monocamada de iTNA. Esta possibilidade, porém, não deve ser considerada visto que experimento de desorção redutiva realizado após as medidas com cyt c apresentaram os valores de $\sim -0,9$ V e $8,0 \times 10^{-10}$ mol cm^{-2} para E_{dr} e Γ , respectivamente. Estes resultados indicam que a monocamada de iTNA apresenta grande taxa de recobrimento, sendo estável na faixa de potencial aplicada para o estudo do cyt c.

De acordo com a literatura^{57,76,161} o cyt c pode ser adsorvido irreversivelmente sobre monocamadas com certos grupos terminais, tal como $-\text{COOH}$. Entretanto, para as monocamadas de TNA, iTNA e Hpyt, os gráficos apresentaram uma relação linear da corrente de pico em função da raiz da velocidade de varredura indicando que os processos são controlados por difusão. Adicionalmente, para verificar se as monocamadas adsorvem o cyt c, deixou-se o eletrodo previamente modificado em uma solução de cyt c $1,0$ mmol L^{-1} em solução de tampão fosfato $0,1$ mol L^{-1} com pH 7,0. Em seguida, o eletrodo foi lavado com tampão fosfato e foram obtidos voltamogramas em uma solução eletrolítica de tampão fosfato $0,1$ mol L^{-1} pH 7,0 sem a presença da metaloproteína. Os resultados

obtidos não mostraram a reação de TE após a imersão por 2h na solução de cyt c sugerindo, assim, que as monocamadas de iTNA, TNA e Hpyt não interagem irreversivelmente com o cyt c.

A monocamada formada por Hpyt acessa satisfatoriamente a reação de TE do cyt c de forma semelhante a monocamada de pyS. Estas monocamadas apresentam em comum uma interação Au–S predominantemente σ e grupo terminal piridínico. Pode-se concluir que o grupo piridínico facilita a reação de TE do cyt c. Para reforçar esta conclusão, a monocamada formada pela molécula 5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-tiol (POT) e as monocamadas formadas por Hpyt e POT foram testadas para acessar a reação heterogênea de TE do cyt c. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 4.25.

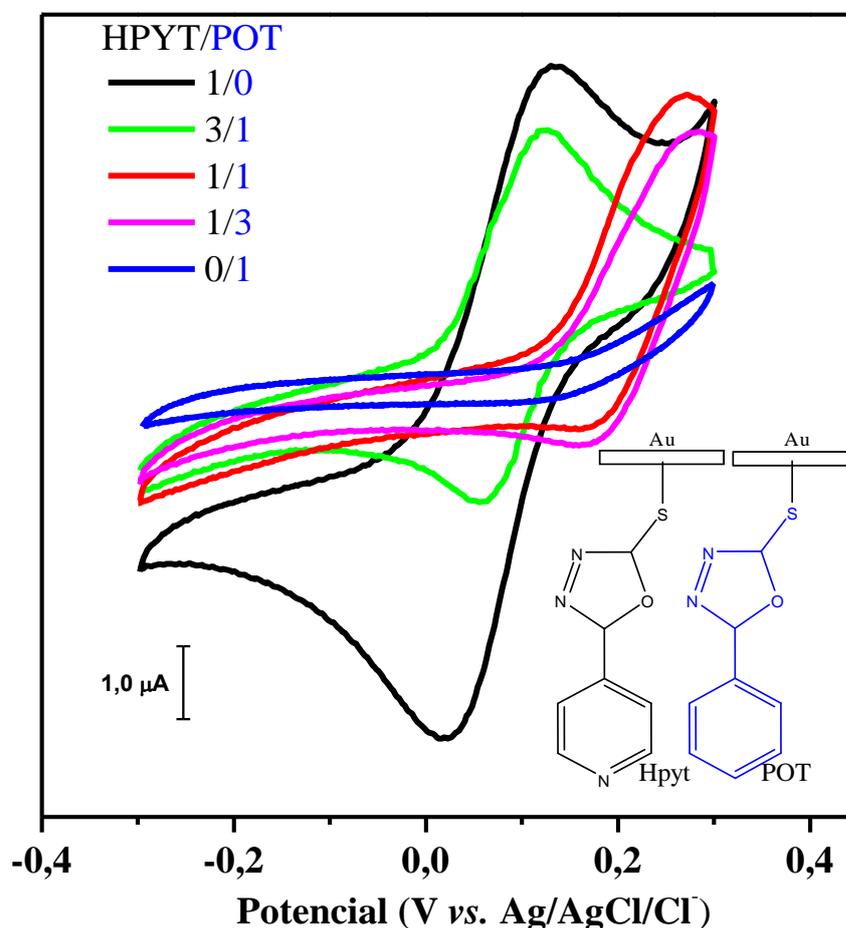


Figura 4.25 – Voltamogramas cíclicos a 100 mV s^{-1} para o eletrodo de ouro, após a imersão em soluções contendo diferentes proporções de Hpyt e POT, na presença de cyt c $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 7,0.

Como pode ser visto na Figura acima, a monocamada de POT que apresenta grupo terminal fenílico, não acessa a reação de TE do cyt c. Por outro lado, as monocamadas mistas Hpyt/POT favorecem a reação de TE. Quando a proporção de Hpyt é maior em relação ao POT, o $E_{1/2}$ é consistente com a forma nativa da proteína, embora uma diminuição da corrente de pico é observada em relação àquela obtida para a monocamada de Hpyt. Quando a quantidade de POT é igual ou superior a de Hpyt, o potencial é deslocado para valores mais positivos, semelhantemente ao comportamento observado quando as monocamadas de TNA e iTNA são utilizadas. Os resultados indicam que o átomo de nitrogênio piridínico (pKa ~5) desempenha um papel importante para que a TE ocorra. Como sugerido nos primeiros estudos do cyt c, o nitrogênio piridínico possivelmente interage eletrostaticamente com os grupos lisinas positivamente carregados acarretando em uma aproximação da proteína com uma orientação favorável à TE.

4.2.1.1 Acompanhamento via QCM

Os estudos eletroquímicos indicam que a reação de TE do cyt c, utilizando as monocamadas estudadas, é controlado por difusão. Entretanto, a possibilidade da adsorção da proteína não pode ser desconsiderada. Com a finalidade de avaliar a interação entre o cyt c e a superfície das monocamadas em estudo, o processo de TE do cyt c empregando essas monocamadas foi acompanhado via QCM, conforme apresentado na Figura 4.26.

A injeção do cyt c ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) na célula de QCM com a presença do eletrodo previamente modificado acarretou na diminuição da frequência, ou seja, no aumento de massa. Para as monocamadas de TNA, iTNA, Hpyt, pyS e 1,4-dt, após a adição do cyt c, observou-se, nos primeiros 10 minutos, uma diminuição rápida da frequência seguida por uma redução gradual até alcançar estado estacionário. Os valores de Δm e Γ foram calculados a partir das medidas de QCM e estão apresentados na Tabela 4.7.

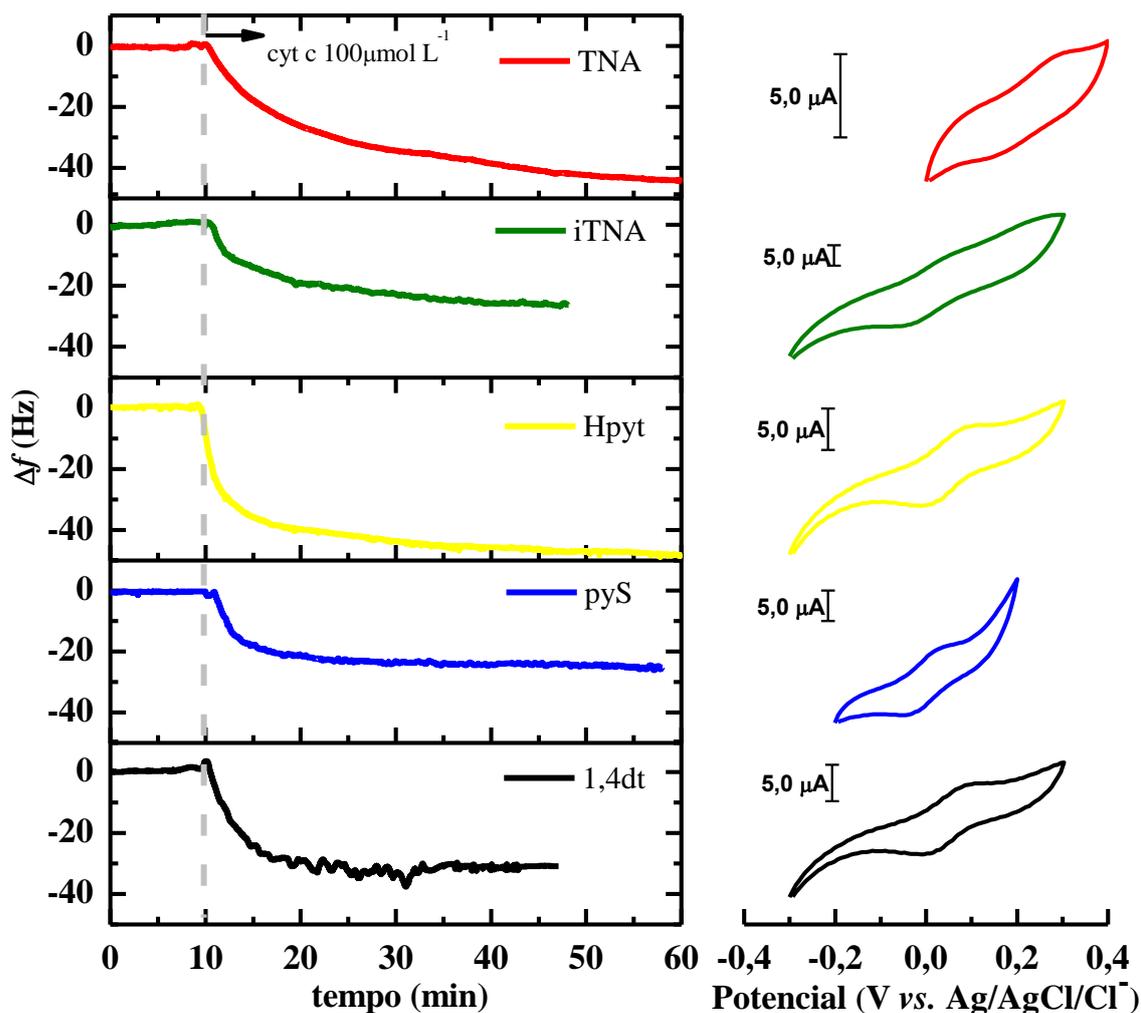


Figura 4.26 – (A) Variação da frequência do eletrodo de Au previamente modificado (tempo de imersão de 1h) com (—)TNA, (—)iTNA,(—)Hpyt, (—)pyS e(—)1,4-dt após injeção de cyt c $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e (B) os respectivos voltamogramas cíclicos obtidos durante as medidas de QCM.

Como pode ser observado na Tabela 4.8, as quantidades de moléculas de cyt c adsorvidas sobre as monocamadas foram superior ao valor sugerido para adsorção de uma monocamada⁵⁷ ($0,2 \mu\text{g cm}^{-2}$ ou 15 pmol cm^{-2} , considerando a molécula de cyt c como uma esfera sólida com um diâmetro de 3,4 nm). Dessa forma, mesmo que uma grande quantidade de moléculas de água seja co-adsorvida, os resultados indicam a adsorção de múltiplas camadas de proteína.

Tabela 4.8 – Valores de Δm e Γ para a adsorção de cyt c sobre as monocamadas de pyS, iTNA, 1,4-dt, TNA e Hpyt.

SAM	Δm ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Γ (pmol cm^{-2})
pyS	$0,43 \pm 0,11$	34,7
iTNA	$0,47 \pm 0,07$	37,9
1,4-dt	$0,65 \pm 0,08$	53,2
TNA	$0,71 \pm 0,05$	59,6
Hpyt	$0,88 \pm 0,05$	71,0

Os voltamogramas obtidos durante o monitoramento via QCM permitiram observar que os processos redox do cyt c são dependentes da presença da proteína em solução, conforme exemplificado na Figura 4.27.

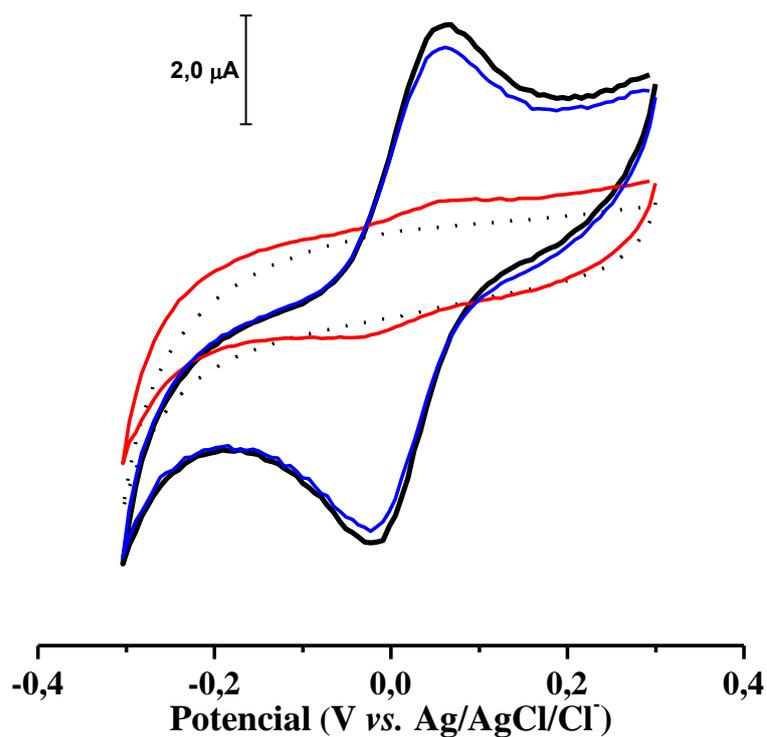


Figura 4.27 – Voltamogramas cíclicos obtidos (linha pontilhada) para o eletrodo Au/Hpyt na presença de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (—) durante o monitoramento via QCM (—) após a estabilização da frequência sendo obtido na ausência de cyt c e (—) após a reinsertão de cyt c $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

A corrente de pico, entretanto, apresentou uma relação linear com $v^{1/2}$ em todos os casos indicando que estes processos são controlados pelo transporte de massa. Adicionalmente, os voltamogramas obtidos após o equilíbrio da frequência e na ausência do cyt c não apresentaram processo eletroquímico referente ao par redox $\text{Fe}^{3+/2+}$ do grupo heme. Os processos do cyt c são reestabelecidos após a adição da solução de cyt c ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) à célula eletrolítica que continha apenas eletrólito de suporte. Pode-se concluir, desta forma, que as moléculas adsorvidas não são eletroativas. Os dados em análise, todavia, não são conclusivos em relação ao processo de desorção das moléculas de cyt c.

4.2.1.2 Acompanhamento via SPR

Ressonância dos plásmons de superfície (SPR) é um fenômeno óptico envolvendo a excitação dos elétrons que oscilam livremente em um metal (plásmons). Este efeito é uma oscilação da densidade de carga longitudinal, ao longo da interface entre dois meios com constantes dielétricas de sinais opostos, onde um é metal (prata, ouro, cobre e alumínio) e outro, um dielétrico. A configuração de refletância total atenuada, desenvolvida por Kretschmann¹⁶², é normalmente a mais utilizada nos instrumentos de SPR (Figura 4.28(A)). Esta configuração baseia-se no fenômeno de reflexão interna total que ocorre quando a luz polarizada atravessa um meio óptico denso alcançando uma interface entre este meio e outro com menor densidade óptica, sendo refletida de volta para o meio mais denso. A luz incidente é totalmente refletida, entretanto uma componente desta radiação (campo evanescente) penetra no meio menos denso. Em certo ângulo de incidência, o vetor de onda dos plásmons (K_{sp}) equivale ao vetor da onda do campo evanescente (K_{ev}) e parte da radiação acopla com os elétrons livres oscilantes (plásmons) do filme metálico. A energia é, então, transferida dos fótons para os elétrons ocorrendo a ressonância dos plásmons. Em consequência, ocorre uma perda de energia da luz incidente para o filme metálico, resultando na redução da intensidade da luz refletida.

O vetor de onda do campo evanescente (K_{ev}) é dado por:

$$K_{\text{ev}} = \frac{W_0}{c} \eta_g \text{sen} \theta \quad (4.27)$$

onde, W_0 é a frequência da luz incidente, η_g é o índice de refração do meio denso (vidro), θ é o ângulo de incidência da luz e c a velocidade da luz no vácuo. O vetor de onda dos plásmons de superfície (K_{sp}) pode ser representado por:

$$K_{sp} = \frac{W_0}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \eta_s^2}{\epsilon_m + \eta_s^2}} \quad (4.28)$$

onde, ϵ_m é a constante dielétrica do filme metálico e η_s o índice de refração do meio dielétrico. A amplitude do campo elétrico gerado por oscilações de elétrons livres (campo evanescente) é mais forte na interface dielétrico de metal e decai exponencialmente e rapidamente com o aumento da distância da superfície do metal, tornando-se praticamente zero em ~ 300 nm.

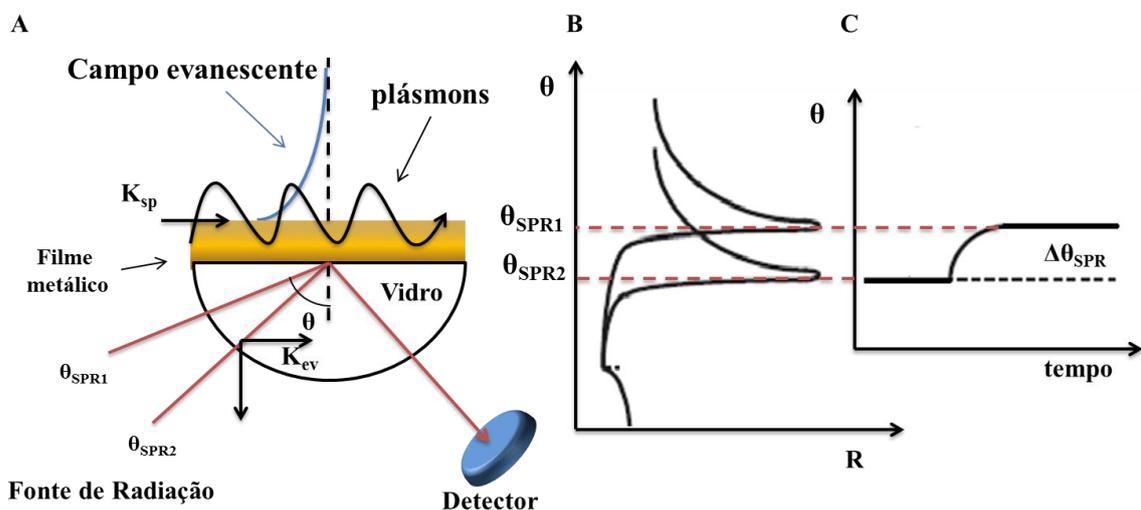


Figura 4.28 – (A) Representação esquemática da configuração de Kretschmann para SPR. (B) Curvas de refletância na ausência (θ_{SPR1}) e presença (θ_{SPR2}) de espécies na superfície do filme metálico; (C) Relação entre θ_{SPR} e tempo durante a interação de espécies com a superfície do filme metálico.

O vetor de onda do plasma de superfície K_{sp} é dependente do índice de refração (Eq. 4.28) do meio água/ar acima do filme metálico. Se o índice de refração imediatamente acima da superfície do metal sofre alguma alteração, pela adsorção de uma camada proteica, ou qualquer outra molécula, uma mudança no ângulo de incidência é requerida para que a excitação do plásmons de superfície ocorra. Assim, é possível utilizar o ângulo da luz incidente como um parâmetro de controle do fenômeno de plásmons de superfície,

mediante um monitoramento da refletância *vs.* ângulo de incidência de luz. No instante em que a componente paralela do fóton de luz incidente é equivalente à componente de propagação dos plásmons ($K_{ev} = K_{sp}$) deve ser verificada uma queda na refletância, devido à formação do campo evanescente, que se propaga através da superfície metálica e interage com o meio externo, como pode ser verificado pelas das expressões 4.29 e 4.30.

$$K_{ev} = K_{sp} = \frac{W_0}{c} \eta_g \text{sen} \theta = \frac{W_0}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \eta_s^2}{\epsilon_m + \eta_s^2}} \quad (4.29)$$

$$\theta = \arcsen \left(\frac{W_0}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \eta_s^2}{\epsilon_m + \eta_s^2}} x \frac{1}{\eta_g} \right) \quad (4.30)$$

Nesta última expressão, pode-se verificar que as propriedades ópticas do sistema, como a constante dielétrica do metal e dos índices de refração do prisma e da matriz, provocam mudanças no ângulo de ressonância (Figura 4.28(B)), tornando possível aplicar o fenômeno da SPR ao monitoramento de alterações na superfície do sensor, mediante um acompanhamento do ângulo de ressonância com o tempo (Figura 4.28(C)). Através do monitoramento do ângulo que ocorre a ressonância, durante um processo de adsorção em função do tempo, um perfil de adsorção pode ser obtido pela técnica de SPR. O monitoramento do índice de refração nas proximidades da superfície do disco sensor é possível aplicar a SPR para obter informações sobre velocidade e extensão da adsorção, possibilitando a determinação de propriedades dielétricas, cinética de associação e dissociação, bem como constantes de afinidades em interações específicas.

Em estudo modelo com lisozima foi demonstrado que uma relação linear existe entre a concentração de proteína e o índice de refração de uma solução¹⁶³. Além disso, apenas pequenas diferenças foram observadas com o aumento da refração específica mediante a variação da proteína¹⁶⁴. Isto permite relacionar diretamente a mudança do ângulo SPR com a quantidade de proteína adsorvida no sensor. Para superfície de sensores em hidrogel com espessura da camada de 100 nm, foi estabelecido que uma mudança no ângulo SPR de 120 milligráu (m°) corresponde a $1,0 \text{ ng mm}^{-2}$ a 25°C .

A interação entre as monocamadas e o cyt c foi avaliada por meio da técnica de SPR, conforme apresentado na Figura 4.29.

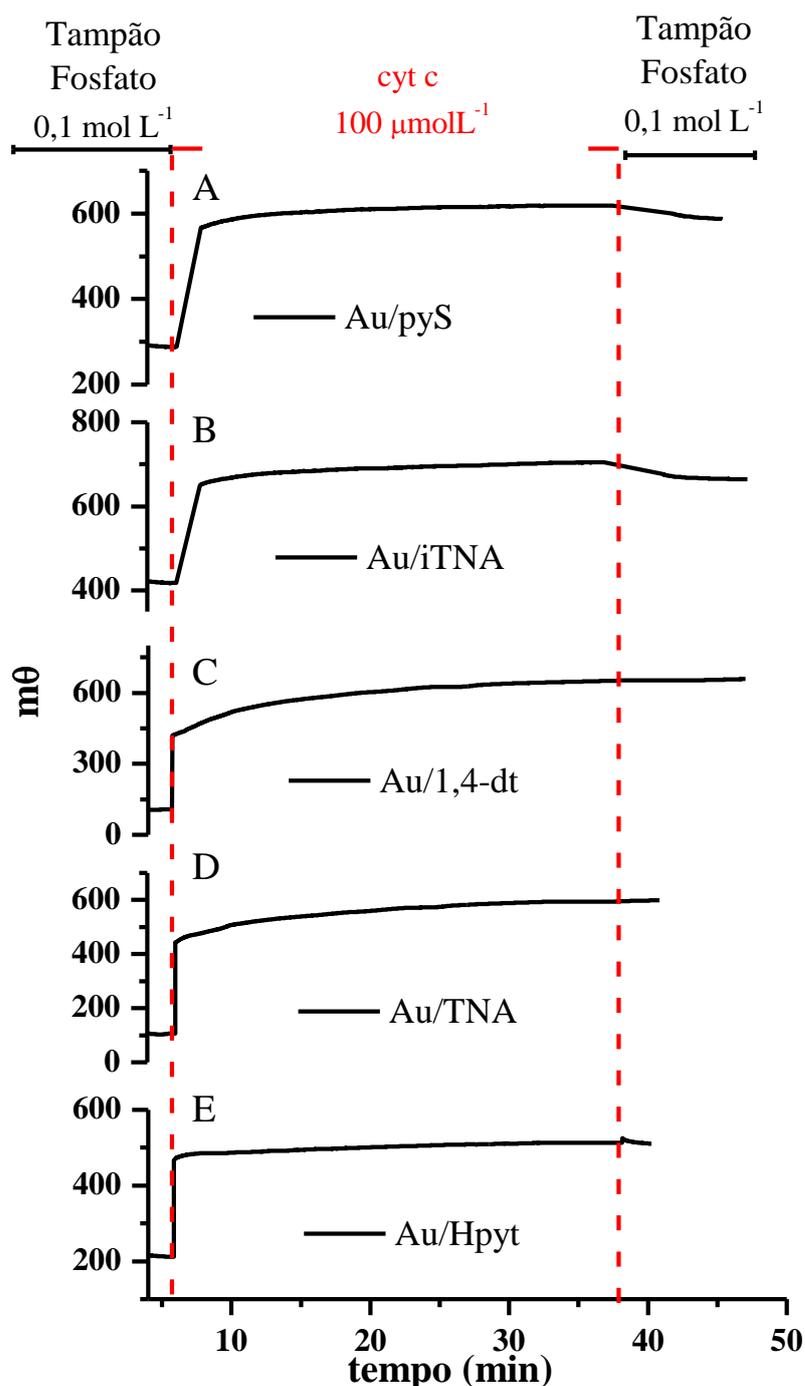


Figura 4.29– Variação de θ em função do tempo para a adsorção do cyt c ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) sobre as monocamadas de (A) pyS, (B) iTNA, (C) 1,4-dt, (D) TNA e (E) Hpyt (tempo de imersão de 1h).

Os discos de ouro foram previamente modificados antes da injeção do cyt c na célula do SPR que contém somente o tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Após a imersão, o sinal aumenta rapidamente, sendo que em aproximadamente 10 min a estabilidade é alcançada indicando que o cyt c adsorve sobre as monocamadas. Após a estabilidade, a medida do

sinal foi parada e um fluxo contínuo de tampão foi aplicado durante 5 min para remoção de moléculas fracamente adsorvidas. Em seguida, o sinal foi medido apenas na presença do tampão e determinaram-se os valores de $\Delta\theta$. A partir desses valores calculou-se Δm utilizando a Equação 1.1 (Tabela 4.9).

Tabela 4.9 – Valores de $\Delta\theta$, Δm e Γ para a adsorção de cyt c sobre as monocamadas de pyS, iTNA, 1,4-dt, TNA e Hpyt.

Monocamada	$\Delta\theta$ (m^0)	Δm ($\mu g\ cm^{-2}$)	Γ ($pmol\ cm^{-2}$)
pyS	408 \pm 12	0,175 \pm 0,075	14,1 \pm 6,10
iTNA	236 \pm 42	0,197 \pm 0,003	15,9 \pm 0,28
1,4-dt	420 \pm 105	0,240 \pm 0,094	27,1 \pm 7,60
TNA	210 \pm 85	0,340 \pm 0,010	27,5 \pm 0,81
Hpyt	402 \pm 100	0,350 \pm 0,090	28,3 \pm 7,30

Comparando-se os valores de Δm calculados via SPR e QCM, observa-se que os valores calculados por meio de QCM são praticamente o dobro daqueles determinados via SPR, conforme mostrado na Figura 4.30. Diferentemente dos resultados obtidos por QCM, os valores de massa calculados por SPR indicam que no máximo uma monocamada completa ($15\ pmol\ cm^{-2}$) de cyt é adsorvida. Estes resultados indicam que a técnica de SPR é menos susceptível a interferência do meio em que as medidas são realizadas, comparativamente a técnica de QCM.

Uma menor quantidade de cyt c foi adsorvida sobre as monocamadas de pyS e iTNA. Atribui-se esta observação a decomposição da monocamada de pyS e a posição do átomo de N piridínico da molécula de iTNA (Figura 4.24), conforme discussões nas páginas 69 e 81, respectivamente. Para as monocamadas de Hpyt, 1,4 dt e TNA, a quantidade de proteína adsorvida parece ser independente da natureza da monocamada, de acordo com os resultados de SPR. Por outro lado, os resultados de QCM são claramente afetados não apenas pela natureza das moléculas modificadoras, mas também, pela forma como estas interagem com as moléculas de cyt c. Interação esta que deve

modificar as características da interface e, portanto, da quantidade de moléculas de solvente e/ou íons em solução na dupla camada.

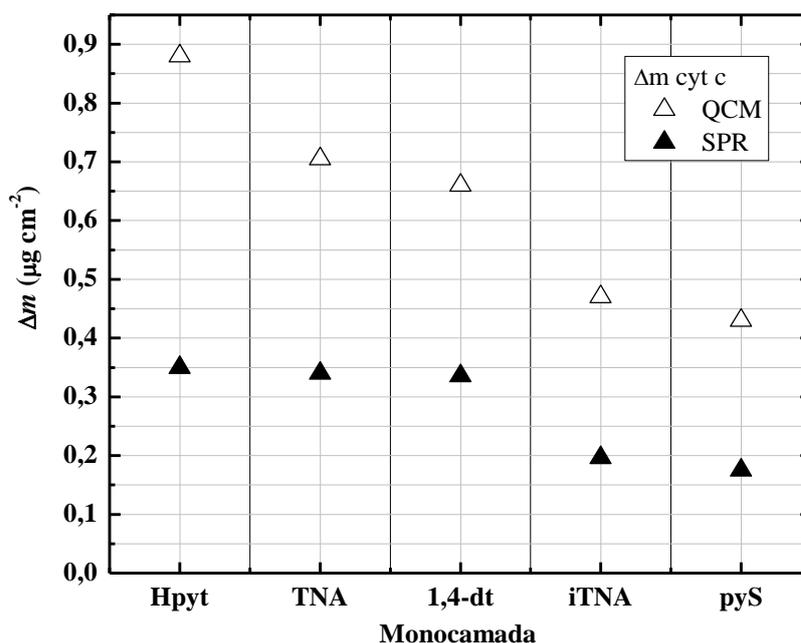


Figura 4.30 – Comparação entre os valores Δm de cyt c determinados via QCM e SPR .

Os resultados discutidos indicam que a reação de TE do cyt c é controlada pelo transporte de massa. As medidas eletroquímicas obtidas durante as medidas de SPR apresentaram o mesmo comportamento observado para as medidas de QCM. Sendo relevante o aspecto de que apenas os voltamogramas obtidos na presença da proteína apresentaram processos referentes à reação de TE do cyt c conforme exemplificado na Figura 4.31. Os resultados indicam que as moléculas de cyt c adsorvidas sobre as monocamadas não bloqueiam a reação de TE entre as moléculas em solução e o eletrodo. A adsorção do cyt c sobre superfícies metálicas causa desnaturação da proteína. De acordo com Bond⁵², estas moléculas adsorvidas sem a presença de modificadores inibem a reação de TE. Desta forma, as moléculas adsorvidas sobre as monocamadas em estudo não devem sofrer grandes alterações conformacionais sendo capazes de promover a TE, visto que os estudos eletroquímicos sugerem que este processo é controlado por difusão.

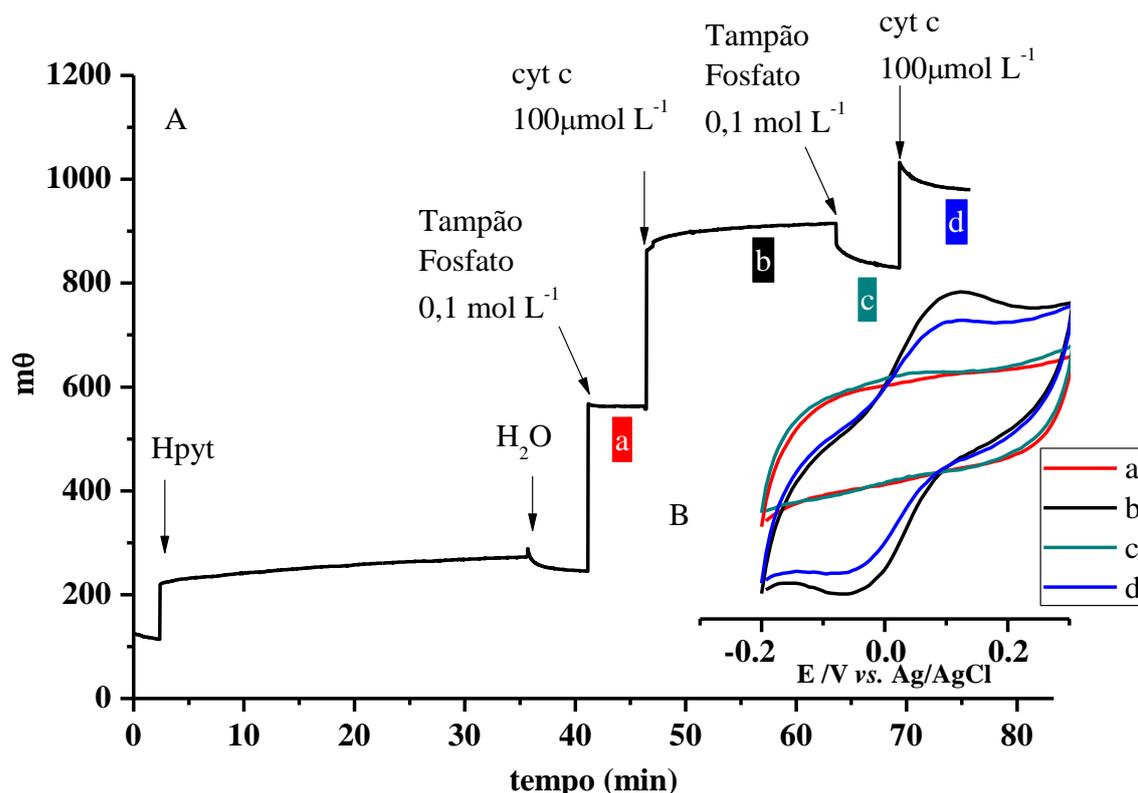


Figura 4.31 – (A) Variação de i em função do tempo para as etapas de modificação do disco de ouro com Hpyt e cyt c. (B) Voltamogramas cíclicos realizados durante a modificação do eletrodo.

Além disso, a grande quantidade de massa adsorvida indica que o filme de cyt c recobre toda a superfície. Assim, o grupo terminal das moléculas modificadoras não deveria interferir no acesso a reação de TE das moléculas de cyt c em solução, uma vez que a monocamada de cyt c ocupa um espaço de $\sim 3,4$ nm que somado a altura média dos modificadores em estudo resulta em uma distância total de $\sim 4,4$ nm para a superfície do eletrodo. Os resultados apresentados, todavia, indicam que a reação de TE das moléculas de cyt c em solução é sensível a natureza e a posição do grupo terminal das moléculas modificadoras. Estes resultados permitem concluir que o processo de TE do cyt c em solução envolve os orbitais das moléculas modificadoras, admitindo uma composição de duas monocamadas, ou seja, a primeira constituída pelas moléculas sulfuradas e a segunda por moléculas de cyt c.

Adicionalmente, esta conclusão é coerente com resultados da literatura^{165,166} que indicam a adsorção de múltiplas camadas (até 16 camadas) eletroativas de cyt c sobre monocamadas de alcanotióis. Estes estudos mostram que a corrente de pico do processo

aumenta para cada camada e o valor de $E_{1/2}$ de 0,03 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻¹ indica a forma nativa da proteína.

4.2.2 Estudos da TE da Mioglobina (Mb)

A eficiência das monocamadas automontadas, formadas por Hpyt, TNA, iTNA, pyS, e 1,4 dt sobre Au, em facilitar a reação de TE da Mb foram avaliadas, conforme ilustrado na Figura 4.32.

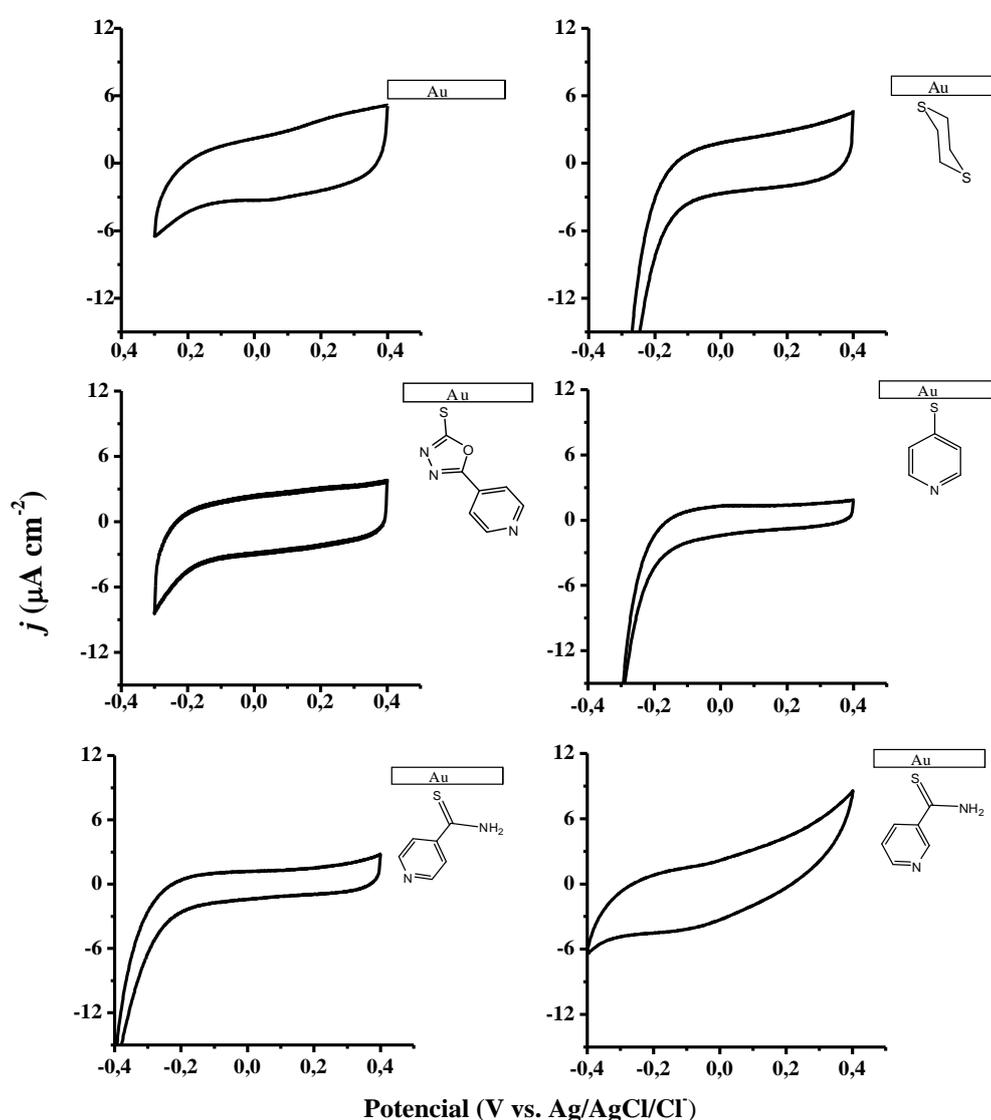


Figura 4.32 – Comparação dos voltamogramas cíclicos a 100 mV s⁻¹ para o eletrodo de ouro modificado com várias moléculas sulfuradas na presença de Mb 100 μmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹; pH 6,5.

Os voltamogramas para monocamadas de 1,4-dt, Hpyt, pyS, TNA e iTNA não apresentaram processo redox na presença de Mb, sugerindo que estas monocamadas não interagem com a Mb de forma a facilitar o processo de TE.

4.2.2.1 Acompanhamento via SPR

A adsorção de moléculas de Mb sobre as monocamadas foi avaliada utilizando-se a técnica de SPR conforme apresentado na Figura 4.33.

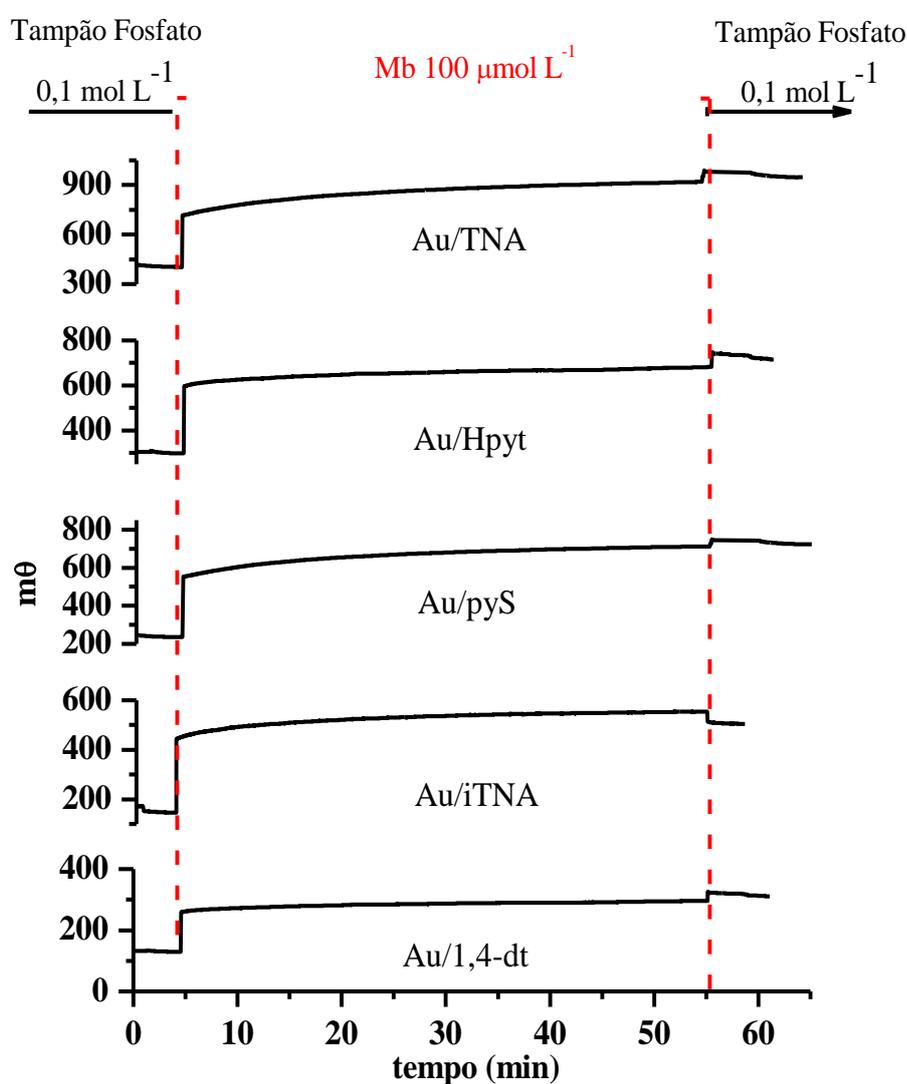


Figura 4.33– Variação de θ em função do tempo para a adsorção de Mb ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) sobre as monocamadas de (A) TNA, (B)Hpyt, (C)pyS, (D)iTNA e (E)1,4-dt (tempo de imersão de 1h para a formação das monocamadas).

O gráficos acima indicam que a Mb adsorve sobre as monocamadas. Correlacionando-se com os resultados de eletroquímica (Figura 4.32), pode-se sugerir que as moléculas adsorvidas não são eletroativas e, contrariamente ao cyt c, não atuam como promotoras da reação de TE das moléculas de Mb em solução. As técnicas utilizadas, entretanto, não permitem uma conclusão definitiva possibilitando, apenas, a sugestão de que as moléculas adsorvidas não apresentam orientação adequada ou encontram-se desnaturadas de tal modo a bloquear o processo de TE das moléculas em solução.

Tabela 4.10 – Valores de $\Delta\theta$, Δm e Γ para a adsorção de Mb sobre as monocamadas de pyS, iTNA, 1,4-dt, TNA e Hpyt.

Monocamada	$\Delta\theta$ (m ⁰)	Δm ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Γ (pmol cm^{-2})
pyS	487	0,406	32,8
iTNA	377	0,314	25,3
1,4-dt	133	0,111	89,6
TNA	564	0,47	38,0
Hpyt	354	0,295	23,8

Visto que as monocamadas formadas pelas moléculas sulfuradas estudadas não foram efetivas para o estudo da reação de TE da Mb, utilizou-se a molécula de L-cisteína (cys) tendo em vista que uma espécie similar, a DL-Homocisteína, foi previamente empregada com sucesso¹¹³. Além disso, a monocamada de cys sobre ouro acessou satisfatoriamente a reação de TE de diversas metaloproteínas, podendo-se citar o cyt c em soluções neutras⁷³⁻⁷⁶, ácidas⁷⁷ e alcalinas⁷⁵, o citocromo b5 e a metaloenzima bovina cobre-zinco superóxido dismutase⁷⁸ (SOD – “*copper-zinc superoxide dismutase*”).

4.3 Imobilização da Mb sobre a monocamada de L-cisteína

A monocamada formada pelo aminoácido cys que apresenta os grupos NH₂ e COOH como grupos terminais, foi avaliada como promotora da reação de TE da Mb. Os

voltamogramas cíclicos para o eletrodo de ouro limpo em solução de cys e para o eletrodo Au/cys em tampão fosfato não apresentaram nenhum processo redox, conforme apresentado na Figura 4.34 curvas (—) e (—) respectivamente. Por outro lado, processos redox com características de quasi-reversibilidade e valor de potencial de meia-onda de 0,086 V foi observado no voltamograma obtido para o eletrodo Au/Cys em Mb 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Curva (—)). Isto implica que o átomo de Fe(III) na Mb pode ser reduzido efetivamente a Fe(II) no eletrodo modificado com cys. O potencial de meia onda observado é coerente com o valor observado para Mb usando a monocamada de DL-homocisteína sobre eletrodo de ouro⁷⁶. Após 50 min de imersão em solução de Mb, o eletrodo Au/cys foi removido e lavado com água e transferido para uma célula eletroquímica contendo somente tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH 6,5. O voltamograma cíclico obtido é ilustrado na Figura 4.34, Curva (—), e tem uma forma similar a curva obtida em tampão fosfato contendo Mb, Curva (—).

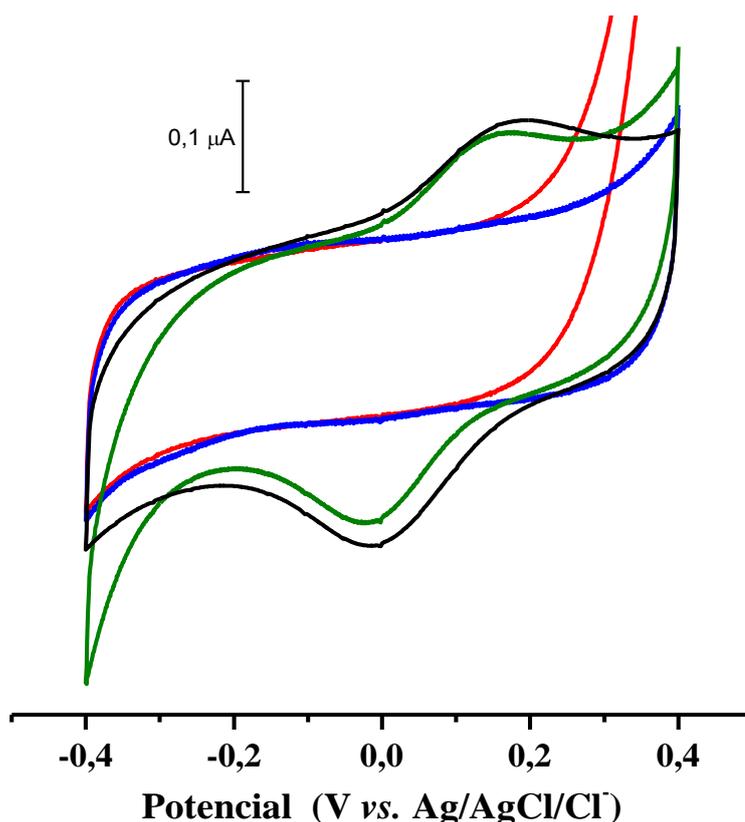


Figura 4.34 – Voltamogramas cíclicos a $0,10 \text{ V s}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5, para o Au limpo na presença de (—) Mb $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, (—) Cys $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e para Au/Cys na presença de (—) Mb $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e para o eletrodo Au/cys/Mb na presença de (—) tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Estes resultados indicam que a Mb está adsorvida sobre a monocamada de cys. De fato, como mostrado na Figura abaixo, os voltamogramas cíclicos obtidos (Figura 4.35(A)) para este eletrodo modificado na presença de tampão fosfato para diferentes velocidades de varredura apresentaram uma dependência linear da corrente de pico (i_p) com a velocidade de varredura (ν) (Figura 4.35(B)) indicando um processo típico para espécies confinadas na superfície do eletrodo¹⁶⁷. Os valores de i_p e $E_{1/2}$ não apresentaram mudanças significativas após 100 ciclos de varredura contínuos de 0,60 a -0,50 V em tampão fosfato. Entretanto, os processos redox da Mb desapareceram quando o potencial aplicado foi maior que 0,60 V e menor que -0,60 V. Esta observação é atribuída, respectivamente, a oxidação e a desorção da monocamada de cys ($E_{dr} = -0,57 \text{ V}$ ¹⁶⁸).

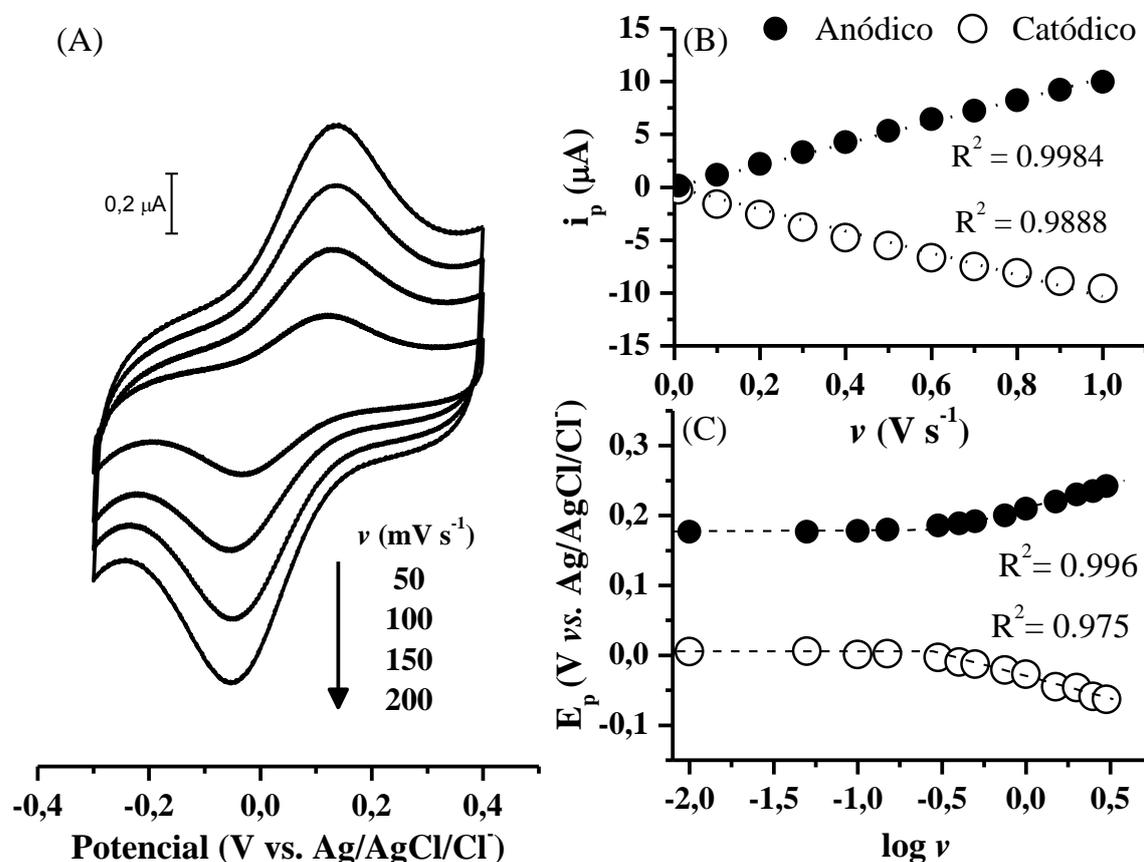


Figura 4.35 – (A) Voltamogramas cíclicos em várias velocidades de varredura para o eletrodo Au/Cys/Mb na presença de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 6,5 e (B) Relação linear entre a i_p catódico e anódico coma a ν . (C) Gráfico de $\log \nu$ vs. a potencial (E_p) de oxidação e redução para o eletrodo Au/Cys/Mb na presença de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 6,5.

A quantidade de moléculas de Mb adsorvidas, Γ , foi calculada de acordo com a Equação:

$$i_p = \frac{n^2 F^2 \nu A \Gamma}{4RT} \quad (4.31)$$

onde, n e A são, respectivamente, o número de elétrons da reação de eletrodo e área ativa do eletrodo, e R , T , e F têm seus significados usuais. Um valor de Γ de $6,10 \times 10^{-11}$ mol cm^{-2} foi calculado para as moléculas de Mb adsorvidas no eletrodo Au/cys sob condições de saturação. Além disso, como pode ser observado na Figura 4.35 (C), um deslocamento nas direções positiva e negativa é observado para os potenciais de pico de oxidação e redução (E_p), respectivamente, quando a velocidade de varredura é aumentada. De acordo com a teoria de Laviron¹⁶⁹ este é o comportamento esperado para espécies redox confinadas na superfície do eletrodo. Assim, o gráfico de E_p vs. $\log \nu$ mostra duas linhas retas com inclinação de $-2,3RT/anF$ e $2,3RT/(1-\alpha)nF$ para os potenciais de pico catódico e anódico, respectivamente. Da interseção destas curvas, o coeficiente de transferência de elétrons, α , foi calculado como 0,53. A constante heterogênea de transferência de elétrons, $k_s = 1,66 \text{ s}^{-1}$, foi calculada de acordo com a Equação (4.32)¹⁶⁹:

$$E_p = E^{0'} - \frac{RT}{\alpha nF} \ln\left(\frac{\alpha nF}{RTk_s}\right) - \frac{RT}{\alpha nF} \ln(\nu) \quad (4.32)$$

O valor de k_s calculado é maior que os valores reportados para Mb adsorvida em ZnO nanoporoso⁹⁸ ($1,0 \text{ s}^{-1}$) e na monocamada formada com DL-homocisteína⁷⁶ sobre ouro ($0,9 \text{ s}^{-1}$). Este valor, porém, foi menor que os obtidos usando nanotubos de carbono com multicamadas, MWNTs¹⁷⁰ ($5,4 \text{ s}^{-1}$), e as monocamadas de agarose¹⁷¹ (47 ± 3) e arilhidroxilamina⁹⁹ sobre ouro ($51 \pm 5 \text{ s}^{-1}$).

4.3.1 Influência do pH e da força iônica na reação TE da Mb

A reação de TE da Mb é geralmente afetada pela força iônica e o valor de pH da solução¹¹⁸ (Tabela 1.2). A Figura 4.36 (A) ilustra a dependência do potencial formal com o valor do pH da solução eletrolítica. A relação do valor de $E_{1/2}$ vs. pH é linear (Figura 4.36(B)) e apresenta uma inclinação de 55 mV sendo consistente com a inclinação Nernstiana (59 mV). Este resultado indica a transferência¹⁷² de um próton e um elétron na redução da Mb de acordo com a reação de eletrodo abaixo:



Considerando a possibilidade de desnaturação da Mb, a reação de TE da metaloproteína não foi investigada acima de pH 9,0. Além disso, o valor de $E_{1/2}$ da Mb permaneceu invariável para valores de pH abaixo de 5,0.

A Figura 4.36(C) apresenta um gráfico de $E_{1/2}$ em função do inverso da raiz quadrada da força iônica ($\mu^{-1/2}$). Foi observada, também, uma relação linear na faixa de concentração do tampão fosfato de 1,0 a 0,01 mol L⁻¹ indicando que o comprimento de Debye é de aproximadamente 30 Å sendo da mesma ordem de grandeza da espessura da camada modificada cys/Mb. Para força iônica baixa (< 1,0 mmol L⁻¹), o gráfico perde a linearidade indicando que o comprimento é bem maior do que a espessura do filme formado.

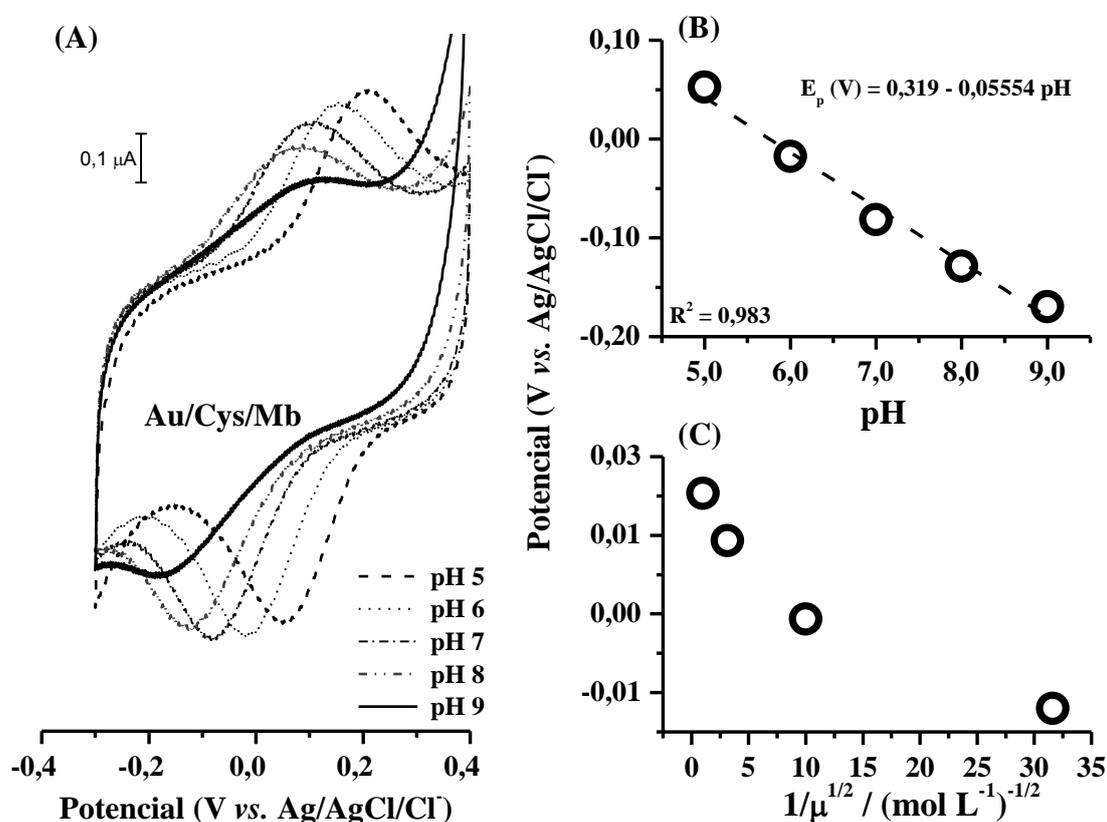


Figura 4.36 – (A) Voltamograma cíclico para o eletrodo Au/Cys/Mb a 0,1 V s⁻¹ na presença de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em diferentes valores de pH. Gráficos de (B) $E_{1/2}$ vs. pH e (C) $E_{1/2}$ vs. o inverso da raiz quadrada da força iônica (μ).

4.3.2 Estudo cinético e termodinâmico da adsorção da Mb sobre a monocamada de cys

A quantidade máxima de moléculas adsorvidas, Γ_s , e o coeficiente de adsorção, β , para o processo de adsorção da Mb no eletrodo Au/Cys foram determinados com base na equação de Langmuir linearizada. Assim, um gráfico de $[\text{Mb}]/\Gamma$ vs. $[\text{Mb}]$ contém $1/\Gamma_s$ e $1/\Gamma_s\beta$ como inclinação e interseção, respectivamente, conforme ilustrado na Figura 4.37. Com base no gráfico (B), o valor de $6,13 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ e $1,06 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1}$ foram calculados, respectivamente, para os parâmetros Γ_s e β . Estes valores foram usados na isoterma de Frumkin e o melhor ajuste aos dados experimentais foi obtido quando o parâmetro de interação, g , foi considerado como $-0,15$ indicando uma interação repulsiva entre as moléculas de Mb adsorvidas. Além disso, o parâmetro β foi usado para calcular a energia livre de adsorção, ΔG_{ads} , de acordo com a Equação 4.8:

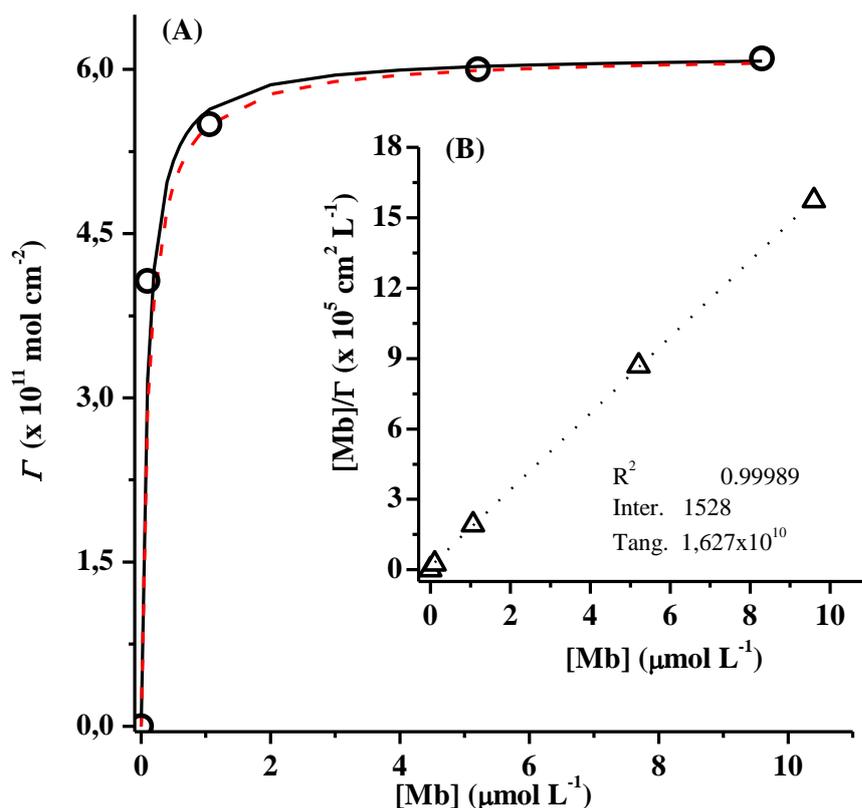


Figura 4.37 – (A) Isotherma de adsorção da Mb sobre o eletrodo Au/Cys e as curvas teóricas para a isoterma de Langmuir (curva sólida) e Frumkin (curva tracejada), com $g = -0,15$. (B) Isotherma de Langmuir linearizada.

O valor de ΔG_{ads} , que fornece uma medida quantitativa da força de adsorção, foi calculado como $-49,67 \text{ kJ mol}^{-1}$. Este resultado é indicativo de uma interação química, quimissorção¹²⁹ entre Mb e a monocamada de cys.

A cinética de adsorção da Mb foi estudada a partir da quantidade de moléculas adsorvidas em função do tempo, Γ_t , para diferentes concentrações de Mb em solução. A Figura 4.38 apresenta os gráficos de Γ_t vs. t e Γ_t vs. $t^{1/2}$, onde a quantidade de moléculas adsorvidas no equilíbrio, Γ_e , e a constante de velocidade de adsorção, k' , são utilizados como parâmetros ajustáveis para os dados cinéticos de acordo com a Equação 4.15 e 4.16.

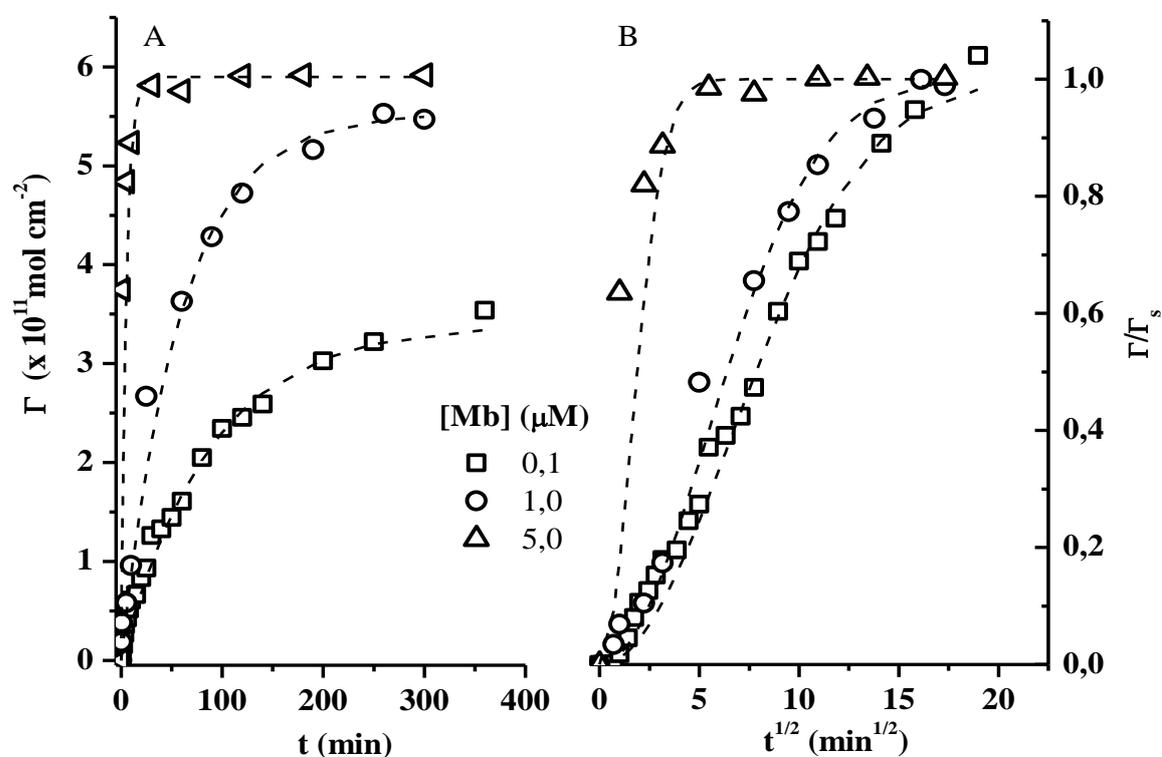


Figura 4.38 – (A) Gráfico de Γ_t vs. t e (B) Γ/Γ_s vs. $t^{1/2}$ para a adsorção de Mb sobre o eletrodo Au/Cys para diferentes concentrações.

Como pode ser visto na Figura 4.38(A), a concordância entre os dados experimentais e os calculados sugere que o modelo cinético é adequado para descrever o processo de adsorção das moléculas de Mb sobre o eletrodo Au/cys. Além disso, os gráficos apresentados na Figura 4.38(B) não são lineares indicando que o processo não pode ser explicado pelo modelo difusional. A Tabela 4.11 apresenta os parâmetros k' e Γ_e

obtidos para a adsorção de Mb sobre a monocamada de cisteína considerando-se, portanto, o modelo cinético.

Tabela 4.11 – Parâmetros k' e Γ_e para a adsorção de Mb sobre o eletrodo Au/cys

$[Mb] / \mu\text{mol L}^{-1}$	$k' / \times 10^{-3} \text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\Gamma_e / \times 10^{11} \text{mol cm}^{-2}$
0,1	1,7	3,3
1,0	2,5	5,5
5,0	6,1	5,9

[Mb] concentração da Mb

O aumento de Γ_e com o aumento da concentração de Mb é consistente com processos de adsorção cineticamente controlados.

4.3.3 Acompanhamento via QCM

Após a estabilização da frequência, aproximadamente 300s, o cristal de Au foi mantido imerso em solução aquosa de cys 2,0 mmol L⁻¹ por 12h quando uma variação de massa de 87,8 ng cm⁻² foi observada. Este valor é consistente com o obtido por Bertotti¹⁷³. O eletrodo Au/cys foi, então, imerso em uma solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ contendo de 10 μmol L⁻¹ de Mb. Uma diminuição da frequência foi observada durante os primeiros 15 min, seguido por um decréscimo mais gradual que levou em torno de 90 min até atingir o estado estacionário. Após 12h de imersão, uma variação total na frequência de -94 Hz foi observada sendo consistente com uma variação de massa de 1,66 μg cm⁻².

O voltamograma cíclico obtido após 5000s de imersão do eletrodo Au/cys em tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ contendo 10 μmol L⁻¹ de Mb é apresentado na Figura 4.39. Assumindo que, após esse tempo de imersão, a saturação tenha sido alcançada, Γ_e foi calculado por voltametria como 6,53 x 10⁻¹¹ mol cm⁻² correspondendo uma variação de massa de 1,10 μg cm⁻². Este valor, entretanto, não é concordante com o valor experimental de 1,66 μg cm⁻² como se pode observar na Figura 4.39. Esta massa adicional (0,56 μg cm⁻²) é provavelmente devido à adsorção de água de hidratação e/ou

íons na estrutura complexa da Mb. O número de moléculas de água de hidratação de aproximadamente 480 moléculas por Mb foi calculado a partir do excesso de massa conforme discutido no Item 4.1.3.

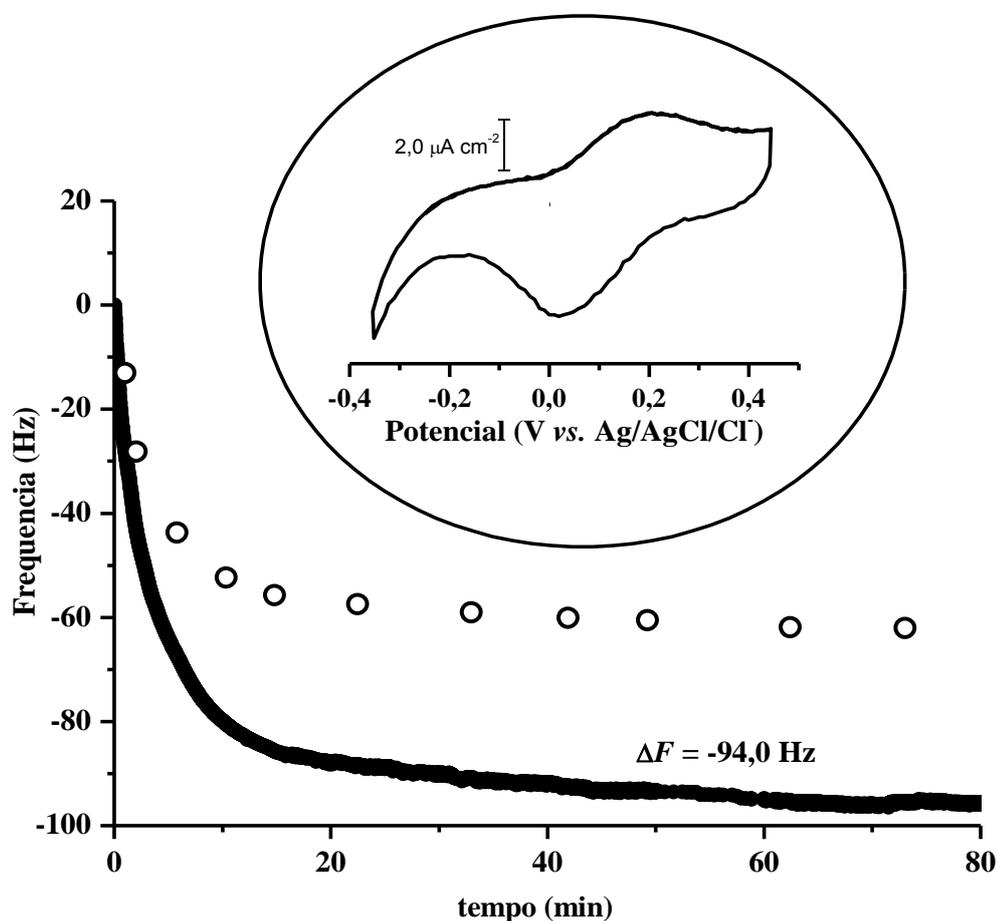


Figura 4.39 – Curva observada (linha sólida) e calculada (círculos abertos) da variação da frequência vs. o tempo para a adsorção de Mb sobre Au/cys. Figura anexada: voltamograma cíclico a 100 mV s^{-1} para o eletrodo Au/cys (cristal de Au) em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ contendo Mb $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ após 80 min de imersão.

4.4 Aplicação do eletrodo Au/cys/Mb para catálise de ácido ascórbico

Ácido ascórbico (AA) é uma vitamina hidrossolúvel essencial para a função cardiovascular, para o desenvolvimento das células imunológicas, tecido conjuntivo e absorção de ferro em humanos¹⁷⁴. Além disso, é amplamente utilizado em alimentos como antioxidante para a estabilização de cores e sabores. Esta vitamina não é produzida

no organismo dos seres humanos devido a falta da enzima L-gulono-1,4-lactona oxidase nas células do fígado. Desta forma, se faz necessário obter AA a partir de frutas, legumes, e medicamentos para equilibrar a quantidade de vitamina C no organismo. Considerando essas funcionalidades, a determinação de AA tem atraído o interesse das indústrias alimentícia e farmacêutica¹⁷⁵. Diversos métodos foram desenvolvidos para esta finalidade, incluindo espectrofotometria¹⁷⁶, espectrofotofluorimetria¹⁷⁷, espectrometria de absorção atômica de chama¹⁷⁸, Cromatografia Líquida de alta eficiência acoplada a espectroscopia de massa¹⁷⁹, eletroforese capilar¹⁸⁰ e eletrodos quimicamente modificados¹⁸¹⁻¹⁸³. A detecção eletroquímica é muito atraente, devido à sua alta sensibilidade e seletividade. Além disso, é promissora para a fabricação de sensores simples e de baixo custo.

Entretanto, é quase impossível determinar AA por oxidação direta utilizando eletrodos convencionais (ouro, carbono) devido a pobre seletividade, sensibilidade e reprodutibilidade e, além disso, a oxidação do AA requer alto sobrepotencial. Sendo assim, se faz necessário a utilização de eletrodos modificados para catalisar a oxidação de AA.

A atividade catalítica do eletrodo Au/cys/Mb foi avaliada para oxidação de ácido ascórbico (AA). Os voltamogramas cíclicos para este eletrodo bem como para o eletrodo de Au limpo são apresentados na Figura 4.40(A). Para o eletrodo Au/cys/Mb, a adição de AA resulta em uma significativa mudança na forma voltamograma com uma grande aumento da corrente anódica conforme mostrado na Figura 4.40(A). Além disso, um decréscimo maior que 0,4 V no sobrepotencial anódico do AA pode ser claramente observado quando o eletrodo Au/cys/Mb é usado em comparação ao eletrodo de ouro limpo. O gráfico da corrente catalítica *vs.* $v^{1/2}$ é linear conforme apresentado na Figura 4.40(C) [○], sugerindo que a reação é limitada pelo transporte de massa.

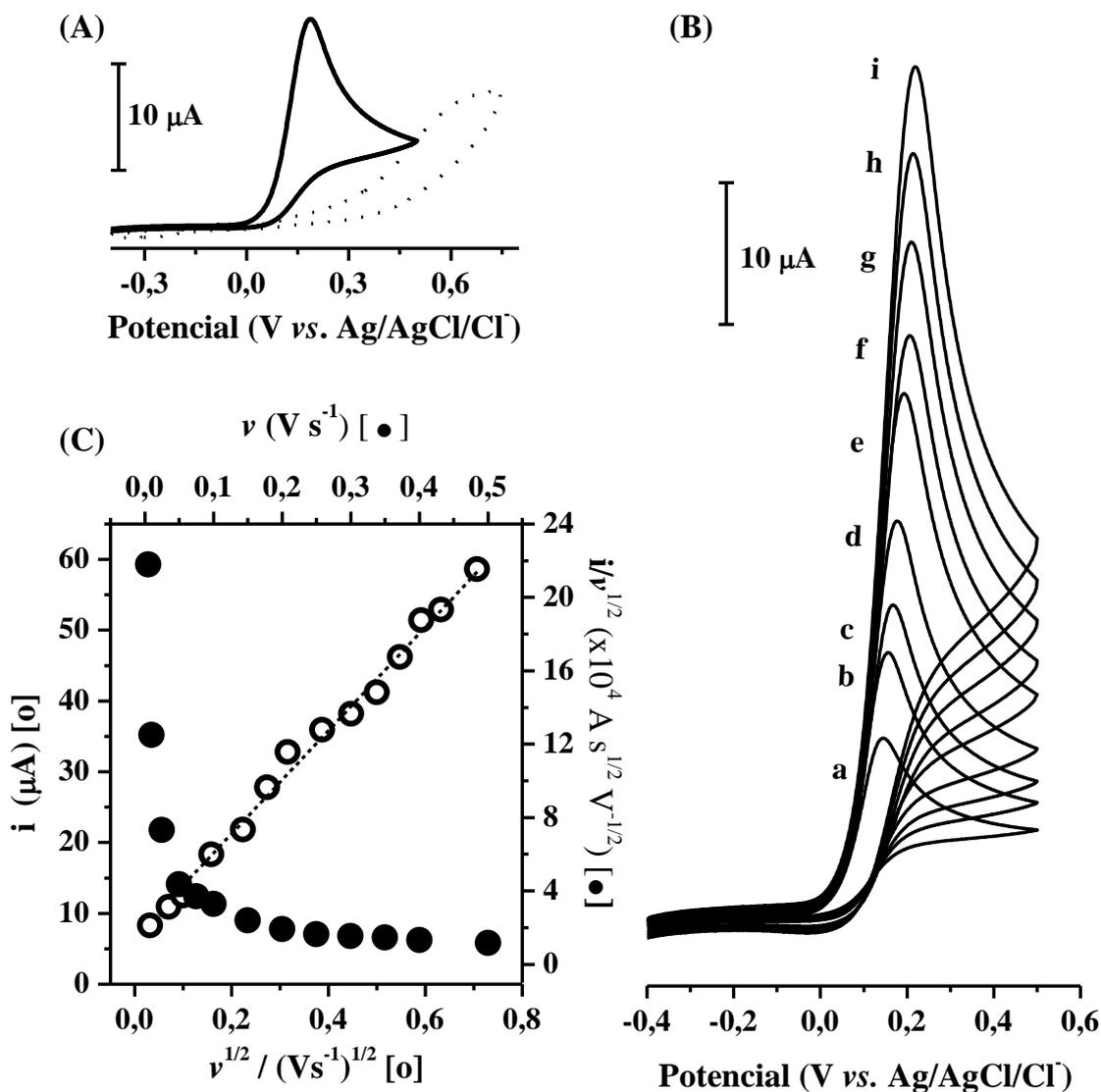


Figura 4.40 – Voltamogramas cíclicos em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5) contendo AA 5,0 mmol L⁻¹ para os eletrodos (A) Au/cys/Mb (linha sólida) e Au (linha pontilhada) a 100 mV s⁻¹ e para o eletrodo (B) Au/cys/Mb em diferentes velocidades de varredura (*v*) (a) 10, (b) 25, (c) 50, (d) 75, (e) 150, (f) 250, (g) 300, (h) 400 e (i) 500 mV s⁻¹. (C) Gráfico da corrente catalítica (o), *i*, vs. *v*^{1/2} e da (•) corrente normalizada, *i/v*^{1/2} vs. *v*.

O gráfico da corrente normalizada (*i v*^{-1/2}) vs. *v* (Figura 4.40 (C) [•]) exibe uma forma característica de um processo EC_{cat} (Eletroquímico-Químico catalítico)¹⁸⁴ conforme representado na Figura 4.41.

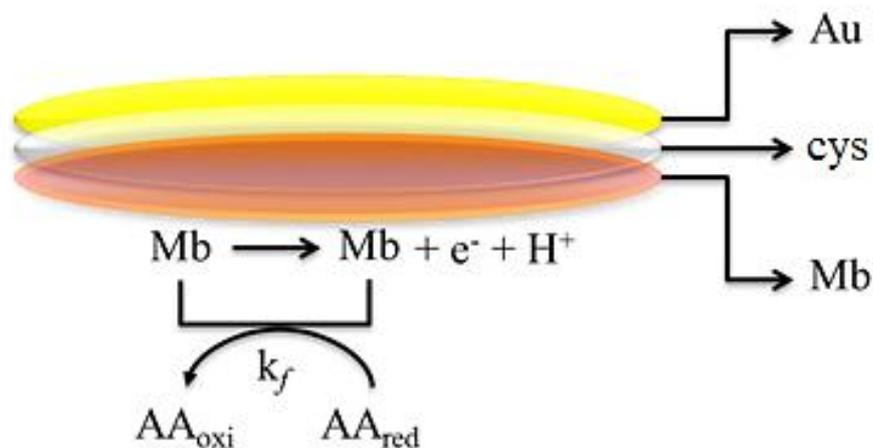


Figura 4.41 – Representação do processo eletrocatalítico do AA mediante o eletrodo Au/cys/Mb. k_f é a constante de velocidade.

Andrieux e Saveant¹⁸⁵ propuseram um modelo teórico para esse mecanismo de catálise e derivou uma relação (4.34) entre a corrente (i_{cat}) e a concentração do substrato, o AA neste caso, (C^*) para baixos valores de velocidade de varredura (< 10 mV/s).

$$i_{\text{cat}} = 0,496nFAD^{1/2}v^{1/2}C^*(nF/RT)^{1/2} \quad (4.34)$$

A correlação entre o valor da inclinação da reta obtida no gráfico experimental de i vs. $v^{1/2}$ (Figura 4.40(C)) e o gráfico teórico ilustrado na Figura 4.42 permite determinar a velocidade da reação em estudo. Assim, de acordo com os autores¹⁸⁵, valores menores que 0,496 no eixo Y do gráfico teórico indicam cinéticas lentas. Neste trabalho, o valor médio determinado foi de 0,320 para o filme de Mb com $\Gamma = 6,1 \times 10^{-11}$ mol cm⁻² na presença de AA 5,0 mmol L⁻¹. Traçando-se uma paralela ao eixo X a partir do valor de 0,320 no eixo Y, o valor correspondente ao ponto da curva teórica indica o valor da constante de velocidade, k_f , de $2,40 \times 10^4$ L mol⁻¹ s⁻¹ para o processo $\text{AA} \xrightarrow{k_f} \text{AA}^{2+}$.

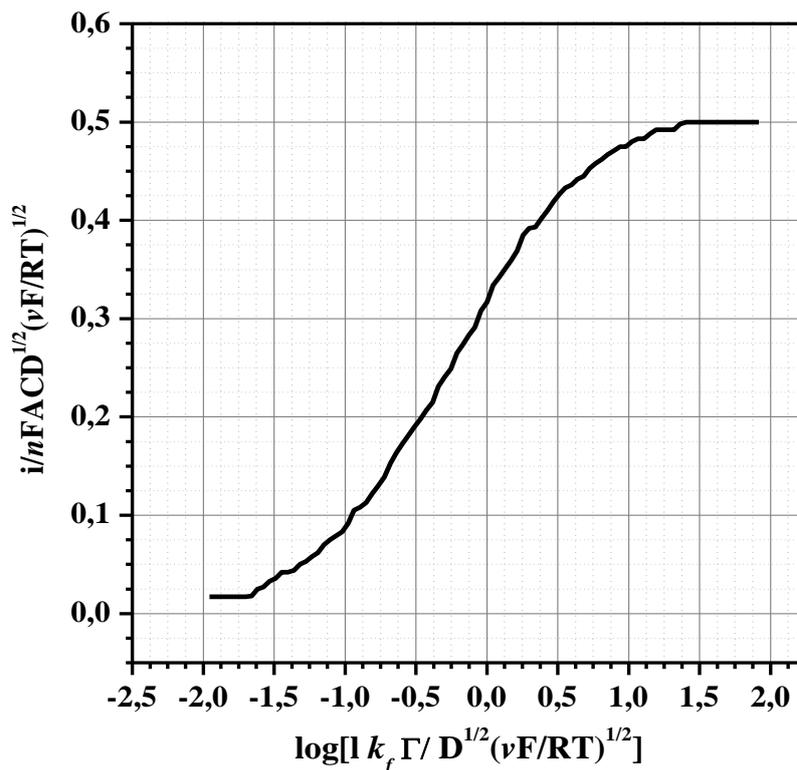


Figura 4.42 – Modelo teórico de Saveant¹⁸⁵ para o comportamento da corrente catalítica em função da constante de velocidade k_f . l é o número de monocamadas. (Os pontos do gráfico estão na Tabela A1 no Apêndice A)

A atividade eletrolítica do eletrodo Au/cys/Mb para oxidação de AA também foi investigada por meio da técnica de eletrodo de disco rotatório, RDE. A Figura 4.43 (A) apresenta a resposta dos experimentos de RDE na presença de AA 5,0 mmol L⁻¹ para o eletrodo Au/cys/Mb com $\Gamma = 6,0 \times 10^{-11}$ mol cm⁻² de Mb. Os voltamogramas de RDE apresentam um aumento linear da corrente com o aumento da raiz quadrada da velocidade de rotação, $\omega^{1/2}$, até 150 rpm quando, então, este comportamento não mais é observado. O gráfico da corrente limite, i_L , destas curvas vs. $\omega^{1/2}$ (gráfico de Levich¹²⁹) apresenta uma curva não linear indicando que o processo não é controlado pelo transporte de massa, como ilustrado na Figura 4.43 (B). Considerando que a oxidação de AA é a etapa determinante, a relação de Koutecky-Levich¹⁸⁶ foi usada para construir o gráfico mostrado na Figura 4.43 (C) a partir do qual a constante de velocidade, k_f , pode ser calculada a partir da Equação 4.35¹⁸⁶.

$$\frac{1}{i_L} = \frac{1}{nFA\Gamma k_f C^*} + \frac{1}{0,62nFAv^{-1/6}D^{2/3}\omega^{1/2}C^*} \quad (4.35)$$

Utilizando este modelo, o valor de k_f foi calculado como $1,9 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Este valor tem uma excelente concordância com o valor calculado dos experimentos de voltametria cíclica ($k_f = 2,4 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, Figura 4.43).

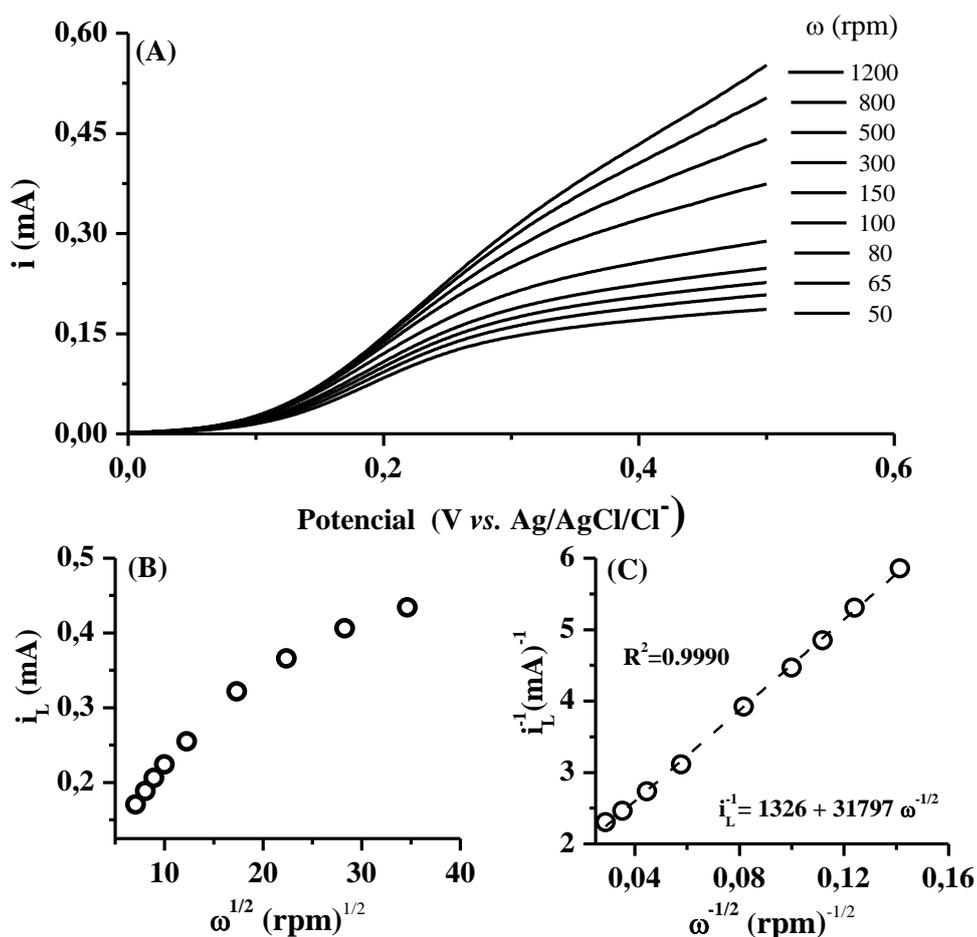


Figura 4.43 – (A) voltamogramas RDE a $0,01 \text{ V s}^{-1}$ para Au/cys/Mb em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) contendo AA $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Gráficos de Levich (B) e Koutecky–Levich (C) a $0,40 \text{ V}$ para a reação de oxidação de AA.

O desempenho analítico do eletrodo Au/cys/Mb em relação a detecção de AA foi avaliado a partir dos voltamogramas cíclicos obtidos na presença de diferentes valores de concentração de AA, conforme apresentado na Figura 4.44. Para o eletrodo Au/cys/Mb, foi observada uma relação linear para a determinação de AA na faixa de concentração de

0,5 a 5,0 mmol L⁻¹ com a seguinte equação de reta $i_p(A) = 4,43 \times 10^{-3}[AA] \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$ e quadrado de coeficiente de correlação de R^2 de 0,9970.

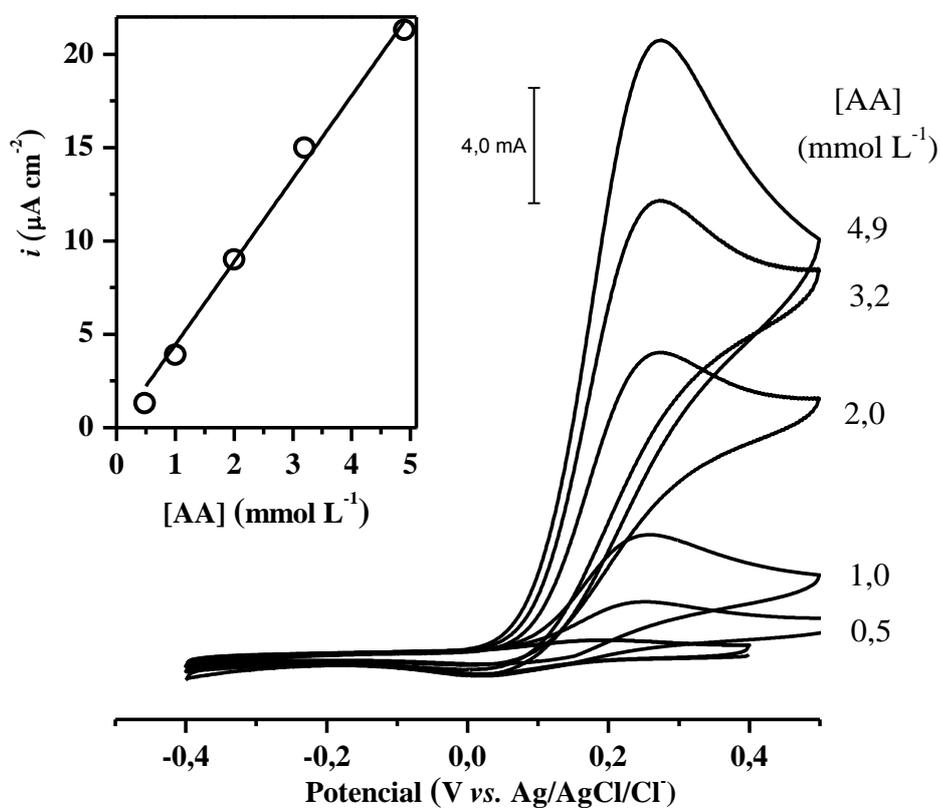


Figure 4.44 – Voltamogramas cíclicos para o eletrodo Au/cys/Mb a 0,1 V s⁻¹ Em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) contendo diferentes concentrações de AA. Figura anexada: i_p vs. [AA].

5. CONCLUSÃO

As moléculas 1,4-ditiano (1,4-dt), 4-mercaptopiridina (pyS), 5-(4-piridil)-1,3,4-oxadiazol-2-tiol (Hpyt), tionicotinamida (TNA), isotionicotinamida (iTNA) e L-cisteína (cys) foram utilizadas neste trabalho para modificar superfícies de ouro a fim de estudar a reação de transferência de elétrons (TE) das metaloproteínas citocromo c (cyt c) e mioglobina (Mb). Antes, porém, de proceder aos estudos de aplicação, as superfícies modificadas foram caracterizadas por eletroquímica, microbalança de cristal de quartzo (QCM – *Quartz Crystal Microbalance*), plasmon de superfície (SPR – *Surface Plasmon Resonance*), impedância eletroquímica e STM (Scanning Tunneling Microscopy). Adicionalmente, os valores de pKa das moléculas adsorvidas foram determinados a fim de se estimar a densidade de carga na interface. Os resultados de desorção redutiva em meio alcalino e impedância eletroquímica foram comparados com aqueles obtidos para as monocamadas de 1,4-dt e pyS os quais já foram previamente publicados.

As medidas de desorção redutiva em meio alcalino, de impedância eletroquímica e de variações de massa por QCM e SPR mostraram que a simples imersão de substratos de ouro em soluções contendo as espécies 1,4-dt, pyS, Hpyt, TNA e iTNA resulta na formação espontânea de monocamadas. Imagens de STM e medidas de impedância eletroquímica mostraram que estas espécies experimentam adsorção através do átomo de enxofre e que, mesmo após 24 h de imersão, apresentam defeitos. Estas monocamadas foram utilizadas para estudar a reação de TE das metaloproteínas cyt c e Mb sendo efetivas, apenas, em relação à primeira. Para a proteína Mb, foi utilizada uma monocamada formada com o aminoácido L-cisteína (cys) sobre ouro.

O potencial de desorção redutiva, E_{dr} , atribuído à reação de eletrodo $Au-SR + e^- \rightarrow Au + SR^-$ foi observado em -905 , -880 e -550 mV vs. Ag/AgCl/Cl⁻ para a desorção das monocamadas de iTNA, TNA e Hpyt, respectivamente. Comparativamente a resultados já reportados na literatura para as monocamadas de 1,4-dt (-880 mV) e pyS (-550 mV) sobre ouro, estes valores indicam uma interação σ para a monocamada de Hpyt e uma contribuição π adicional para iTNA e TNA. A carga relativa a reação de eletrodo de desorção permitiu o cálculo da quantidade de material adsorvido (Γ). A relação entre este parâmetro e a concentração das espécies em solução em diferentes

temperaturas indicou que o processo de adsorção poderia ser descrito pelo modelo de Langmuir permitindo, portanto, a determinação da variação da energia livre de adsorção, ΔG_{ads} , como $-35,9$, $-38,5$ e $-34,9$ kJ mol⁻¹ para as moléculas de Hpyt, TNA e iTNA respectivamente. Estes valores negativos são consistentes com processos espontâneos de quimissorção. A aplicação dos dados de Γ no modelo de adsorção de Frumkin apresentou melhor correlação quando o parâmetro de interação, g , foi fixado em $-0,45$, $-0,20$ e $-0,10$, respectivamente, para as SAMs de Hpyt, TNA e iTNA, indicando interações repulsivas entre as moléculas adjacentes.

A monocamada de pyS apresentou um comportamento atípico, as curvas de desorção e as medidas de impedância obtidos para a monocamada de pyS formada após períodos de imersão maiores que 30 min indicaram a decomposição da monocamada não possibilitando, portanto, a determinação dos parâmetros termodinâmicos e cinéticos de adsorção. Esse comportamento, na verdade, foi sugerido em 1997 por Lamp⁷⁹ e 1998 por Pemberton¹²⁶ com base em resultados de desorção redutiva, espectroscopia FTIRRAS (“*Fourier Transform Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy*”), SERS e espectroscopia de Raio-X. Artigos mais recentes, todavia, questionam essa atribuição sugerindo outras possibilidades tal como a adsorção em faces cristalinas distintas de um eletrodo policristalino. Neste trabalho, um eletrodo de ouro foi imerso em solução de Na₂S e os resultados obtidos apresentaram-se similares àqueles da monocamada de pyS sugerindo que o processo de decomposição desta está associado à clivagem oxidativa da ligação C–S com formação de uma camada de enxofre atômico e/ou oligomérico, conforme previamente sugerido^{79,126}.

A dependência dos valores de Γ e de taxa de recobrimento da superfície (θ) calculados, respectivamente, por desorção redutiva e impedância eletroquímica, com o tempo de imersão, indicaram a formação das monocamadas ocorre em uma etapa inicialmente rápida (θ de ~80% nos primeiros 10 minutos de imersão) seguida por uma outra mais lenta. A etapa mais lenta é atribuída, de acordo com a literatura, ao empacotamento e a organização das moléculas na superfície. A cobertura completa desta, entretanto, não é alcançada conforme indicado pelos dados de desorção, de impedância e de STM. A observação de maiores valores de massa observados por QCM comparativamente àqueles determinados por desorção redutiva foi atribuída à presença de

moléculas de água nas monocamadas visto que foi observada uma correlação linear entre as variações deste excesso de massa e o momento de dipolo das espécies modificadoras.

Para a determinação dos valores de pKa das moléculas adsorvidas, utilizou-se um método proposto na literatura onde a corrente faradáica relativa ao processo redox do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ é avaliada em função do pH da solução eletrolítica. Este método, todavia, não apresentou sensibilidade suficiente para se determinar múltiplos valores de pKa em moléculas que possuem mais de um sítio de protonação como TNA e iTNA. Neste trabalho, foram propostas modificações que permitiram a determinação dos valores de pKa do átomo de nitrogênio piridínico e do grupo NH_2 destas moléculas. Desta forma, propôs-se uma diminuição na concentração do íon complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em solução bem como na velocidade de varredura. A dependência da corrente faradáica com o pH da solução eletrolítica permitiu o cálculo do valor de pKa para o átomo de N piridínico como 4,2, 5,0 e 4,5 para as monocamadas de Hpyt, TNA e iTNA, respectivamente. Para os grupos NH_2 das moléculas de TNA e iTNA, os valores foram observados em 8,5 e 7,9, respectivamente.

As monocamadas formadas por 1,4-dt, pyS, Hpyt, TNA e iTNA promoveram a reação de TE do cyt c sendo que para TNA e iTNA foi observado um deslocamento positivo de 0,2 V em relação ao reportado para a forma nativa (0,05 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻). Este comportamento foi atribuído à densidade de carga positiva resultante da protonação do grupo NH_2 destas moléculas, uma vez que as medidas foram realizadas em pH 7,0 e o pka deste grupo é de ~8,0. Desta forma, a presença do grupo NH_3^+ na estrutura destas espécies pode induzir alterações conformacionais no cyt c que, por sua vez, apresenta carga líquida + 8 em pH fisiológico. Para todas as monocamadas utilizadas, a curva voltamétrica obtida em solução contendo apenas eletrólito de suporte após a varredura de potencial em solução contendo cyt c não apresentou as ondas redox características desta proteína sugerindo que esta não experimenta adsorção sobre os eletrodos modificados. De forma contrária, as medidas de QCM e SPR indicaram a formação de um filme de cyt c sobre as superfícies modificadas. As curvas voltamétricas em solução contendo cyt c obtidas após a realização dos experimentos de QCM e SPR apresentaram as ondas típicas desta metaloproteína com características difusionais. Pode-se concluir, portanto, que as moléculas adsorvidas do cyt c preservam a conformação nativa e/ou sofrem mudanças conformacionais não significativas permitindo que estas atuem como mediador da reação

de TE das moléculas em solução. Assim, pode-se considerar uma distância de aproximadamente 49 Å da superfície do eletrodo para as moléculas em solução, considerando 10 e 34 Å como as alturas, respectivamente, das moléculas sulfuradas e da de cyt c, além de 5 Å para a distância entre o átomo de Fe a parte mais externa da proteína. Dessa forma, o grupo terminal das moléculas modificadoras (Hpyt, 1,4-dt, pyS, TNA e iTNA) não deveria afetar a reação de TE do cyt c em solução. Os resultados obtidos, entretanto, indicam que não apenas a natureza química, mas também a posição são aspectos relevantes no processo de reconhecimento das moléculas de cyt c em solução. Desta forma, tem-se que a interação entre as monocamadas e o cyt c (adsorvido) contribui para a formação de um caminho preferencial através do qual se tem o processo de TE.

Para a metaloproteína Mb, por outro lado, as monocamadas em estudo não acessaram reação de TE, embora as medidas de SPR tenham indicado a adsorção desta proteína sobre os eletrodos modificados. O processo redox da Mb foi visualizado apenas quando da utilização do eletrodo modificado com o aminoácido cys. Neste caso, a relação entre corrente e velocidade de varredura indicou que a proteína encontra-se adsorvida formando o eletrodo Au/cys/Mb. As moléculas imobilizadas preservam a atividade redox do grupo heme apresentando um valor de $E_{1/2}$ de 0,086 V e coeficiente de transferência de elétrons, α , de 0,53. Uma variação de $E_{1/2}$ de 55 mV por unidade de pH foi observada indicando, dessa forma, a transferência de um elétron e um próton durante a redução da proteína. As curvas cinéticas para a adsorção da Mb sobre Au/cys indicaram que este processo é cineticamente controlado. Os dados experimentais para a adsorção da Mb apresentaram concordância com o modelo de Langmuir, a partir do qual, o valor da energia livre de adsorção foi determinado como $-49,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ indicando uma adsorção química. Determinou-se, também, que a quantidade máxima de moléculas adsorvidas a 20 °C é de $6,13 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$. Adicionalmente, um ajuste dos dados experimentais ao modelo de Frumkin indicou a presença de interações repulsivas ($g = -0,15$) entre as moléculas de Mb. A variação de massa determinada por QCM, em comparação ao valor determinado eletroquimicamente, indica a presença de grande quantidade de moléculas de água e/ou íons coadsorvidos.

O eletrodo Au/cys/Mb apresentou atividade em relação à reação de oxidação do ácido ascórbico, AA, com um decréscimo de $\sim 0,4 \text{ V}$ no sobrepotencial comparativamente

ao eletrodo de ouro limpo. Os experimentos voltamétricos e de eletrodo de disco rotatório indicaram que a reação de oxidação do AA catalisada pelo eletrodo Au/cys/Mb trata-se de um processo cineticamente controlado com uma constante de velocidade, k_f , calculada como $2,2 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Ulman, A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533.
- (2) Sellers, H.; Ulman, A.; Shnidman, Y.; Eilerss, J. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9389.
- (3) Bigelow, W. C.; Pickett, D. L.; Zisman, W. J. *Colloid Interface Sci.* **1946**, *1*, 513.
- (4) Taniguchi, I.; Toyosawa, K.; Yamaguchi, H.; Yasukouchi, K. J. *J. Electroanal. Chem.* **1982**, *140*, 187.
- (5) Nuzzo, R. G.; Allara, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4481.
- (6) Allara, D. L.; Nuzzo, R. G. *Langmuir* **1985**, *1*, 45.
- (7) Sagiv, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 92.
- (8) Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103.
- (9) Sabatani, E.; Boulakia, J. C.; Bruening, M.; Rubinstein, I. *Langmuir* **1993**, *9*, 2974.
- (10) Porter, M. D.; Bright, T. B.; Allara, D. L.; Chidsey, C. E. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3559.
- (11) Nuzzo, R. G.; Fusco, F. A.; Allara, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2358.
- (12) Finklea, H. O.; Hanshew, D. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3173.
- (13) Hong, H. G.; Park, W. *Electrochim. Acta* **2005**, *51*, 579.
- (14) Diogenes, I. C. N.; Nart, F. C.; Barreto, M.; Temperini, M. L. A.; Moreira, I. D. *J. Solid State Electrochem.* **2007**, *11*, 1585.
- (15) Sousa, J. R. d.; Diógenes, I. C. N.; Temperini, M. L. A.; Sales, F. A. M.; Pinheiro, S. d. O.; Filho, R. N. C.; Júnior, J. S. d. A.; Moreira, Í. d. S. *J. Organometallic Chem.* **2007**, 692 3691.
- (16) Sanders, W.; Vargas, R.; Anderson, M. R. *Langmuir* **2008**, *24*, 6133.
- (17) Yue, H.; Waldeck, D. H.; Schrock, K.; Kirby, D.; Knorr, K.; S., S.; Rosmus, J.; Clark, R. A. *J. phys. Chem. C* **2008**, *112*, 2514.

- (18) Pillay, J.; Agboola, B. O.; Ozoemena, K. I. *Electrochem. Commun.* **2009**, *11*, 1292.
- (19) Corio, P.; Andrade, G. F. S.; Diogenes, I. C. N.; Moreira, I. S.; Nart, F. C.; Temperini, M. L. A. *J. Electroanal. Chem.* **2002**, *520*, 40.
- (20) Millo, D.; Ranieri, A.; Gross, P.; Ly, H. K.; Borsari, M.; Hildebrandt, P.; Gijssels, J. L. Wuite; Gooijer, C.; Zwan, G. v. d. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 2861.
- (21) Williams, J. A.; Gorman, C. B. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 12804.
- (22) Schwartz, D. K. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2001**, *52*, 107.
- (23) Groenbeck, H.; Curioni, A.; Andreoni, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3839.
- (24) Vargas, M. C.; Giannozzi, P.; Selloni, A.; Scoles, G. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 9609.
- (25) Nah, J.; Ito, E.; Nakajima, K.; Kim, J.; Lee, H.; Hara, M. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 7139.
- (26) Tachibana, M.; Yoshizawa, K.; Ogawa, A.; Fujimoto, H.; Hoffmann, R. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 12727.
- (27) Widrig, C. A.; Chung, C.; Porter, M. D. *J. Electroanal. Chem.* **1991**, *310*, 335.
- (28) Poirier, G. E. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1117.
- (29) Chen, D.; Li, J. *Surface Science Reports* **2006**, *61*, 445.
- (30) Freire, R. S.; Pessoa, C. A.; Kubota, L. T. *Quim. Nova* **2003**, *26*, 381.
- (31) Lawrence, N. S.; Beckett, E. L.; Davis, J.; Compton, R. G. *Anal. Biochem.* **2002**, *303*, 1.
- (32) Treviño, J.; Calle, A.; Rodríguez-Frade, J. M.; Mellado, M.; Lechuga, L. M. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *647*, 202.
- (33) Dickerson, R. E.; Kopka, M. L.; Borders Jr., C. L.; Varnum, J.; Weinzier, J. E. *J. Mol. Biol.* **1967**, *29*, 77.
- (34) Bushnell, G. W.; Louie, G. V.; Brayer, G. D. *J. Mol. Biol.* **1990**, *214*, 585.
- (35) Lange, C.; Hunte, C. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 2800.
- (36) Roberts, V. A.; Pique, M. E. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 38051.

- (37) Hüttemann, M.; Pecina, P.; Rainbolt, M.; Sanderson, T. H.; Kagan, V. E.; Samavati, L.; Doan, J. W.; Lee, I. *Mitochondrion* **2011**, *11*, 369.
- (38) Lee, I.; Salomon, A. R.; Yu, K.; Doan, J. W.; Grossman, L. I.; Hüttemann, M. *Biochemistry* **2006**, *45*, 9121.
- (39) Yu, H.; Lee, I.; Salomon, A. R.; Yu, K.; Hüttemann, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1777*, 1066.
- (40) Brown, G. C.; Borutaite, V. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1777* 877.
- (41) Betso, S. R.; Klapper, M. H.; Anderson, L. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 8197.
- (42) Scheller, F.; Janchen, M.; Lampe, J.; Prumke, H.-J.; Blanck, J.; Palecek, E. *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *412*, 157
- (43) Kono, T.; Nakamura, S. *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.* **1958**, *22*, 399.
- (44) Yeh, P.; Kuwana, T. *Chem. Lett.* **1977**, 1145.
- (45) Eddowes, M. J.; Hill, H. A. O. *J. Chem. Soc. Chem Commun.* **1977**, *21*, 771.
- (46) Eddowes, M. J.; Hill, H. A. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4461.
- (47) Fischer, H.; Tom, G. M.; Taube, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 5512.
- (48) Albery, W. J.; Eddowes, M. J.; Hill, H. A. O.; Hillman, A. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3904.
- (49) Ferguson-Miller, S.; Brautigan, D. L.; Margoliash, E. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 149.
- (50) Bond, A. M.; Hill, H. A. O.; Komorsky-Lovric, S.; Lovric, M.; McCartby, M. E.; Psalti, I. S. M.; Walton, N. J. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 8100.
- (51) Szucs, A.; Hitchens, G. D.; Bockris, J. O. M. *Electrochim. Acta* **1992**, *37*, 403.
- (52) Hill, H. A. O.; Hunt, N. H.; Bond, A. M. *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *436*, 17.
- (53) Zhou, C.; Ye, S.; Kim, J.-H.; M. Cotton, T. M.; Yu, X.; Lu, T.; Dong, S. *J. Electroanal. Chem.* **1991**, *319* 71.
- (54) Taniguchi, I.; Ishimoto, H.; Miyagawa, K.; Iwai, M.; Nagai, H.; Hanazono, H.; Taira, K.; Kubo, A.; Nishikawa, A.; Nishiyama, K.; Dursun, Z.; J., H. G. P.; Tazaki, M. *Electrochem. Commun.* **2003**, *5* 857.

- (55) Hill, H. A. O.; Page, D. J.; Walton, N. J.; Whitford, D. *J. Electroanal. Chem.* **1985**, *187*, 315.
- (56) Collinson, M.; Bowden, E. F.; Tarlov, M. J. *Langmuir* **1992**, *8*, 1247.
- (57) Chen, X.; Ferrigno, R.; Yang, J.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **2002**, *18*, 7009.
- (58) Terrettaz, S.; Cheng, J.; Miller, C. J.; Guiles, R. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7857.
- (59) Feng, Z. Q.; Imabayashi, S.; Kakiuchi, T.; Niki, K. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1997**, *93*, 367.
- (60) Avilla, A.; Gregory, B. W.; Niki, K.; Cotton, T. M. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 2759.
- (61) Tarlov, M. J.; Bowden, E. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1847.
- (62) Song, S.; Clark, R. A.; Bowden, E. F.; Tarlov, M. J. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 6564.
- (63) Yue, H.; Waldeck, D. H.; Petrovic, J.; Clark, R. A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 5062.
- (64) Mochan, B. S.; Elliott, W. B.; Nicholls, P. *J. Bioenerg. and Biomembr.* **1973**, *4*, 329.
- (65) Eddowes, M. J.; Hill, H. A. O.; Uosaki, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 7113.
- (66) Tominaga, M.; Hayashi, K.; Taniguchi, I. *Anal. Sci.* **1992**, *8*, 829.
- (67) Theodorakis, J. L.; Garber, E. A. E.; Mccracken, J.; Peisach, J.; Schejter, A.; Margoliash, E. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1252*, 103.
- (68) Davis, K. L.; Drews, B. J.; Yue, H.; Waldeck, D. H.; Knorr, K.; Clark, R. A. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 6571.
- (69) Yamamoto, H.; Liu, H.; Waldeck, D. H. *Chem. Commun.* **2001**, 1032.
- (70) Wei, J.; Liu, H.; Dick, A. R.; Yamamoto, H.; He, Y.; Waldeck, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9591.
- (71) Gadsby, P. M. A.; Thomson, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5003.
- (72) Smith, M.; McLendon, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*.

- (73) Yuan, X.; Hawkrigde, F. M.; Chlebowski, J. F. *J. Electroanal. Chem.* **1993**, 350, 29.
- (74) Qian, W.; Zhuang, J.-H.; Wang, Y.-H.; Huang, Z.-X. *J. Electroanal. Chem.* **1998**, 447, 187.
- (75) Huang, Z.-X.; Feng, M.; Wang, Y.-H.; Cui, J.; Zou, D.-S. *J. Electroanal. Chem.* **1996**, 416 31.
- (76) Liu, Y.-C.; Cui, S.-Q.; Zhao, J.; Yang, Z.-S. *Bioelectrochemistry* **2007**, 70 416.
- (77) Pineda, T.; Sevilla, J. M.; Roman, A. J.; Blazquez, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1434, 227.
- (78) Meng, X.; Wu, X.; Wang, Z.; Cao, X.; Zhang, Z. *Bioelectrochemistry* **2001**, 54, 125.
- (79) Lamp, B. D.; Hobara, D.; Porter, M. D.; Niki, K.; Cotton, T. M. *Langmuir* **1997**, 13, 736.
- (80) Diógenes, I. C. N.; Nart, F. C.; Temperini, M. L. A.; Moreira, Í. d. S. *Inorg. Chem* **2001**, 40, 4884.
- (81) Sousa, J. R.; Batista, A. A.; Diógenes, I. C. N.; Andrade, G. F. S.; Temperini, M. L. A.; Lopes, L. G. F.; Moreira, I. S. *J. Electroanal. Chem.* **2003**, 93.
- (82) Reeder, B. J.; Svistunenko, D. A.; Cooper, C. E.; Wilson, M. T. *Antioxid. Redox Signal* **2004**, 6, 954.
- (83) Nelson, D. L.; Cox., M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*; Worth Publishers, 2000.
- (84) Shen, L.; Hu, N. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 1475.
- (85) Antonini, E.; Brunori, M. *Hemoglobin and Myoglobin in their reactions with ligands*; North-Holland Publishing Company: Amsterdam, 1971.
- (86) Otsuka, S.; Yamanaka, T. *Metalloproteins, Chemical Properties and Biological Effects*; Elsevier, 1988.
- (87) Kendrew, J. C.; Bodo, G.; Dintzis, R. G.; Parrish, R. G.; Wyckoff, H.; Phillips, D. C. *Nature* **1958**, 181, 662.

- (88) Bowden, E. F.; Hawkrigde, F. M.; Blount, P. M. In *Bioelectrochemistry* (S. Srinivasan, Y.A. Chizmadzhev, J. Bockris, B.E. Conway, and E. Yeager, eds); Plenum Press: New York, 1985.
- (89) Stargardt, J. F.; Hawkrigde, F. M.; Landrum, H. L. *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 930.
- (90) Chattopadhyay, K.; Mazumdar, S. *Bioelectrochemistry* **2000**, *53*, 17.
- (91) King, B. C.; Hawkrigde, F. M. *J. Electroanal. Chem.* **1987**, *237*, 81.
- (92) Nassar, A. E. F.; William S. Willis; Rusling, J. F. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2386.
- (93) Lu, Q.; Chen, X. X.; Wu, Y. H.; Hu, S. S. *Biophys. Chem.* **2005**, *117*, 55.
- (94) Mimica, D.; Zagal, J. H.; Bedioui, F. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *497*, 106.
- (95) Nassar, A. E. F.; Zhang, Z.; Hu, N. F.; Rusling, J. F.; Kumosinski, T. F. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 2224.
- (96) Kumar, S. A.; Wang, S. F.; Chang, Y. T.; Lu, H. C.; Yeh, H. T. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2011**, *82*, 526.
- (97) Dai, Z. H.; Xu, X. X.; Ju, H. X. *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 23.
- (98) Zhao, G.; Xu, J.-J.; Chen, H.-Y. *Anal. Biochem.* **2006**, *350*, 145.
- (99) Kumar, S. A.; Chen, S.-M. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 3042.
- (100) Guo, Z.; Chen, J.; Liu, H.; Cha, C. *Analyt. chim. acta* **2008**, *607*, 30.
- (101) Xia, P.; Liu, H.; Tian, Y. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2470.
- (102) Wu, Y. H.; Shen, Q. S.; Hu, S. S. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *558*, 179.
- (103) Wang, L. W.; Hu, N. F. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *236*, 166.
- (104) Macknight, W. J.; Ponomarenko, E. A.; Tirrell, D. A. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 781.
- (105) Okahata, Y.; Enna, G.; Taguchi, K.; Seki, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5300.
- (106) Zhang, Q.; Wei, W.; Zhao, G.-C. *Electroanalysis* **2008**, *20*, 1002.
- (107) Zong, S.; Cao, Y.; Ju, H. *Analytical Letters* **2007**, *40*, 1556.
- (108) Zhang, J.; Oyama, M. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *577*, 273.
- (109) Gan, X.; Liu, T.; Zhong, J.; Liu, X.; Li, G. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1686.

- (110) Teng, Y.; Wu, X.; Zhou, Q.; Chen, C.; Zhao, H.; Lan, M. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2009**, *142*, 267.
- (111) Feng, J.-J.; Xu, J.-J.; Chen, H.-Y. *Electrochem. Commun.* **2006**, *8*, 77.
- (112) Zhang, L.; Zhang, Q.; Li, J. *Electrochem. Commun.* **2007**, *9*, 1530.
- (113) Zhang, H.-M.; Li, N.-Q. *Bioelectrochemistry* **2000**, *53*, 97.
- (114) Cerdá, M. F.; Obal, G.; Gancheff, J. S.; Kremer, C.; Luna, A. M. C.; Braun, A. M.; Woerner, M.; Méndez, E. *Bioelectrochemistry* **2007**, *70*, 394.
- (115) Chen, S.-M.; Tseng, C.-C. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *575*, 147.
- (116) Liu, X.; Huang, Y.; Zhang, W.; Fan, G.; Fan, C.; Li, G. *Langmuir* **2004**, *21*, 375.
- (117) Hu, N.; Rusling, J. F. *Langmuir* **1997**, *13*, 4119.
- (118) Nassar, A. E. F.; Rusling, J. F.; Kumosinski, T. F. *Biophys. Chem.* **1997**, *67*, 107.
- (119) Zhang, L.; Tian, D.-B.; Zhu, J.-J. *Bioelectrochemistry* **2008**, *74*, 157.
- (120) Liu, X.; Huang, Y.; Zhang, W.; Fan, G.; Fan, C.; Li, G. *Langmuir* **2005**, *21*, 375.
- (121) Hamellin, A. *J. Electroanal. Chem.* **1988**, *255*, 281.
- (122) Trasatti, S.; Petri, O. A. *Pure & Appl. Chem.* **1991**, *63*, 711.
- (123) Walczak, M. M.; Popenoe, D. D.; Deinhammer, R. S.; Lamp, B. D.; Chung, C.; Porter, M. D. *Langmuir* **1991**, *7*, 2687.
- (124) Kawaguchi, T.; Yasuda, H.; Shimazu, K.; Porter, M. D. *Langmuir* **2000**, *16*, 9830.
- (125) Diógenes, I. C. N.; Sousa, J. R.; Carvalho, I. M. M.; Temperini, M. L. A.; Tanaka, A. A.; Moreira, I. S. *Dalton Trans.* **2003**, *11*, 2231.
- (126) Schoenfish, M. H.; Pemberton, J. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4502.
- (127) Tirado, J. D.; Acevedo, D.; Bretz, R. L.; Abruña, H. D. *Langmuir* **1994**, *10*, 1971.
- (128) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. In *Electrochemical Methods, fundamentals and Applications*; John Wiley: New York, 1980.
- (129) Acevedo, D.; Bretz, R. L.; Tirado, J. D.; Abruña, H. D. *Langmuir* **1994**, *10*, 1300.
- (130) Lorenzo, E.; Skchez, L.; Pariente, F.; Tirado, J.; Abruña, H. D. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *309*, 79.

- (131) Damos, F. S.; Mendes, R. K.; Kubota, L. T. *Quim. Nova* **2004**, 27, 970.
- (132) Sauerbrey, G. Z. *Phys.* **1959**, 155, 206.
- (133) Lima-Neto, P.; Parente, M. M. V.; Moreira, I. S.; Diógenes, I. C. N.; Mattos, O. R.; Barcia, O. E.; Ricardo, P. S.; Freire, V. N. *J. Electroanal. Chem.* **2008**, 619–620, 26.
- (134) Sousa, J. R.; Parente, M. M. V.; Diógenes, I. C. N.; Lopes, L. G. F.; Lima Neto, P.; Temperini, M. L. A.; Batista, A. A.; Moreira, I. S. *J. Electroanal. Chem.* **2004**, 566, 443.
- (135) Bandyopadhyay, K.; Vijayamohanan, K.; Shekhawat, G. S.; Gupta, R. P. *J. Electroanal. Chem.* **1998**, 447, 11.
- (136) Zhao, J. W.; Yu, H. Z.; Wang, Y. Q.; Liu, Z. F. *Chem. J. Chin. Univ.* **1998**, 19, 464.
- (137) Creager, S. E.; Clarke, J. *Langmuir* **1994**, 10, 3675.
- (138) Hu, K.; Bard, A. J. *Langmuir* **1997**, 13, 5114.
- (139) He, H. X.; Li, C. Z.; Xu, X. J.; Liu, Z. F. *Acta Phys. Chim. Sin.* **1997**, 13, 293.
- (140) Wang, J.; Frostman, L. M.; Ward, M. D. *J. Phys. Chem.* **1992**, 96, 5224.
- (141) Bagg, J.; Haber, M. D.; Gregor, H. P. *J. Colloid Interface Sci.* **1966**, 22, 138.
- (142) Cheng, Q.; Brajter-Toth, A. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 4180.
- (143) Zhao, J.; Luo, L.; Yang, X.; Wang, E.; Dong, S. *Electroanalysis* **1999**, 11, 1108.
- (144) Hale, P. S.; Maddox, L. M.; Shapter, J. G.; Gooding, J. J. *J. Chem. Edu.* **2005**, 82, 779.
- (145) Yu, H.-Z.; Xia, N.; Liu, Z.-F. *Anal. Chem.* **1999**, 71, 1354.
- (146) Jackson, M. D.; Schmidt, M. T.; Oppenheimer, N. J.; Denu, J. M. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 50985.
- (147) Dey, G. R.; Naik, D. B.; Kishore, K. *Res. Chem. Intermed.* **2003**, 29, 147.
- (148) Casasnovas, R.; Frau, J.; Ortega-Castro, J.; Salvà, A.; Donoso, J.; Muñoz, F. *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **2009**, 912, 5.

- (149) Chao, Y.; Zhou, Q.; Li, Y.; Yan, Y.; Wu, Y.; Zheng, J. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 16990.
- (150) Albert, A.; Barlin, G. B. *J. Chem. Soc. Chem Commun.* **1959**, 56, 2384.
- (151) Yu, H.-Z.; Xia, N.; Zhong-Fan Liu, Z.-F. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1354.
- (152) Bryant, M. A.; Crooks, R. M. *Langmuir* **1993**, *9*, 385.
- (153) Binning, G.; Rohrer, H.; Gerber, C. H.; Weibel, E. *Phys. Rev. Lett.* **1982**, *49*, 57.
- (154) Sarid, D.; Elings, V. *J. Vac. Sci. Tech. B* **1991**, *9*, 431.
- (155) Jin, Q.; Rodriguez, J. A.; Li, C. Z.; Darici, Y.; Tao, N. J. *Surface Science* **1999**, *425*, 101.
- (156) Wan, L.-J.; Noda, H.; Hara, Y.; Osawa, M. *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *489*, 68.
- (157) Duan, L.; Garret, S. J. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 9812.
- (158) Hietschold, M.; Lackinger, M.; Griessl, S.; Heckl, W. M.; Gopakumar, T. G.; Flynn, G. W. *Microelect. Eng.* **2005**, *82*, 207.
- (159) Hallmann, L.; Bashir, A.; Strunskus, T.; Adelung, R.; Staemmler, V.; Wöll, C.; Tuzcek, F. *Langmuir* **2008**, *24*, 5726.
- (160) Schönenberger, C.; Sondag-Huethorst, J. A. M.; Jorristma, J.; Fokkink, L. G. J. *Langmuir* **1994**, *10*, 611.
- (161) Yue, H.; Waldeck, D. H.; Petrovic, J.; Clark, R. A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 5062.
- (162) Kretschmann, E.; Kroger, E. *J. Opt. Soc. Am.* **1975**, *65*, 150.
- (163) Bourgoin, D.; Jolles, E. *J. Chim. Phys.* **1966**, *63*, 755.
- (164) Perlman, G. E.; Longworth, L. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *70*, 2719.
- (165) Spricigo, R.; Dronov, R.; Lisdat, F.; Leimkühler, S.; Scheller, F. W.; Wollenberger, U. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 225.
- (166) Grochol, J.; Dronov, R.; Lisdat, F.; Hildebrandt, P.; Murgida, D. H. *Langmuir* **2007**, *23*, 11289.
- (167) Murray, R. W.; Bard, A. J., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1984; Vol. 13.

- (168) Hager, G.; Brolo, A. G. *J. Electroanal. Chem.* **2003**, 550-551, 291.
- (169) Laviron, E. *J. Electroanal. Chem.* **1979**, 101, 19.
- (170) Zhao, G. C.; Zhang, L.; Wei, Q. W.; Z.S. Yang *Electrochem. Commun.* **2003**, 5, 825.
- (171) Liu, H. H.; Tian, Z. Q.; Lu, Z. X.; Zhang, Z. L.; Zhang, M.; D.W. Pang *Biosens. Bioelectron.* **2004**, 20, 294.
- (172) Bond, A. M. *Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry*; Marcel Dekker: New York, 1980.
- (173) Pedrosa, V. A.; Paixao, T. R. L. C.; Freire, R. S.; Bertotti, M. *J. Electroanal. Chem.* **2007**, 602, 149.
- (174) Koshiishi, I.; Imanari, T. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 216.
- (175) Bender, D. A. *Nutritional Biochemistry of the Vitamins*; 2nd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, 2003.
- (176) Farajzadeh, M. A.; Nagizadeh, S. *Journal of Analytical Chemistry* **2003**, 58, 927.
- (177) Pérez-Ruiz, T.; Martínez-Lozano, C.; Tomás, V.; Fenol, J. *The Analyst* **2001**, 126, 1436.
- (178) Yebra, M. C.; Cespón, R. M.; Moreno-Cid *Anal. Chim. Acta* **2001**, 448, 157.
- (179) Frenich, A. G.; HernándezTorres, M. E.; A. Belmonte Vega; Vidal, J. L. M.; Bolaños, P. P. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 7371.
- (180) Tang, Y.; Wu, M. *Talanta* **2005**, 65, 794.
- (181) Khoo, S. B.; Chen, F. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 5734.
- (182) Zhang, L.; Jiang, X. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, 583, 292.
- (183) Raoof, J.-B.; Ojani, R.; Rashid-Nadimi, S. *Electrochimica Acta* **2005**, 50, 4694.
- (184) Pariente, F.; Lorenzo, E.; Tobalina, F.; Abruña, H. D. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 3936.
- (185) Andrieux, C. P.; Savéant, J.-M. *J. Electroanal. Chem.* **1978**, 93, 163.
- (186) Koutecky, J.; Levich, V. G. *Zh. Fiz. Khim.* **1958**, 32, 565.

Apêndice A

Tabela A1 - Dados extraídos do gráfico teórico de Saveant.

Y = $i/nFACD^{1/2}(vF/RT)^{1/2}$		X = $\log(lk_f \Gamma / D^{1/2}(Fv/RT)^{1/2})$			
X	Y	X	Y	X	Y
-1,957	0,017	-0,68	0,153	0,597	0,436
-1,915	0,017	-0,638	0,164	0,554	0,433
-1,872	0,017	-0,595	0,173	0,682	0,445
-1,83	0,017	-0,553	0,181	0,725	0,453
-1,787	0,017	-0,51	0,19	0,767	0,458
-1,745	0,017	-0,467	0,198	0,81	0,462
-1,702	0,017	-0,425	0,207	0,852	0,467
-1,659	0,018	-0,383	0,215	0,895	0,471
-1,617	0,025	-0,341	0,231	0,938	0,475
-1,574	0,027	-0,297	0,241	0,98	0,475
-1,532	0,033	-0,255	0,249	1,023	0,48
-1,489	0,036	-0,212	0,265	1,065	0,483
-1,447	0,042	-0,169	0,274	1,108	0,483
-1,404	0,042	-0,127	0,283	1,15	0,488
-1,361	0,044	-0,084	0,291	1,193	0,492
-1,319	0,05	-0,042	0,308	1,236	0,492
-1,276	0,053	0,001	0,317	1,278	0,492
-1,234	0,058	0,043	0,334	1,321	0,492
-1,191	0,062	0,086	0,342	1,363	0,498
-1,149	0,07	0,129	0,351	1,406	0,5
-1,106	0,075	0,171	0,359	1,448	0,5
-1,063	0,079	0,214	0,369	1,491	0,5
-1,021	0,083	0,256	0,385	1,534	0,5
-0,978	0,092	0,299	0,392	1,576	0,5
-0,936	0,105	0,341	0,393	1,619	0,5
-0,893	0,108	0,384	0,402	1,661	0,5
-0,851	0,113	0,427	0,41	1,704	0,5
-0,808	0,122	0,469	0,419	1,746	0,5
-0,765	0,13	0,512	0,427	1,789	0,5
-0,723	0,139	0,554	0,433	1,832	0,5

Apêndice B

Determinação do valor de k_f (método Saveant)

n	2	elétrons
F	96485	$C mol^{-1}$
A	0,032	cm^2
D	$6,00 \times 10^{-6}$	$cm^2 s^{-1}$
C	$4,95 \times 10^{-6}$	$mol cm^3$
R	8,31	$kJ mol^{-1}$
T	295,15	K

i (μA)	v ($V s^{-1}$)	X	Y	k_f ($cm^3 mol^{-1} s^{-1}$)	k_f ($\times 10^{-4} L mol^{-1} s^{-1}$)
9,50	0,003	0,388993	0,27	27015701	2,70
11,0	0,005	0,348888	0,125	24977020	2,50
11,8	0,007	0,316309	-0,005	21908096	2,19
12,5	0,01	0,280342	-0,13	19636117	1,96
					2,40

Apêndice C

Tabela A2 – Preço dos principais reagentes utilizados

REAGENTE (Aldrich)	VALOR (R\$)	COD.	QUANT.
Citocromo c (cyt c)	1,210.00	C3131	250 mg
Isotiocotinamida (iTNA)	99	T5769	25 g
Ácido ascórbico (AA)	284	A5960	100 g
Mioglobina (Mb)	745	M1882	1 g
4-Mercaptopiridina (pyS)	154	148202	1 g
L-Cisteína (cys)	186	W326305	100 g
1,4-Ditiano (1,4-dt)	192	D217700	5 g
5-(3-Piridil)-1,3,4-oxadiazol-2-tiol (Hpyt)	388	680788	5 g