RODRIGO SOLANO PEREIRA

Estudo de sensores baseados em luminescência eletroquímica (ECL) sem marcadores

São Paulo

2017

RODRIGO SOLANO PEREIRA

Estudo de sensores baseados em luminescência eletroquímica (ECL) sem marcadores

Dissertação apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2017

RODRIGO SOLANO PEREIRA

Estudo de sensores baseados em luminescência eletroquímica (ECL) sem marcadores

Dissertação apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Engenharia Elétrica, Microeletrônica Orientador: Prof. Fernando Josepetti Fonseca

São Paulo

2017

Este exemplar foi revisado e corrigido responsabilidade única do autor e co	o em relação à versão original, sob m a anuência de seu orientador.
São Paulo, de	de
Assinatura do autor:	
Assinatura do orientador:	

Catalogação-na-publicação

Pereira, Rodrigo Estudo de sensores baseados em luminescência eletroquímica (ECL) sem marcadores / R. Pereira -- versão corr. -- São Paulo, 2017. 118 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos.

1.Luminescência eletroquímica 2.Sensores 3.Eletroquímica 4.Voltametria 5.Sol-gel I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos II.t.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Fernando Josepetti Fonseca, pela orientação e auxílio em todos os momentos do trabalho.

Ao Doutor Mauro Fransisco Pinheiro da Silva e todo o grupo de eletrônica molecular pelo apoio à realização deste trabalho.

À fundação CAPES pela concessão da bolsa de estudos para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Microeletrônica da Poli (LME/POLI) pela oportunidade e pelos meios que me foram concedidos.

RESUMO

Esta pesquisa apresenta o desenvolvimento de um sensor para fenotiazina baseados em luminescência eletroquímica (ECL) com Ru(bpy)₃ como elemento ativo. Para desenvolver este sensor, foram utilizados três materiais como eletrodo de trabalho, sendo estes materiais carbono vitreo, ouro e oxido de índio-estanho (ITO).

O eletrodo de trabalho é modificado com a deposição de um filme fino de TiO₂/nafion. O desempenho de cada material é comparado com os demais e com dados já apresentados na literatura.

A novidade apresentada por esta pesquisa é a utilização de ouro e ITO como eletrodos de trabalho para o sistema de ECL Ru(bpy)/fenotiazina. Também, esta pesquisa apresenta um estudo sobre a influência da espessura do filme sobre a intensidade do sinal de ECL.

Os estudos apresentados nesta dissertação se referem à otimização do filme de TiO₂/nafion e do eletrodo de trabalho utilizado, visando produzir o sensor mais sensível à presença de fenotiazina em uma solução fisiológica.

Sensores que utilizam o fenômeno da ECL para detecção de analitos são utilizados com frequência por apresentarem grande sensibilidade e seletividade. Sua principal aplicação se encontra em sistemas onde o analito é uma macromolécula, uma amina, caso comum para soluções fisiológicas.

Fenotiazina é uma substância interessante como alvo porque seus derivados são largamente utilizados em drogas para o tratamento de doenças psiquiátricas, como depressão e esquizofrenia. Então, se faz necessário monitorar de maneira segura a ingestão e absorção desses medicamentos pelos pacientes

Palavras chave: Luminescência eletroquímica, Sensores, Eletroquímica, Voltametria, Sol-gel.

ABSTRACT

This research presents the development of a electrochemioluminescence (ECL) based sensor aimed to detect phenothiazine in physiologic solutions. To develop this sensor, three materials were used, being glass carbon, gold and indium-tin oxide (ITO) for the working electrode of the sensor.

The working electrode was modified by the deposition of a composite thin film of TiO2/nafion in its surface. Each material then was compared in terms of the ECL signal intensity between themselves and data from previous researches.

The novelty presented in this work is the use of gold and ITO as base materials for the working electrode of the sensor. Also, as a novelty, this research presents a study of the influence of the film thickness over the ECL signal intensity.

This thesis presents studies concerning the optimization of the TiO₂/nafion film and the influence of the working electrode material, aiming to produce the best possible sensor for phenothiazine in physiological solutions.

ECL based sensor are often used today due to their great selectivity and sensibility. They are mainly used for detecting macromolecules, such as DNA and proteins in physiologic solutions.

Phenothiazine is an interesting substance because its derivatives are commonly used on pharmaceutical drugs used to treat phycological diseases, such as depression and schizophrenia.

Keywords: Electrochemiluminescence, Sensors, Electrochemistry, Voltammetry, Sol-gel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Linha do tempo das descobertas em ECL	2
Figura 2.1: Fórmula molecular do persulfato	11
Figura 2.2: : Sistema Luminol/Peróxido de oxigênio	13
Figura 2.3: Fórmula molecular do oxalato	13
Figura 2.4: Fórmula molecular da tri-n-propilamina	15
Figura 2.5: Mecanismo do sistema de ECL TPA/Ru(bpy)	16
Figura 3.1: Configuração de célula eletroquímica com 3 eletrodos	18
Figura 3.2: Circuito equivalente à célula eletroquímica	19
Figura 3.3: Diagrama de um potenciostato completo.	20
Figura 3.4: Resposta típica de um teste de LSV.	21
Figura 3.5: Resposta típica de um teste de voltametria cíclica de uma reação redox reversível	23
Figura 4.1: Etapas da síntese de um gel.	25
Figura 4.2: : Mistura de Si(OR) ₄ com água.	26
Figura 4.3: Condensação da cadeia.	26
Figura 4.4: Agrupamento das cadeias	27
Figura 4.5: Resumo do processo dip-coating de deposição	29
Figura 4.6: Método "spin-coating" para a deposição de géis.	30
Figura 5.1: Intensidade da ECL para a detecção de guanina.	33
Figura 5.2: Teste de voltametria cíclica no eletrodo de vidro-carbono com filme depositado	34
Figura 5.3: Esquema para a captura do RNA viral na superfície do eletrodo.	37
Figura 5.4: Intensidade de ECL para: (a), sem DNA alvo: (b), $8.5 \ge 10^{-8}$ de DNA alvo	39
Figura 5.5: Intensidade do sinal de ECL em função da concentração de TNT	40
Figura 5.6: Representação esquemática da fabricação do sensor.	41
Figura 5.7: Intensidade do sinal de ECL para diferentes concentrações de CEA (em ng/mL): (a) 0; (b)
0,001; (c) 0,01; (d) 0,1; (e) 0,5; (f) 2; (g) 10.	41
Figura 5.8: Princípio de funcionamento do sensor de Trombina.	43
Figura 5.9: Intensidade do sinal de ECL para diferentes concentrações de cocaina a: solução sem	
cocaína. b: 5×10^{-8} M de cocaína na solução. c: 1×10^{-7} M de cocaína na solução.	44
Figura 6.1: Eletrodo de referência de Ag/AgCl preparado no laboratório.	46
Figura 6.2: Eletrodo de carbono vitreo fabricado no laboratório.	47
Figura 6.3: Eletrodo de ouro utilizado, onde a circunferência interna é o eletrodo de trabalho e o	
semicírculo no entorno desta circunferência é o contra eletrodo	48
Figura 6.4: Eletrodo de ITO utilizado nos experimentos	48
Figura 6.5: Esquema de montagem experimental para o eletrodo de carbono vitreo.	50
Figura 6.6: Esquema de montagem experimental para o eletrodo de ouro	51
Figura 6.7: Esquema de montagem experimental para o eletrodo de ITO.	52
Figura 6.8: Saída do aparelho Ocean Optics HR2000. Gráfico da intensidade luminosa (unidades	
arbitrarias) em função do comprimento de onda.	54
Figura 6.9: Voltametria cíclica da solução de 0,5 mM de $Ru(bpy)32$ + em tampão de fosfato. ()	
Eletrodo de carbono vitreo. (-) Eletrodo de carbono vitreo modificado com filme de TiO ₂	57
Figura 7.1: Voltamograma cíclico de uma solução de 20mM de [Ru(bpy)3]Cl2 e 20mM de TPA	
utilizando um eletrodo de carbono vitreo.	62
Figura 7.2: Teste de voltametria cíclica realizado com uma solução de 50mM de $Ru(bpy)32$ + no)
eletrodo de carbono vitreo com o filme de TiO2/nafion depositado	64

Figura 7.3: Eletrodos de ouro utilizados nos experimentos	65
Figura 7.4: Eletrodos de ouro utilizados nos experimentos	66
Figura 7.5: Intensidade do sinal de ECL em função da porcentagem em volume de nafion no filme o	de
TiO ₂ utilizando um eletrodo de trabalho de carbono vitreo.	67
Figura 7.6: Intensidade do sinal de ECL em função da porcentagem em volume de nafion no filme o	de
TiO ₂ utilizando um eletrodo de trabalho de ouro	68
Figura 7.7: Intensidade do sinal de ECL em função da porcentagem em volume de nafion no filme o	de
TiO ₂ utilizando um eletrodo de trabalho de ITO.	69
Figura 7.8: Intensidade do sinal de ECL em função da composição do filme de TiO ₂ presente na	
literatura.	70
Figura 7.9: Comparativo dos melhores desempenhos dos eletrodos estudados com relação à	
composição do filme	71
Figura 7.10: Intensidade do sinal de ECL em função do número de deposições por "handcasting" de)
5µl de solução do filme de TiO ₂ /nafion para o eletrodo de carbono vitreo	72
Figura 7.11: Intensidade do sinal de ECL em função do número de deposições por "handcasting" de	•
5µl de solução do filme de TiO ₂ /nafion para o eletrodo de ouro	73
Figura 7.12: Intensidade do sinal de ECL em função do número de deposições por "handcasting" de)
5µl de solução do filme de TiO ₂ /nafion para o eletrodo de ITO.	74
Figura 7.13: Comparativo dos melhores desempenhos dos eletrodos estudados com relação à espess	ura
do filme	75
Figura 7.14: Curva de intensidade do sinal de ECL em função do pH para o eletrodo de carbono vita	reo.
	76
Figura 7.15: Curva de intensidade do sinal de ECL em função do pH para o eletrodo de ouro	77
Figura 7.16: Curva de intensidade do sinal de ECL em função do pH para o eletrodo de ITO	78
Figura 7.17: Curva de sensibilidade para o sensor de carbono vitreo	79
Figura 7.18 Curva de sensibilidade para o sensor de carbono vitreo em escala monolog	80
Figura 7.19: Curva de sensibilidade para o sensor de ouro.	81
Figura 7.20: Curva de sensibilidade para o sensor de carbono vitreo em escala monolog.	82
Figura 7.21: Curva de sensibilidade para o sensor de ouro.	83
Figura 7.22: Curva de sensibilidade para o sensor de carbono vitreo em escala monolog.	84
Figura 7.23: Curva de sensibilidade para soluções de fenotiazina utilizando o sensor com eletrodo d	e
trabalho de ouro.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Correagentes típicos para sistemas de ECL a base de $Ru(bpy)32$ +	9
Tabela 2.2: Mecanismo geral para ECL por correagentes	10
Tabela 5.1: Intensidade do sinal de ECL em função da concentração de oxalato	35
Tabela 6.1: Estrutura dos derivados de fenotiazina utilizados	61
Tabela 7.1: Resumo dos dados obtidos para os sensores com os três materiais utilizados para o	
eletrodo de trabalho	85

Lista de abreviaturas e siglas

- DBAE: 2-dibutilamino etanol
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- CV: Voltametria cíclica
- ECL: Luminescência eletroquímica
- ITO: Óxido de estanho dopado com índio
- LSV: Voltametria de varredura
- NHE: Eletrodo normal de hidrogênio
- RNA: Ácido ribonucleico
- Ru(bpy)₃: Tris-bipiridina de rutênio
- SWV: Voltametria de onda quadrada
- TiO₂: Dióxido de Titâneo
- TPA: Tri-n-propilamina

AGF	RADEC	IMENTOS	I
RES	SUMO		
ABS	TRAC	Г	
LIST		FIGURAS	IV
LIST	A DE 1	TABELAS	VI
SUM	IÁRIO		VIII
1		ορμολο	1
I			I
1.1			
1.2			
2	MEC	ANISMOS DE ECL	4
2.1	L ECL	POR ANIQUILAÇÃO IÔNICA	
2.2	2 ECL	POR CORREAGENTES	7
	2.2.1	ANIQUILAÇÃO COMPARADA A CORREAGENTES	10
	2.2.2	SISTEMAS REDUTORES-OXIDANTES	11
	PERSU	LFATO(S2082 –)	11
	2.2.2.1	I PERÓXIDO DE OXIGÊNIO	12
	2.2.3	SISTEMAS OXIDANTES-REDUTIVOS	13
	2.2.3.1	I OXALATO (C2042 –)	13
	2.2.3.2	2 TRI-N-PROPILAMINA (TPA)	15
	2.2.3.3	3 (2-(DIBUTILAMINO)ETANOL) (DBAE)	17
3	VOL	ΓΑΜΕΤRIA	18
3.1	l pot	ENCIOSTATO	
3.2	2 "LIN	IEAR SWEEP VOLTAMMETRY" (LSV)	20
3.3	B VOL	TAMETRIA CÍCLICA	21
4	SOL-	GEL	24
4.1	l VISÂ	ão geral do processo de sol-gel	25
	4.1.1	XEROGEL E AEROGEL	28
4.2	2 TÉC	NICAS PARA DEPOSIÇÃO DE SOL-GEL	29
	4.2.1	DIP-COATING	29
	4.2.2	SPIN-COATING	29

SUMÁRIO

5		٩PL	ICAÇÕES DE ECL EM SENSORES	31
	5.1	SE	NSORES SEM MARCADORES	31
	5.1	.1	DETECÇÕES ENVOLVENDO DNA	31
	5.1	.2	ECL EM AMOSTRAS DE URINA	34
	5.2	SE	NSORES COM MARCADORES	35
	5.2	.1	ENSAIOS DE DNA RAMIFICADO	35
	5.2	.2	ENSAIOS IMUNOLÓGICOS	
	5.2	.3	APTÂMEROS	42
6	ſ	٩E	rodologia	45
	6.1	M	ATERIAIS E APARELHOS UTILIZADOS	45
	6.2	PR	EPARAÇÃO DOS ELETRODOS	45
	6.2	.1	ELETRODO DE REFERÊNCIA	45
	6.2	.2	ELETRODO DE OURO	47
	6.2	.3	ELETRODO DE ITO	48
	6.3	M	ONTAGEM EXPERIMENTAL	49
	6.4	PR	EPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES	52
	6.5	PR	OCESSAMENTO DA INTENSIDADE LUMINOSA	54
	6.5	.1	LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	55
	6.6	CA	RACTERIZAÇÃO DO SISTEMA	56
	6.7	M	ODIFICAÇÃO DO ELETRODO	56
	6.8	RE	AÇÃO DE ECL COM TPA SEM MODIFICAR O ELETRODO	58
	6.8	.1	COMPOSIÇÃO DO FILME TIO₂/NAFION	58
	6.8	.2	ESPESSURA DO FILME TIO ₂ /NAFION	58
	6.8	.3	PH DA SOLUÇÃO DO ANALITO	59
	6.8	.4	CURVA DE SENSIBILIDADE PARA O TPA	59
	6.9	SIS	STEMA DE ECL RU(BPY)/FENOTIAZINAS	60
	6.10	PR	EPARAÇÃO DAS AMOSTRAS FISIOLÓGICAS PARA OS ESTUDOS	61
7	F	RES	SULTADOS E DISCUSSÃO	62
	7.1	EC	l Para a solução de RU(BPY) e TPA	62
	7.2	IN	CORPORAÇÃO DE RU(BPY) NO FILME DE TIO2	63
	7.3	SI	NAL DE ECL EM FUNÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO FILME DE TIO2	66
	7.4	SI	NAL DE ECL EM FUNÇÃO DA ESPESSURA DO FILME DE TIO2	71
	7.5	SI	NAL DE ECL EM FUNÇÃO DO PH DA SOLUÇÃO	75

10	REFERÊNCIAS	93
9	CONCLUSÃO	90
8.3	COM RELAÇÃO AO POTENCIOSTATO	89
8.2	COM RELAÇÃO AOS ELETRODOS	88
8.1	COM RELAÇÃO À ESPESSURA	
8	PROSSEGUIMENTOS NA PESQUISA	88
7.7	ESTUDO COM FENOTIAZINA	85
7.6	SENSIBILIDADE DO CONJUNTO DE ELETRODOS PARA TPA	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 LUMINESCÊNCIA ELETROQUÍMICA

Luminescência eletroquímica (ECL, do inglês *electrochemiluminescense*) é a emissão de luz por um composto devido a um estímulo eletroquímico. Normalmente, tal emissão ocorre pela reação entre um cátion e um ânion, formando átomos com elétrons em estado excitado. Esse fenômeno foi observado pela primeira vez nos anos 1920, quando a oxidação de soluções anidras de compostos de Grignard (compostos organometálicos da forma (R-Mg-X) ou (Ar-Mg-X (FELTRE, 2004)), em que R é o radical orgânico não aromático, Ar é um radical aromático e o X é um halogênio qualquer) em atmosfera aberta a algumas centenas de volts (DUFFOR, 1927) resultou em luminescência em um eletrodo ou em ambos. Em sequência, foi observada uma luminescência provocada por eletrólise, através da oxidação de luminol em uma solução alcalina, mas dessa vez com uma emissão de luz intensa o suficiente para ser utilizada em análises (HARVEY, 1929). Em 1964, Hercules iniciou um estudo mais profundo do fenômeno, variando a configuração dos eletrodos na célula eletroquímica e também variando o formato do potencial aplicado, mostrando que um pulso de potencial quadrado pode ser utilizado para produzir luminescência em meios anaeróbicos.

Foram necessários 60 anos de estudos acumulados com relação aos experimentos acima citados para que o fenômeno de ECL ganhasse relevância. Esta foi atingida quando se obteve a emissão de luz em meio aquoso, utilizando soluções com compostos de trisbipiridina de rutênio (MARTIN et al., 1983).

A alta sensibilidade das reações de ECL fez com que esse fenômeno se tornasse popular como base para o projeto de sensores biológicos, sendo que suas aplicações mais frequentes são para detecção de macromoléculas, ensaios de DNA ramificado, ensaios imunológicos, entre outros. Na Figura 1.1 é apresentada, resumidamente, a linha do tempo do desenvolvimento da ECL de 1963 a 1993.



Figura 1.1: Linha do tempo das descobertas em ECL.

Fonte: Adaptado de ZOSKI, 2007

ECL é, como a luminescência química, uma técnica que oferece elevada sensibilidade e é também muito seletiva. Ela tem a vantagem de possibilitar ao operador o controle sobre o tempo da reação, já que está sujeita à aplicação de um potencial elétrico. Também permite controle sobre a posição da emissão de luz, que ocorre na superfície do eletrodo. Esse conjunto de características, e o fato de ser uma técnica relativamente barata e de simples implementação, tornam a ECL uma técnica muito útil para a produção de sensores.

Uma série de artigos de revisão foram publicados sobre os mecanismos e aplicações de ECL (HU;XU, 2012; RICHTER, 2004, GORMAN et al., 2006). Resumidamente, as técnicas para produção de sensores baseados em ECL podem ser separadas em técnicas para sensores sem marcadores e com marcadores. Nos sensores sem marcadores, a molécula alvo é parte ativa no processo de ECL. Esse tipo de sensor é mais simples e barato, mas sofre com limitações do que ele é capaz de detectar, já que são tipos específicos de moléculas que geram sistemas de ECL. São utilizados, principalmente, para a detecção de defeitos em cadeias de ácidos nucleicos, DNA ou RNA, ou para detecção de aminas terciárias, que agem como correagentes em sistemas de ECL.

Já os sensores com marcadores, apesar de mais complexos, dispõem de um leque maior de analitos, podendo detectar toxinas, antígenos, bactérias entre outros. Isso porque

eles contam com técnicas que fixam uma molécula participante no processo de ECL no alvo do sensor, enquanto o resto do sistema se encontra na solução. As principais técnicas de marcação utilizam DNA ramificado, anticorpos e aptâmeros.

1.2 OBJETIVO

O objetivo desta pesquisa é comparar a resposta do sistema de ECL com três tipos de eletrodo de trabalho (carbono vitreo, ouro e ITO), para então produzir um sensor para fenotiazinas, grupo de substâncias presente em farmacos antidepressivos, utilizando o fenômeno de ECL.

A novidade apresentada por esta pesquisa é a utilização de ouro e ITO como materiais para o eletrodo de trabalho do sensor.

Um sensor para substâncias derivadas de fenotiazina utilizando um eletrodo de carbono vitreo está presente na literatura (CHOI et al., 2005), provando assim que essa substância pode ser detectada com sucesso por sensores de ECL. Este trabalho visa comparar os resultados apresentados pelo artigo acima citado com os resultados obtidos por eletrodos feitos com os materiais mencionados anteriormente e aprofundar o estudo para o eletrodo de carbono vitreo, analisando parâmetros que foram desprezados na publicação citada. Para tal, a metodologia de trabalho será também modificada com o objetivo de utilizar os recursos já disponíveis no Laboratório de Microeletrônica (LME) da USP.

A busca de fenotiazinas em amostras de urina foi escolhida por ser um sistema simples de ECL, onde a própria fenotiazina age como correagente para a reação de luminescência, dispensando a adição de outras substâncias ou o uso de marcadores para o alvo do sensor.

Em resumo, esta pesquisa visa estudar o fenômeno de ECL em um sistema sem marcadores, para três tipos diferentes de eletrodos e, assim, produzir um sensor que detecte a presença de fenotiazina em soluções fisiológicas.

2 MECANISMOS DE ECL

Neste capítulo são apresentados os mecanismos que produzem ECL bem como sua fundamentação teórica. Serão também apresentados sistemas clássicos de ECL para ilustrar o funcionamento do fenômeno de uma maneira geral.

2.1 ECL POR ANIQUILAÇÃO IÔNICA

Mesmo que as técnicas modernas de ECL, que serão apresentadas mais adiante neste capítulo, sejam baseadas em correagentes, as primeiras reações eletroquímicas que apresentaram emissão de luz são baseadas no processo de aniquilação iônica. Este processo envolve a formação de íons excitados como resultado de uma transferência exógena de elétrons entre espécies geradas eletroquímicamente na superfície de um eletrodo. No conjunto de equações 2.1 a 2.4 é ilustrado esse processo.

$$A - e^- \to A^{*+} \tag{2.1}$$

$$A + e^- \to A^{\bullet -} \tag{2.2}$$

$$A^{*+} + A^{*-} \to A + A^* \tag{2.3}$$

$$A^* \to A + h\nu \tag{2.4}$$

onde:

Onde A representa uma molécula ativa no processo de ECL, A^{\bullet} representa uma espécie reativa, $A^{-/+}$ representa a carga da espécie e A^{*} representa uma espécie com elétron em estado excitado.

Como mostrado nas equações de 2.1 a 2.4, após a espécie emissora (A) ser oxidada (equação 2.1) e reduzida (equação 2.2), os radicais resultantes (A^+) e (A^-) se aniquilam, formando uma espécie excitada de A (A^*) (equação 2.3). O decaimento desta espécie (equação 2.4) é o processo responsável pela emissão de luz do sistema. Reações de aniquilação também podem acontecer em sistemas mistos, onde os radicais do cátion e do ânion provem de moléculas diferentes. É importante ressaltar que a oxidação e redução ocorrem separadas espacialmente ou temporalmente.

Dependendo da energia disponível no sistema, a molécula emissora (A) pode se encontrar no maior estado excitado de energia singleto (¹A) ou em um estado de menor energia tripleto (³A). A entalpia, grandeza relacionada à energia disponível no sistema, pode ser calculada para as equações 2.1 e 2.2, segundo a equação 2.5:

$$\Delta H_{ann} = E_p\left(\frac{A}{A^{*+}}\right) - E_p\left(\frac{A}{A^{*-}}\right) - 0,16$$
(2.5)

onde:

 ΔH_{ann} (eV) é a entalpia do sistema de aniquilação iônica, E_p é o pico de potencial eletroquímico de oxidação ou redução (dado em Volts) e 0,16 é uma aproximação para a entropia do sistema (T/ Δ S) a 25°C (0,10 eV), com a adição de 0,057 eV devido à diferença entre o potencial de reversão e o pico de potencial da reação redox (Zoski, 2007).

Se a entalpia estimada ΔH_{ann} pela equação 2.5 for maior que a energia E_s necessária para produzir o estado de energia singleto a partir do estado estável, então ¹A é diretamente gerado na solução e o sistema é dito energeticamente suficiente. Nesse caso, o sistema passa por uma rota de reações para produzir o estado excitado denominada *S*-route (equação 2.6). Um exemplo típico de sistema energeticamente suficiente suficiente é o DPA^{+}/DPA^{-} (DPA = 9,10-difenilantraceno) (BEIDMAN; HERCULES, 1979).

Na Equação 2.6 é apresentada a S-route:

$$A^{*+} + A^{*-} \to A + {}^{1}A^{*} \tag{2.6}$$

Caso ΔH_{ann} seja menor que E_s, mas maior que a energia necessária para formar o estado de energia tripleto E_t, então ³A é formado inicialmente e o estado ¹A deve ser produzido via aniquilação tripleto-tripleto (TTA), como mostrado na equação 2.8. Esse tipo de sistema é chamado de energeticamente deficiente e é forçado a um conjunto de reações denominado *T-route* (equações 2.7 e 2.8). Exemplos típicos de sistemas energeticamente deficientes são aqueles envolvendo os grupos N, N, N', N'- tetrametil-p-fenilenodiamina (TMPD) e antraceno (FAULKNER et al., 1972).

$$A^{*+} + A^{*-} \to A + {}^{3}A^{*}$$
 (2.7)

$${}^{3}A^{*} + {}^{3}A^{*} \to A + {}^{1}A^{*}$$
(2.8)

Caso ΔH_{ann} seja marginal ao potencial (E_s) para formar o estado singlet*o*, a *T*route contribui para a formação do ¹A conjuntamente com a S-route. Então, diz-se que o sistema segue a *ST-route*. Um exemplo desse tipo de sistema é a aniquilação ânion-cátion do rubereno (PIGHIN; CONWAY, 1975), que foi confirmada utilizando investigações de temperatura sobre o campo magnético e o solvente.

Adicionalmente à formação de ¹A e ³A, reações de aniquilação iônica podem levar à formação direta de excímeros (dímeros excitados) e exciplexes (complexos ou moléculas excitados compostos por mais de uma espécie). Na maioria dos casos, as moléculas envolvidas na reação devem ser capazes de se alinhar de tal maneira que exista uma sobreposição significativa de orbitais π . Tal alinhamento ocorre, majoritariamente, entre hidrocarbonetos aromáticos policíclicos planares (PAHs, do inglês "Policyclic Aromatic Hydrocarbons"), como pireno e perileno (WERNER et al., 1969).

Outras reações, como os processos TTA, também podem levar à formação de excímeros e/ou exciplexes (MALOY; BARD, 1971). Essas reações seguem a *E-route*, resumida pelas equações de 2.9 a 2.11.

$$A^{*+} + A^{*-} \to A_2^* \tag{2.9}$$

$$A^{*+} + A^{*-} \to AA^{\prime*} \tag{2.10}$$

$${}^{3}A^{*} + {}^{3}A^{*} \rightarrow A_{2}^{*} \tag{2.11}$$

A emissão por excímero é, geralmente, caracterizada pela ampla emissão deslocada para o vermelho com relação à emissão singleto da molécula. Emissões por monômeros e excímeros são observadas, normalmente, no mesmo espectro (LAI; FLEMING, 2004). Excímeros podem ser formados via excitação por fótons, como observado na espectroscopia da fluorescência, fenômeno muito semelhante à ECL graças à proximidade dos radicais (CHANDROSS; LONGWORTH, 1965). Também, como demonstrado em estudos recentes (KETTER; WIGTHMAN, 2004), o radical iônico no caminho da ECL por aniquilação pode produzir estados emissores diferentes daqueles formados por excitação luminosa. O ambiente químico (por exemplo, permeabilidade do meio, concentração iônica ou concentração dos reagentes) pode ser ajustado ou escolhido de modo a ajustar o equilíbrio químico do sistema. Esses efeitos se manifestam na

emissão de energia e na eficiência do processo de ECL. Para emissões de luz visível (400 a 700 nm), E_s gira em torno de 1,8 a 3,2 eV, de acordo com a equação 2.12.

$$E_s = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \tag{2.12}$$

Isso significa que, para produzir ECL por aniquilação iônica, a janela de potencial de um sistema eletroquímico deve ser ampla o bastante (2V a 3,3V aproximadamente, segundo a equação 2.5) para que uma quantidade suficiente de íon-radicais estáveis seja formada. Como resultado, meios não aquosos, como acetonitrila com perclorato de tetran-butilamônio (TBAP) como eletrólito de suporte, são largamente utilizados nos estudos. Como será discutido na sequência, o primeiro sistema de ECL em meio aquoso, baseado em correagentes, foi relatado apenas em 1981 por Rubinstein e Bard (REF).

2.2 ECL POR CORREAGENTES

Atualmente, todas as técnicas comerciais que utilizam ECL em instrumentos analíticos são baseadas em sistemas com correagentes devido à possibilidade de se utilizar água como solvente nos sistemas e por requisitarem potenciais elétricos menores para que as reações que culminam na emissão de luz sejam disparadas. Diferentemente da ECL por aniquilação iônica, onde a produção eletrolítica dos precursores oxidados e reduzidos para a reação de ECL são necessários, em sistemas com correagentes a ECL é gerada com um potencial elétrico unidirecional no eletrodo imerso na solução contendo o agente luminescente e um correagente específico. Dependendo da polaridade do potencial aplicado, tanto o agente luminescente quanto o correagente podem ser oxidados ou reduzidos no eletrodo, formando radicais iônicos. Nesse ponto, espécies intermediárias do correagente são formadas e então decompostas, formando espécies altamente oxidantes ou redutoras. Essas formas altamente reativas reagem com o agente luminescente oxidado ou reduzido pelo eletrodo. Essa reação tem por efeito restaurar o agente luminescente, mas como uma molécula excitada, que emitem luz ao liberar ao seu estado energético normal, ao passo que as espécies reativas se tornam espécies que não podem ser reutilizadas na reação de ECL.

Resumidamente, o correagente é uma espécie química que, sob oxidação ou redução eletroquímica, sofre uma decomposição química formando uma espécie altamente oxidante ou redutiva que pode reagir com o agente luminescente oxidado ou reduzido de forma a restaurá-lo em um estado excitado.

O uso de correagentes é útil especialmente quando ou R^{*+} ou R^{*-} não é estável o bastante para o prosseguimento da reação. Ou quando o solvente no qual as espécies responsáveis pela ECL se encontram tenha uma janela de potencial estreita, de modo que R^{*+} ou R^{*-} não podem ser gerados. Também, o uso de correagentes torna a ECL possível mesmo para alguns compostos fluorescentes que tenham apenas a redução ou oxidação eletroquímica possíveis.

Quando as reações de aniquilação entre espécies reduzidas e oxidadas não são eficientes, o uso de correagentes pode produzir uma emissão de luz mais intensa. Finalmente, o efeito de supressão promovido pelo oxigênio, que é frequentemente encontrado em ECL por aniquilação iônica, pode ser eliminado em sistemas oxidantes-redutivos de ECL, de modo que a ECL pode ser produzida com eficiência sem que seja necessário controlar as condições atmosféricas as quais a solução esta exposta.

Observe que, como indicado na Equação 2.1 a 2.4, em ECL por aniquilação iônica, todas as espécies inicialmente presentes na solução são restauradas após a emissão de luz, ao passo que em sistemas a base de correagentes, como Ru(bpy)₃ $(Ru(bpy)_3^{2+})/tri-n$ -propilamina (TPA), apenas o agente luminescente pode ser regenerado e o correagente é consumido pelas reações que produzem a ECL.

Na Tabela 2.1 são listados os correagentes mais estudados para fins de ECL com Ru(bpy)₃ como elemento ativo. A produção "in situ" de correagentes intermediários, como indicado pelo seu potencial padrão de redução, são - ou agentes fortemente redutivos, para sistemas oxidantes-redutivos, - ou fortemente oxidantes, para sistemas redutores-oxidantes.

Tipo de correagente para ECL	Correagente	Principal correagente intermediário	E ⁰ (V vs eletodo normal de hidrogênio (NHE))
Oxidantes- redutivos (Miao et al., 2002; Rubinstein e Bard, 1981;Chang et. al; 1977)	Oxalato, tri-n- propilamina (TPA)	CO2 , TPrA ⁺⁺ TPrA [•]	$\frac{CO_2}{CO_2^{-:-1.9V}}$ $\frac{TPA'}{TPA}$: +1,1V
Redutores- oxidantes (Li et al., 2007; Bolleta et al., 1982; White e Bard, 1982)	Hidrazina (N_2H_4), persulfato ($S_2O_8^{2-}$), peróxido de hidrogênio	N ₂ H ₂ , N ₂ H ^{*+} , S ₂ O ^{*-} , OH ^{*-}	N_2H_2/N_2 : <-2,3V $S_2O_4^{-}/S_2O_4^{2-}$:>+2,9V OH^{-}/OH^{-} : de +1,77 a +1,91V

Tabela 2.1: Correagentes típicos para sistemas de ECL a base de $Ru(bpy)_3^{2+}$

Fonte: adaptado de SANGINARIO et al. em 2010.

Um bom correagente para ECL deve satisfazer a alguns critérios básicos como solubilidade, estabilidade, propriedades eletroquímicas, cinética, efeito de desativação, emissão de luz de fundo. Desses, o fator mais importante é o conjunto das propriedades eletroquímicas do correagente, como potencial de redução. Este deve ser facilmente oxidado ou reduzido juntamente com a espécie luminescente no eletrodo, ou próximo de sua superfície de contato, deve também passar por rápidas reações químicas para formar a espécie intermediária que seja redutor, ou oxidante o suficiente para reagir com a substância luminescente carregada e assim produzir elétrons em estado excitado.

Como os correagentes dos sistemas de ECL produzem espécies fortemente oxidantes ou redutoras, tais sistemas são classificados como oxidantes-redutivos ou redutores-oxidantes, respectivamente (RUBINSTEIN; BARD, 1981; WHITE; BARD, 1982).

Na Tabela 2.2 são apresentados quatro processos comumente envolvidos em qualquer sistema de ECL com correagentes, sendo eles: (a) reação redox no eletrodo, (b) reações químicas homogêneas, (c) formação da espécie com estado excitado, e (d) emissão de luz.

Reação	Oxidantes-redutivos ECL	Redutores-oxidantes ECL
Reação Redox no eletrodo	$\begin{array}{c} R - e^- \to R^{+} \\ C - e^- \to C^{+} \end{array}$	$R + e^{-} \rightarrow R^{*-}$ $C + e^{-} \rightarrow C^{*-}$
Reação química homogênea	$R^{\bullet} + C \rightarrow R + C^{\bullet+}$ $C^{\bullet+} \rightarrow C_{red}^{int} + R$ $\rightarrow R^{\bullet-} + P$	$R^{\bullet} + C \rightarrow R + C^{\bullet-}$ $C^{\bullet-} \rightarrow C_{ox}^{int} + R \rightarrow R^{\bullet+}$ $+ P$
Formação do estado excitado	$R^{*+} + R^{*-} \rightarrow R + R^{*}$ $R^{*+} + C_{red}^{int} \rightarrow R^{*} + P$	$R^{\bullet+} + R^{\bullet-} \rightarrow R + R^*$ $R^{\bullet-} + C_{ox}^{int} \rightarrow R^* + P$
Emissão de luz	$R^* \rightarrow R + h\nu$	$R^* \rightarrow R + h\nu$

Tabela 2.2: Mecanismo geral para ECL por correagentes.

Fonte: adaptado de BARD, 2001.

onde:

R é a espécie luminescente, C é o correagente, C^{int} é o correagente intermediário (com "red" subscrito para o agente redutivo e "ox" para o agente oxidante) e P é o subproduto associado à reação.

Dependendo da natureza do eletrodo ativo e do potencial de redox do correagente, são possíveis tanto reações redox homogêneas quanto heterogêneas do correagente. A formação da espécie com estado excitado também tem duas rotas possíveis: a clássica de aniquilação iônica e a reação envolvendo correagentes intermediários.

2.2.1 ANIQUILAÇÃO COMPARADA A CORREAGENTES

Sistemas de correagentes para ECL oferecem diversas vantagens quando comparados com ECL por aniquilação iônica, sendo que as principais são listadas a seguir.

- O uso de correagentes torna possível a ECL para compostos fluorescentes com apenas redução ou oxidação reversível eletroquimicamente.
- O uso de correagentes faz com que novos solventes possam ser utilizados, já que não necessita que potenciais elétricos muito elevados sejam aplicados à solução. Isso torna possível observar a ECL em meio aquoso.
- ECL com correagentes é mais eficiente, produzindo uma emissão mais intensa de luz.

Essas vantagens são o motivo pelo qual, atualmente, sistemas de correagentes são empregados comercialmente e largamente estudados (DOWNEY; NIEMAN, 1992), em detrimento de sistemas que dependem de aniquilação iônica.

2.2.2 SISTEMAS REDUTORES-OXIDANTES

PERSULFATO $(S_2 O_8^{2-})$

Figura 2.1: Fórmula molecular do persulfato



Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Persulfato_de_am%C3%B4nia

Esse é o primeiro exemplo de um sistema de correagente redutivo-oxidante para ECL relatado na literatura (BOLLETA et al., 1982; WHITE; BARD, 1982). Como $Ru(bpy)_3^{2+}$ é instável em soluções aquosas e $(NH_4)_2S_2O_8$ é pouco solúvel em soluções de acetomila (MeCN), a solução de base é preparada utilizando $MeCN/H_2O$ como solvente para que se produza uma ECL com emissão intensa (WHITE; BARD, 1982).

Nas equações de 2.13 a 2.18 é sintetizado o processo pelo qual o $Ru(bpy)_3^{2+}$ é produzido quando se utiliza o $S_2O_8^{2-}$ como correagente, que forma o intermediário $S_2O_4^{2-}$ (espécie fortemente oxidante), produzido durante a redução do $S_2O_8^{2-}$ (E⁰> 3.15 V vs. eletrodo saturado de calomelano (*saturated calomel electrode* SCE)) (Memming, 1969).

$$S_2 O_8^{2-} + 2e^- \to 2S \quad O_4^{2-}$$
 (2.13)

$$S_2 O_8^{2-} + e^- \to S \quad O_4^- + S \quad O_4^{2-}$$
 (2.14)

$$SO_4^- + e^- \to SO_4^{2-}$$
 (2.15)

$$Ru(bpy)_{3}^{2+} + e^{-} \to Ru(bpy)_{3}^{+}$$
 (2.16)

$$Ru(bpy)_{3}^{+} + S \quad O_{4}^{*-} \to Ru(bpy)_{3}^{2+} + S \quad O_{4}^{2-}$$
(2.17)

$$Ru(bpy)_{3}^{+} + S \quad O_{4}^{-} \to Ru(bpy)_{3}^{2+*} + S \quad O_{4}^{3-}$$
(2.18)

Acredita-se que o íon persulfato é tanto um correagente para o $Ru(bpy)_3^{2+}$ quanto um extintor eficiente para o estado excitado $Ru(bpy)_3^{2+*}$ (Miao et. al., 2002). Como resultado, a intensidade da ECL desse sistema é função da concentração de $S_2O_8^{2-}$. Para 1mM de $Ru(bpy)_3^{2+}$,a intensidade máxima da ECL foi obtida para a concentração de 15-20 nM de $S_2O_8^{2-}$ (WHITE; BARD, 1982).

2.2.2.1 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

A reação de ECl do luminol (*5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione*) com peróxido de hidrogênio em meios alcalinos é semelhante à luminescência química do luminol disparada por oxidação química (BOWIE et al., 1996). O mecanismo mais aceito para esse sistema é apresentado na Figura 2.2. Em soluções alcalinas, luminol se deteriora para formar um ânion que é oxidado eletroquimicamente para produzir diazaquinona. Essa espécie é então oxidada por peróxido ou superóxido de hidrogênio para produzir um estado excitado no 3-aminoftalato que acaba por emitir luz em um comprimento de onda de aproximadamente 425 nm.



Figura 2.2: : Sistema Luminol/Peróxido de oxigênio.

Fonte: adaptado de RICHTER, 2004.

2.2.3 SISTEMAS OXIDANTES-REDUTIVOS

2.2.3.1 OXALATO $(C_2 O_4^{2-})$

Figura 2.3: Fórmula molecular do oxalato



Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Oxalato_de_c%C3%A1lcio

Esse foi o primeiro sistema de ECl com emprego de correagentes relatado por Chang e colaboradores em 1977 (CHANG et al., 1977), e é um exemplo clássico de ECL em sistema "oxidativo-redutivo". O mecanismo proposto para esse sistema se encontra nas Equações de 2.19 a 2.25 (RUBINSTEIN; BARD, 1981).

$$Ru(bpy)_{3}^{2+} - e^{-} \to Ru(bpy)_{3}^{3+}$$
 (2.19)

$$Ru(bpy)_{3}^{3+} + C_2 O_4^{2-} \to Ru(bpy)_{3}^{2+} + C_2 O_4^{*-}$$
(2.20)

$$C_2 O_4^{*-} \to C O_2^{*-} + C O_2$$
 (2.21)

$$Ru(bpy)_{3}^{3+} + CO_{2}^{*-} \to Ru(bpy)_{3}^{2+*} + CO_{2}$$
(2.22)

$$Ru(bpy)_{3}^{2+} + CO_{2}^{*-} \to Ru(bpy)_{3}^{+} + CO_{2}$$
(2.23)

$$Ru(bpy)_{3}^{3+} + Ru(bpy)_{3}^{+} \to Ru(bpy)_{3}^{2+} + Ru(bpy)_{3}^{2+*}$$
(2.24)

$$Ru(bpy)_{3}^{2+*} \to Ru(bpy)_{3}^{2+} + hv$$
 (2.25)

Primeiramente, o $Ru(bpy)_3^{2+}$ é oxidado no eletrodo formando o cátion $Ru(bpy)_3^{3+}$. Esse cátion é então capaz de oxidar o oxalato $(C_2O_4^{2-})$ no plano de difusão próximo à superfície do eletrodo para formar o $C_2O_4^{*-}$. Esse se quebra para formar o CO_2^{*-} , altamente redutivo (E⁰ = -1.9V vs NHE), e dióxido de carbono. O intermediário redutor reduz o $Ru(bpy)_3^{3+}$ de volta ao estado inicial, com um elétron em estado excitado, ou então reduz o $Ru(bpy)_3^{2+}$ para formar $Ru(bpy)_3^{+}$ que reagem com $Ru(bpy)_3^{3+}$ para formar o estado excitado $Ru(bpy)_3^{2+*}$, que emite luz com comprimento de onda λ_{max} aproximadamente igual a 620 nm.

Em soluções aquosas, a intensidade da ECL do sistema $Ru(bpy)_3^{2+}$ /oxalato apresenta um máximo para soluções com pH igual a 6 (RUBINSTEIN; BARD, 1981), também com intensidade praticamente constante para pH de 4 a 8 (DOWNEY e NIEMAN, 1992).

2.2.3.2 TRI-N-PROPILAMINA (TPA)

Figura 2.4: Fórmula molecular da tri-n-propilamina



Fonte: https://es.wikipedia.org/wiki/Tripropilamina

Em 1987, Noffsinger e Danielson foram os primeiros a estudar a quimioluminescência do $Ru(bpy)_3^{2+}$ com aminas alifáticas. Em 1987, Leland e Powell foram os primeiros a estudar e relatar a ECL do $Ru(bpy)_3^{2+}$ utilizando o TPA como correagente (LELAND; POWELL., 1990). Em 1991, Blackburn desenvolveu uma técnica para ensaios de DNA ramificado e ensaios imunológicos utilizando esse sistema de ECL, onde o $Ru(bpy)_3^{2+}$ assume a função de marcador para as proteínas ou bases nitrogenadas (BLACKBURN et al., 1991). Marcadores de $Ru(bpy)_3^{2+}$ que se combinam com TPA também têm sido utilizados para a detecção de DNA derivado de bactérias.

Devido a sua extensa aplicabilidade, o mecanismo do sistema $Ru(bpy)_3^{2+}$ /TPA para ECL tem sido estudado em detalhe por diversos grupos. O mecanismo simplificado de funcionamento do sistema $Ru(bpy)_3^{2+}$ /TPA é apresentado na Figura 2.5.



Figura 2.5: Mecanismo do sistema de ECL TPA/Ru(bpy).

Onde (A) representa a reação principal e (B) e (C) apresentam as reações laterais do sistema. Fonte: Adaptado de HU; Xu, 2012.

As Equações de 2.26 a 2.31 apresentam as equações presentes na Figura 2.2 (primeira via) de maneira direta.

$$Ru(bpy)_{3}^{2+} - e^{-} \to Ru(bpy)_{3}^{3+}$$
 (2.26)

$$TPrAH^+ - H^+ \to TPrA \tag{2.27}$$

$$TPrA - e^{-} \to TPrA^{+} \tag{2.28}$$

$$TPrA^{*+} - H^+ \to TPrA^* \tag{2.29}$$

 $Ru(bpy)_{3}^{3+} + TPrA^{\bullet} \to Ru(bpy)_{3}^{2+*} + P1$ (2.30)

$$Ru(bpy)_{3}^{2+*} \to Ru(bpy)_{3}^{2+} + h\nu$$
 (2.31)

2.2.3.3 (2-(DIBUTILAMINO)ETANOL) (DBAE)

O DBAE foi introduzido como correagente nos processos de ECL envolvendo o $Ru(bpy)_3^{2+}$ em 2007 (LIU et. al., 2007) como uma alternativa ao TPA, pois este é muito volátil e tóxico.

A intensidade da ECL do sistema $Ru(bpy)_3^{2+}/DBAE$ em eletrodos de ouro e platina foi superior à intensidade do sistema que utiliza TPA como correagente. Esse novo sistema também apresentou melhor sensibilidade. Além disso, é mais simples preparar soluções de DBAE graças a sua melhor solubilidade em água.

A melhora no desempenho na emissão de luz no sistema a base de DBAE é creditada ao efeito catalítico do grupo hidroxila no sentido de aumentar a velocidade de oxidação do DBAE no eletrodo.

Devido as suas vantagens com relação ao TPA, o DBAE tem sido utilizado para o desenvolvimento de vários métodos de ECL para determinação quantitativa de várias substâncias, como a dopamina. O mecanismo simplificado desse sistema é apresentado nas Equações de 2.32 a 2.36.

$$Ru(bpy)_{3}^{3+} + DBAE \rightarrow Ru(bpy)_{3}^{2+} + DBAE^{\cdot+}$$

$$(2.32)$$

$$DBAE^{+} - H^{+} \to R_2 NR^{-} \tag{2.33}$$

$$R_2 NR^{\bullet} + Ru(bpy)_3^{3+} \to Ru(bpy)_3^{2+*} + P$$
(2.34)

$$R_2 NR^{\bullet} + Ru(bpy)_3^{2+} \to Ru(bpy)_3^{+} + P$$
 (2.35)

$$R_2 N R^{*+} + Ru(bpy)_3^{**} \to Ru(bpy)_3^{2**} + P$$
(2.36)

3 VOLTAMETRIA

Neste capítulo serão apresentadas técnicas básicas de voltametria e uma breve explicação sobre a instrumentação utilizada para aplicar os estímulos elétricos e coletar os dados referentes à corrente presente na célula eletroquímica. A teoria aqui presente teve por referência as publicações "Electrochemical Handbook", publicado por Zoski em 2007, "Electrochemical Methods Fundamentals and Applications", capítulo 6, publicado por Bard em 2001, e "Carbon Nanotube Electrode for Electrochemiluminescence Biosensors", publicado por Sanginario et al. em 2010.

Voltametria é uma categoria de métodos para o estudo de cinética eletroquímica utilizados em química analítica e diversos processos industriais. Experimentos dessa categoria estudam a dinâmica da meia reação de um eletrólito medindo a corrente gerada devido à aplicação de um potencial elétrico no eletrodo de trabalho. Normalmente, é utilizada uma configuração de três eletrodos (eletrodo de trabalho (1), eletrodo de referência (3) e contra eletrodo (2)) como mostra a Figura 3.1, para a análise da célula eletroquímica. Essa configuração permite que o potencial seja aplicado de maneira precisa, bem como também facilita a medição precisa da corrente na célula.





Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Voltamperometria

3.1 POTENCIOSTATO

A instrumentação eletroquímica típica consiste de um potenciostato, para controlar o potencial aplicado nos eletrodos, ligado a um gerador de funções, que é utilizado para produzir o sinal desejado, um sistema para armazenar os dados referentes à corrente (i), o potencial da célula (E) e o tempo do ensaio (t).

Esse conjunto de aparelhos é ligado à célula eletroquímica com três eletrodos, como descrito (figura 3.1) anteriormente.

De um ponto de vista eletrônico, uma célula eletroquímica pode ser considerada como uma rede de impedâncias como mostrado no circuito da Figura 3.2 (a), onde Z_c e Z_{wk} representam as impedâncias da interface eletrodo/eletrólito do contra eletrodo e do eletrodo de trabalho, respectivamente. A resistência da solução é dividida em duas parcelas, R_Ω e R_u, que dependem da posição do contato entre o eletrodo de referência e a solução. Essa representação pode então ser simplificada para o circuito apresentado na Figura 3.2(b).

Figura 3.2: Circuito equivalente à célula eletroquímica.



Fonte: Adaptado de BARD, 2001.

Essa célula é ligada ao potenciostado, figura 3.3, sendo este um circuito analógico constituído, em sua maioria, por uma rede de amplificadores operacionais.

O circuito da Figura 3.3 impõe o potencial desejado (Ei) no contra eletrodo. Um seguidor de tensão (VF) é colocado no loop de feedback de maneira que o eletrodo de referência não seja carregado pela corrente alimentada na entrada. O eletrodo de trabalho fornece corrente ao seguidor de tensão, que fornece uma tensão proporcional a essa corrente de entrada. Uma maior potência pode ser atingida ao se inserir um amplificador de ganho (B), na entrada da malha.

Como a rede é não-inversora, ela pode ser considerada como uma extensão do amplificador operacional inicial, tendo o ganho de "loop" aberto como uma combinação do ganho da rede e do amplificador de ganho $A = A_{oa}A_{b}$.





Fonte: Adaptado de BARD, 2001.

3.2 "LINEAR SWEEP VOLTAMMETRY" (LSV)

A voltametria de varredura (LSV, do inglês *linear sweep voltammetry*) é um teste geral aplicável a qualquer sistema eletroquímico. Neste teste, o potencial aplicado no eletrodo de trabalho é incrementado linearmente com o passar do tempo, sendo o teste de voltametria mais simples a ser feito. O potencial inicial aplicado no eletrodo de trabalho (E_i) é aumentado a uma taxa definida até atingir o potencial final desejado (E_f). A magnitude da taxa de varredura pode variar de 1mv/s até milhares de Volts por segundo.

Esse tipo de estudo é útil na identificação de espécies desconhecidas e na determinação da concentração da solução presente na célula eletroquímica. Para determinar a concentração da espécie eletroquímicamente ativa na solução, utiliza-se a magnitude da corrente que transita pela célula eletroquímica.

Apesar de simples e de fornecer menos informações do que análises mais complexas, como a voltametria cíclica, esse teste pode ser aplicado em sistemas não
reversíveis, situações em que a voltametria cíclica não forneceria dados adequados para o sistema.

Na Figura 3.4 é apresentado um resultado típico do teste de LSV para uma solução de antraceno. Se o potencial inicial do teste é menor que o potencial de redução do antraceno (E^0), não existe fluxo substancial de corrente no sistema. A medida que o potencial aplicado se aproxima de E^0 , reações de redução começam a ocorrer na superfície do eletrodo e se pode medir uma corrente elétrica. Com o aumento contínuo do potencial aplicado, a concentração de antraceno na superfície do eletrodo começa a diminuir. Isso gera um fluxo via difusão de antraceno da solução em direção à superfície do eletrodo e também diminui o módulo da corrente medida, já que existem menos portadores de carga disponíveis.

Figura 3.4: Resposta típica de um teste de LSV.



(a) Estímulo elétrico;
 (b) Voltamograma da célula;
 (c) Concentração das espécies em função da posição.

Fonte: Adaptado de BARD, 2001.

3.3 VOLTAMETRIA CÍCLICA

Voltametria cíclica (CV, do inglês *cyclic voltammetry*) é um ensaio versátil para o estudo da interação entre eletrodo e espécies eletroquimicamente ativas. O teste consiste na medição da corrente, que será limitada, entre outros fatores, pela difusão dos portadores de carga presentes no eletrólito, gerada pela aplicação de um potencial triangular, como descrito nas equações 3.1 e 3.2, no eletrodo de trabalho.

$$(0 < t \le \lambda): \quad E = E_i - \nu t \tag{3.1}$$

$$t > \lambda : \qquad E = E_i - v\lambda + vt \tag{3.2}$$

em que λ é o instante no qual ocorre a inversão da derivada do potencial, v é a taxa de varredura e Ei é o potencial inicial do teste.

Na Figura 3.5 é ilustrado o resultado esperado em um teste de CV para uma reação redox reversível durante apenas um ciclo de estímulo. Inicialmente, apenas a espécie oxidada (O) está presente no eletrólito. Assim, o ponto de partida para a onda de tensão deve ser um valor pequeno o bastante para que nenhuma molécula passe por uma reação de redução, e aumente progressivamente.

A medida que o potencial aplicado no eletrodo se aproxima do potencial de redução da espécie E^0 , sendo E^0 o potencial padrão entre eletrodo e eletrólito determinado pela equação de Nernst (equação 3.3), começa-se a verificar um aumento na corrente que circula entre o cátodo e o eletrodo de referência, apresentando um pico próximo ao potencial E^0 . Quando o potencial elétrico começa a entrar na fase decrescente da onda triangular, as moléculas reduzidas (R) são gradualmente oxidadas, retornando ao estado (O), o que resulta em uma corrente anódica, inversão do sentido da corrente, que tem comportamento simétrico ao da corrente catódica observada durante o aumento do potencial aplicado.

$$E_{cell} = E_{cell}^0 - \frac{RT}{zF} lnQ_r$$
(3.3)

Em que E_{cell} é o potencial da célula eletroquímica na temperatura de interesse, E^{0}_{cell} é o potencial padrão da célula, R é a constante universal dos gases, T é a temperatura do sistema em kelvin, z é o número de mols de elétrons transferidos na reação, F é a constante de Faraday e Q_r é o quociente da reação.

Figura 3.5: Resposta típica de um teste de voltametria cíclica de uma reação redox reversível.



Fonte: Adaptado de SANGINARIO et. al., 2010.

Os picos de corrente presentes no voltamograma, nome dado aos gráficos V*x*I gerados por estudos de voltametria, são causados pela formação de um plano de difusão próximo à superfície do eletrodo.

Nos testes de voltametria cíclica, os dois parâmetros de interesse a serem retirados do gráfico são: *i*) razão entre o pico de corrente anódica e catódica I_{pa}/I_{pc} , parâmetro que informa sobre a reversibilidade do sistema; *ii*) a separação entre os picos de potencial E_{pa} - E_{pc} , que informa sobre o número de elétrons transferidos durante o processo eletroquímico segundo a equação 3.4, onde *n* é o número de elétrons transferidos.

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = \frac{0.059}{n} \tag{3.4}$$

4 SOL-GEL

Este capítulo visa introduzir os conceitos básicos a respeito do processo de Sol-Gel para a produção de óxidos. Esse processo é relevante para este trabalho porque o filme cerâmico, que modificará o eletrodo para a emissão do sinal de ECL, será depositado via solgel. Toma-se como principais referências o artigo de revisão publicado por Hench e West em 1990 e a dissertação apresentada por Luciana de Oliveira Melo em 2001

O processo de sol-gel é uma técnica para a fabricação de cerâmicas a partir de suspensões coloidais. Neste processo, a componente sol, de "solução", evolui gradualmente para formar uma rede que contém tanto uma fase líquida quanto uma fase sólida, Gel. Normalmente, os precursores são alcóxidos ou cloretos de metais. Esses precursores passam por reações de hidrólise e policondensação para formar um coloide. A estrutura básica da fase sólida pode variar desde pequenos grupos discretos formando uma solução coloidal até redes completas que lembram polímeros (KLEIN; GRAVEY, 1980; BRINKER, 1982).

Apesar de neste trabalho utilizarmos sol-gel de dióxido de titânio, o mecanismo básico da formação de sol-geis será apresentado utilizando o silício como precursor. Essa escolha foi feita porque o sol-gel de silício está mais presente na literatura e o processo para a obtenção deste sol-gel pode ser utilizado para se compreender o processo pelo qual passa o dióxido de titânio.

Três métodos são utilizados com maior frequência para a produção de sol-gel, sendo eles: (1) gelatinação de uma suspensão coloidal; (2) hidrólise e policondensação de precursores metálicos seguida de secagem do gel a temperatura e pressão críticas, gerando um aerogel; (3) hidrólise e policondensação do precursor metálico seguida de secagem do gel a temperatura ambiente, gerando um xerogel.

Mesmo quando seco, o gel ainda contém grandes concentrações de hidroxilas absorvidas na superfície dos poros. Para remover as hidroxilas absorvidas, o gel é aquecido a temperaturas entre 500 e 800°C, gerando assim um gel estável.

O aquecimento do gel a altas temperaturas, superiores a 1000°C, reduz substancialmente o número de poros e sua conectividade, aumentando a densidade do gel, que assume um estado vítreo.

4.1 VISÃO GERAL DO PROCESSO DE SOL-GEL

A produção de sol-géis segue, independentemente do método empregado, os mesmos passos básicos, sintetizados na Figura 4.1.



Figura 4.1: Etapas da síntese de um gel.

Fonte: Adaptado de HENCH; WEST, 1990.

Pode-se observar na figura que o gel começa a assumir a sua estrutura na fase de gelatinação. Então, o tratamento térmico subsequente irá influenciar na densidade da cadeia e, portanto, na sua aplicação. Os passos necessários para a síntese do gel de tetrametil ortosilicato (TMOS) são descritos brevemente a seguir.

Passo 1: Mistura. No método 1, uma suspensão coloidal é formada através da mistura das partículas coloidais com água em um pH que previna a precipitação. Já nos métodos 2 e 3, um precursor, Si(OR)₄ (R sendo CH₃, C₂H₅ ou C₃H₇), é misturado com água. O silicato hidratado então sofre uma reação de condensação que termina por formar uma cadeia de sílica

semelhante a uma cadeia polimérica, produzindo água e álcoois como subprodutos. Nas Figuras 4.2 a 4.4 são ilustradas as reações químicas descritas nesse passo. As reações de hidrólise e poli condensação se iniciam em diversos locais da suspensão durante a agitação da mesma. Quando ligações Si-O-Si suficientes são formadas, temos o estado sol. O tamanho das partículas formadas nessa reação (densidade da suspensão) depende, primordialmente do pH e da razão entre as concentrações de água e do metal precursor.

Figura 4.2: : Mistura de Si(OR)₄ com água.

$$H_{3}CO - Si - OCH_{3} + 4(H_{2}O) + H - Si - OH + 4(CH_{3}OH)$$

$$H_{3}CO - Si - OCH_{3} + 4(H_{2}O) + H - Si - OH + 4(CH_{3}OH)$$

$$H_{3}CO - Si - OCH_{3} + 4(H_{2}O) + Si(OH)_{4} + 4(CH_{3}OH)$$

Fonte: Adaptado de HENCH; WEST, 1990.

Figura 4.3: Condensação da cadeia.



Fonte: Adaptado de HENCH; WEST, 1990.



Fonte: Adaptado de HENCH; WEST, 1990.

- Passo 2: Moldagem. Graças à baixa viscosidade do sol, ele pode ser moldado para atingir o formato final desejado. É nessa etapa que técnicas de deposição como *dip-coating* e *spin-coating*, que serão descritas a seguir, são aplicadas para deposição do gel nos substratos de interesse.
- Passo 3: Gelatinação. Com o tempo, os coloides de sílica fazem ligações entre si, formando uma rede tridimensional similar a uma cadeia polimérica, formando o estado gel. É nessa etapa que a estrutura do gel ganha forma, podendo-se identificar a cadeia do precursor.
- Passo 4: Maturação. A maturação do gel consiste em deixar o material descansar imerso em líquido por um período que pode variar de horas a dias. Durante esse tempo, a condensação da cadeia continua, junto com a precipitação da cadeia gel, o que aumenta a espessura da cerâmica final e diminui sua porosidade, aumentando a resistência mecânica do gel.
- •Passo 5: Secagem. Nessa fase, o líquido é removido da cadeia de sílica. A tensão de capilaridade nos poros pode fazer com que o gel entre em colapso durante essa fase, tornando crucial o controle adequado desse processo. No método 1, são adicionados reagentes de superfície para eliminar micro poros, fortalecendo a estrutura gel. No método 2, é utilizada evaporação hipercrítica para evitar a formação de interfaces entre sólido e líquido. No método 3, o controle é obtido na fase de condensação, controlando assim a

dimensão dos poros e prevenindo que a estrutura a ser seca seja frágil demais.

- Passo 6: Estabilização química ou desidratação. Consiste na remoção das ligações Si-OH da superfície da cerâmica, resultando em uma estrutura estável.
- Passo 7: "Densificação". Nessa fase, o gel é aquecido para que o número de poros seja reduzido. Se os poros são completamente removidos, a estrutura final se assemelha a quartzo ou sílica fundida.

4.1.1 XEROGEL E AEROGEL

Produzido a partir da secagem da solução a temperatura ambiente. Devido à pressão capilar entre os poros do gel e a fase liquida da solução, a secagem do gel faz com que ele sofra um processo de encolhimento, aumentando a densidade da cerâmica final.

Esse tipo de gel é caracterizado, então, por uma grande superfície e poros muito pequenos, devido à pressão capilar, fazendo com que os xerogéis sejam transparentes ou translúcidos.

Já os aerogéis, por serem secos sob pressão e temperaturas críticas, não sofrem os mesmos efeitos da pressão capilar. Assim, o gel não sofre um processo de encolhimento tão acentuado quanto o observado nos xerogéis e também apresentam poros maiores, o que torna a estrutura mais opaca quando comparada com os xerogéis.

A estrutura da fase gel é dependente das condições presentes durante o processo de hidrólise. Por exemplo, suspensões com características de base, altos pHs, produzem géis granulares e que retém menos materiais orgânicos. Já soluções ácidas conduzem a formação de géis mais finos e densos. Sendo assim, a preparação da solução para a hidrólise deve ser feita com cuidado e dependerá da aplicação final do gel em questão.

4.2 TÉCNICAS PARA DEPOSIÇÃO DE SOL-GEL

4.2.1 DIP-COATING

A técnica de *dip-coating* consiste em imergir verticalmente o substrato dentro da suspensão em fase sol e então emergi-lo a velocidade constante. Durante a remoção, parte da solução adere à superfície do substrato e, quando exposta à atmosfera, passa a sofrer a reação de hidrólise, formando um filme de gel na superfície do substrato. A Figura 4.5 ilustra o processo de *dip-coating*.



Figura 4.5: Resumo do processo dip-coating de deposição.

Fonte: Adaptado de SENTANIN, 2012.

Além de utilizar a velocidade de subida do substrato para controlar a espessura do filme, essa técnica pode ser aplicada várias vezes em sequência, possibilitando a formação de géis densos e espessos, ou mesmo géis compostos, vindos de diferentes soluções precursoras.

4.2.2 SPIN-COATING

O processo de *spin-coating* segue o mesmo princípio que o processo de *dip-coating*. Entretanto, ao invés de retirar o substrato da solução precursora, a solução precursora é depositada no substrato e este então é colocado em um *spinner* (ou seja, um centrifugador). A rotação do substrato espalha rapidamente a solução precursora por toda a sua área, eliminando também o excesso da mesma. Então o conjunto é retirado da máquina e passa por um período de repouso, para que as demais etapas químicas do processo do sol-gel se realizem. Nesse caso, a espessura do filme depositado é definida pela velocidade de rotação, pelo tempo de em que o substrato fica submetido ao processo de centrifugação e pela concentração do sol. Na Figura 4.6 é ilustrado o processo descrito.

Figura 4.6: Método "spin-coating" para a deposição de géis.



Fonte: Adaptado de SENTANIN, 2012.

Esse método possibilita a deposição de filmes mais finos do que o *dip-coating*, mas eles também são menos densos. O método de deposição a ser escolhido deve levar em consideração a aplicação final do gel.

5 APLICAÇÕES DE ECL EM SENSORES

Neste capítulo, serão apresentadas aplicações de ECL para a fabricação de sensores de moléculas biológicas, como ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido oxirribonucleico (RNA), aminas, anticorpos. A grande maioria das técnicas são baseadas em correagentes, já que estes permitem que a ECL ocorra em soluções aquosas, e utilizam $Ru(bpy)_3^{2+}$ ou luminol como agentes luminescentes.

As diferenças entre as aplicações das técnicas de ECL se encontram nos eletrodos utilizados no sistema, no correagente que será empregado, que deve ser escolhido em função da molécula que se deseja detectar, e se é necessário que o agente luminescente seja utilizado como marcador da molécula de interesse ou não. Sendo assim, o capítulo será dividido em duas sessões: a primeira tratando dos casos nos quais não é necessário que a molécula de interesse seja marcada com o agente luminescente (o que oferece um sistema mais simples de se construir), e a segunda tratando de sistemas que necessitem de tal marcação.

Pretende-se apresentar algumas das técnicas mais recentes em termos de analitos, mas também serão abordados alguns trabalhos clássicos que são importantes para o desenvolvimento de técnicas mais novas ou que sua aplicação ainda seja relevante para problemas recentes.

5.1 SENSORES SEM MARCADORES

Nessa seção, são apresentados sensores baseados em ECL onde o analito é o correagente da reação de luminescência. Apesar de limitar as substâncias que podem ser detectadas, esses são sistemas mais simples que dispensam reações químicas preliminares para marcar o analito com o Ru(bpy).

5.1.1 DETECÇÕES ENVOLVENDO DNA

O estudo pioneiro de um método de ECL para a detecção de despareados de bases nitrogenadas do DNA foi realizado pelo grupo de H. Holden Thorp, onde se mostrou que a guanina pode reagir diretamente com um agente luminescente, $Ru(bpy)_3^{2+}$ ou $Fe(bpy)_3^{2+}$, e produzir um sinal de ECL (JOHNSTON et. al., 1995). O grupo submeteu uma solução com concentração de 50µM de agente luminescente e 30mM de DNA duplicado a testes de voltametria cíclica e de onda quadrada. Utilizaram óxido de estanho dopado com índio (ITO, do inglês *indium tin oxide*) como eletrodo de trabalho, platina como contra eletrodo e AgCl como eletrodo de referência. Com essa montagem, foram capazes de produzir sinais de ECL graças a bases nitrogenadas despareadas (equações 5.1 a 5.4), assim abrindo caminho para a investigação de técnicas mais refinadas para a detecção de defeitos em fitas duplicadas de DNA.

Um método para a detecção de DNA danificado utilizando ECL foi proposto em 2003 pelo grupo de L. Dennany (DENNANY et al., 2003). Utilizando guanina, base nitrogenada do DNA, como correagente para o $Ru(bpy)_3^{2+}$, segundo o mecanismo presente nas equações 5.1 a 5.4, o grupo foi capaz de identificar bases nitrogenadas desacopladas em fitas duplas de DNA com uma sensibilidade de uma base danificada a cada 1000 bases normais, permitindo assim identificar fitas danificadas de DNA.

$$Ru(bpy)_{2}(PVP)_{10}^{2+} \to Ru(bpy)_{2}(PVP)_{10}^{3+} + e^{-}$$
(5.1)

$$Ru(bpy)_{2}(PVP)_{10}^{3+} + DNA(G) \to Ru(bpy)_{2}(PVP)_{10}^{2+} + DNA^{+}(G)$$
(5.2)

$$DNA^{*+}(G) + Ru(bpy)_2(PVP)_{10}^{3+} \to Ru(bpy)_2(PVP)_{10}^{2+*} + DNA(G)_{ox}$$
(5.3)

$$Ru(bpy)_{2}(PVP)_{10}^{2+*} \to Ru(bpy)_{2}(PVP)_{10}^{2+} + h\nu$$
(5.4)

Para fazer a detecção, foram intercalados filmes finos de DNA com filmes finos de $Ru(bpy)_2(PVP)_{10}^{2+}$ (PVP = poli(vinilpiridina)), cada um com 10nm de espessura, e um grupo de eletrodos contendo um SCE como eletrodo de referência, um fio de platina como contra eletrodo e uma base planar de grafite pirolítico como eletrodo de trabalho. O grupo de eletrodos foi alimentado com uma onda quadrada (SWV, do inglês *square wave voltammetry*) com frequência de 5Hz.

Esse estudo demonstrou que a ECL pode ser utilizada para a detecção de danos na fita de DNA sem o emprego de correagentes adicionais, tornando o método mais simples.

A Figura 5.1, retirada do mesmo artigo, apresenta a intensidade da ECL e a corrente na célula em função do potencial aplicado, bem como diferencia as soluções

com diferentes tempos de incubação com óxido de estireno, mostrando que após apenas 5 minutos de incubação, o sinal de ECL já é substancialmente maior que o ruído do sistema.



Figura 5.1: Intensidade da ECL para a detecção de guanina.

Fonte: DENNANY et al., 2003

Em 2007, H. Wei e colaboradores propuseram outro método para detectar descasamento de bases nitrogenadas em fitas duplas de DNA (WEI et al., 2007), valendose do mesmo mecanismo de ECL entre guanina e o $Ru(bpy)_3^{2+}$.

Nesta pesquisa, o $Ru(bpy)_3^{2+}$ foi imobilizado em um filme com nanotubos de carbono (CNT) e nafion. Esse filme foi então depositado em um eletrodo de vidrocarbono para completar a preparação do sistema de ECL. Então, uma solução contendo DNA é pipetada no eletrodo modificado e o conjunto é deixado para secar em atmosfera livre. Posteriormente, é feito um teste de voltametria cíclica, com pico de tensão de 1,35V e taxa de varredura de 50mV por segundo.

Na Figura 5.2 são apresentados os resultados obtidos pelo grupo de H. Wei. As linhas 1 e 2 representam a voltametria cíclica do eletrodo sem a presença do DNA, ao passo que a linha 3 corresponde aos resultados com DNA despareado. É possível observar que o sinal de ECL se apresenta, salvo ruído, apenas no terceiro caso.



Figura 5.2: Teste de voltametria cíclica no eletrodo de vidro-carbono com filme depositado.

Fonte: WEI et al., 2007.

O destaque deste trabalho é a detecção de descasamento entre bases no gene p53, onde a ECL proveniente de amostras com descasamento de base foi 1,5 vezes maior do que a ECL com DNA intacto (WEI et al., 2007). Isso é devido ao fato que, quando não pareada, a guanina é mais facilmente oxidada para reagir com o $Ru(bpy)_3^{2+}$.

Identificar mutações no gene p53 é interessante pois estas são encontradas em grande frequência em diversos casos de câncer em humanos (WILLIANS et. Al., 1998).

5.1.2 ECL EM AMOSTRAS DE URINA

O excesso de concentração de oxalato na urina e no sangue é indicativo de várias doenças importantes como falência renal, deficiências de vitaminas, doenças intestinais (HODGKINSON, 1977). No entanto, o oxalato é também um possível correagente para a produção de ECL.

Rubstein e Bard, em 1983, determinaram que uma solução contendo urina sintética e $Ru(bpy)_3^{2+}$ não só produz um sinal de ECL, como a intensidade desse sinal é linearmente dependente da concentração de oxalato na solução.

Rubstein et al. utilizaram uma célula com três eletrodos, sendo um disco de platina como eletrodo de trabalho, um fio de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo de quase referência de prata. A solução a base de acetonitrila contendo $Ru(bpy)_3(ClO_4)_2$ e urina sintética foi então depositada nos eletrodos, os quais foram submetidos a um teste de voltametria cíclica.

Os resultados obtidos nesse trabalho para soluções de 10^{-3} M de $Ru(bpy)_3(ClO_4)_2$ estão resumidos na Tabela 5.1. Como a concentração normal de oxalato na urina varia de 1,6 x 10^{-4} a 5,5 x 10^{-4} M (KOBOS; RAMSEY, 1980), o método a base de ECL mostrouse sensível o suficiente para apontar possíveis distúrbios relacionados à concentração de oxalato na urina.

Concentração de oxalato (Molar)	Pico de intensidade da ECL (unidade arbitrária) 28,3 48,5 79,0	
0		
1x10 ⁻⁶		
3x10 ⁻⁶		
1x10 ⁻⁵	281	
3x10 ⁻⁵	609	
1x10-4	1955	

Tabela 5.1: Intensidade do sinal de ECL em função da concentração de oxalato

Fonte: RUBSTEIN et al., 1983.

Outro composto de interesse que se apresenta em amostras de urina é a fenotiazina. Esse composto está presente em diversos fármacos antidepressivas e antihistamínicas e também age como correagente para sistemas de ECL, por ser uma tiazina. Em 2005, foi proposto um sensor para esta droga onde o $Ru(bpy)_3^{2+}$ é imobilizado em um eletrodo de vidro-carbono utilizando sol-gel com um filme de dióxido de titânio (TiO₂)/nafion (CHOI et al., 2005). Este trabalho ilustra como a ECL pode ser utilizada para controlar a concentração de fármacos no organismo de indivíduos, fato interessante para acompanhamento de pacientes e exames antidoping em atletas.

5.2 SENSORES COM MARCADORES

Agora, são apresentados sensores a base de ECL que utilizam marcadores. Nesses sensores, o analito é capturado por uma sonda e imobilizado na superfície do eletrodo. Para que a reação de ECL possa ocorrer, ou o analito ou a sonda de captura são marcados com o Ru(bpy).

5.2.1 ENSAIOS DE DNA RAMIFICADO

Esse tipo de ensaio se aproveita das ligações feitas entre fitas simples de DNA que formam a dupla hélice conhecida pelo modelo de Watson e Crick. Neste tipo de ensaio, uma fita simples de DNA é marcada com a substância luminescente. Quando em contato

com a fita de DNA ou RNA conjugada, as duas fitas se ligam formando a estrutura de dupla hélice. Dessa maneira, o DNA alvo do sensor é imobilizado na superfície do eletrodo, o que permite que a reação de ECL ocorra. Esta técnica é muito útil para a detecção de DNA e RNA, sendo utilizada em testes de paternidade, por exemplo. Entretanto, ela não pode ser utilizada para detectar outras moléculas que não ácidos nucleicos.

Em 2001, o grupo de Shuenn-Jue L. Wu produziu um sensor utilizando amplificação de sequências de bases de ácidos nucleicos que é capaz de detectar rapidamente o vírus da dengue (WU et al., 2001).

Esse tipo de pesquisa é de grande interesse nacional, já que o país vive, desde o início dos anos 2000, constantes surtos de dengue. O diagnóstico rápido dessa doença é de fundamental importância, já que seus sintomas são muito semelhantes aos da gripe comum, e sua forma mais agressiva, a dengue hemorrágica, tem altos índices de fatalidades.

O trabalho de Wu et al oferece vantagens com relação aos métodos tradicionais de detecção, como culturas em tecidos, que costumam demorar semanas para fornecerem os resultados desejados.

Para estudar a técnica, o grupo de Shuenn-Jue L. Wu coletou soro plasmático de indivíduos infectados com dengue que demonstraram os sintomas em até seis dias, de modo que não havia ainda ocorrido a produção de anticorpos para o vírus. Então, a presença do vírus foi confirmada via culturas com tecidos do mosquito Aedes Albopictus. Tal confirmação é importante para que se crie um grupo de amostras de controle, para testar se o sensor, de fato, acusa as amostras apenas quando estas contêm o vírus da dengue. A última etapa de preparação consiste na amplificação térmica do RNA do vírus. Esse processo consiste em estimular a replicação através do aquecimento das amostras.

A detecção de ECL acontece ao adicionar fitas de ácidos nucleicos marcados com o $Ru(bpy)_3^{2+}$. Essas fitas, imobilizadas na superfície do eletrodo, se ligam ao RNA do vírus, de modo que, após a lavagem, apenas o RNA do vírus esteja presente no eletrodo. Esse RNA age como correagente e, na presença de tensão elétrica, o sistema emite luz. Na Figura 5.3 é ilustrado o método de captura do RNA viral.



Figura 5.3: Esquema para a captura do RNA viral na superfície do eletrodo.

Fonte: Adaptado de WU et. al., 2001.

Na figura 5.3, uma fita conjugada de RNA é produzida para cada tipo de RNA viral e marcada com o Ru(bpy). Quando entram em contato com o RNA viral específico, a estrutura de dupla hélice é formada, imobilizando o RNA viral na superfície do eletrodo e disparando a reação de ECL. Se não existir RNA viral na solução testada, a dupla hélice não se forma, de modo que o Ru²⁺ não se aproxima da superfície do eletrodo. Por consequência, não há sinal de ECL.

A Tabela 5.2, retirada do artigo (WU et. al., 2001), apresenta a sensibilidade obtida pelo sensor desenvolvido (ensaio NASBA) quando comparado com um teste de cultura tradicional (Ensaio C6/36). Os bons números apresentados mostram que este sensor pode ser utilizado como teste alternativo, com a vantagem de produzir os resultados no mesmo dia, contra as semanas necessárias para o desenvolvimento da cultura.

Tipo de soro	N° de amostras positivas para		Sensibilidade
	Ensaio NASBA	Ensaio C6/36	(%)
Dengue-1	30	30	100
Dengue-2	10	10	100
Dengue-3	22	23	95,7
Dengue-4	4	4	100
Total	66	67	98,5

Tabela 5.1: Sensibilidade do sensor de ECL comparada com a sensibilidade das culturas

Fonte: Adaptado de WU et al., 2001.

Outra análise interessante que pode ser realizado com ECL é de hibridização de DNA. Simplificadamente, o estudo consiste em avaliar se duas fitas simples de DNA se

ligam, formando a conhecida dupla hélice. A intensidade dessa ligação fornece várias informações úteis sobre o indivíduo que está sendo testado.

Essa técnica pode ser utilizada na detecção de vírus e bactérias, proximidade evolutiva entre espécies ou identificação de indivíduos.

Em 2008, Jing Zhang e colaboradores propuseram um sensor de hibridização de DNA a base de ECL utilizando o DNA encontrado no cabelo. Este DNA é preparado de forma que se encontre como fita simples e então é marcado com o $Ru(bpy)_3^{2+}$ e imobilizado em um eletrodo de ouro. Esse conjunto então é imerso em uma solução, contendo TPA como correagente, onde se deseja detectar o DNA alvo.

Esse modelo é interessante porque, quando em fita simples, o DNA imobilizado força o $Ru(bpy)_3^{2+}$ para a vizinhança da superfície do eletrodo. Assim, quando aplicada a tensão, ocorre o fenômeno de ECL. Entretanto, na presença do DNA alvo, ocorre a hibridização, formando a dupla hélice, que força o $Ru(bpy)_3^{2+}$ para longe da superfície do eletrodo, impossibilitando que o Ru(bpy) seja oxidado, inibindo a ECL. De modo que, quanto menor a intensidade do sinal, maior é a concentração do DNA alvo na solução. A Figura 5.4 apresenta as curvas de intensidade de ECL obtidas no trabalho de Zhang et al., 2008.



Fonte: ZHANG et al., 2008.

5.2.2 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS

Ensaios imunológicos são testes que visam determinar a presença e/ou concentração de uma macromolécula em uma dada solução utilizando anticorpos. A alta especificidade dos anticorpos os tornam ferramentas úteis para inserir marcadores na molécula de interesse ou imobilizada no eletrodo. Essa alta seletividade do método o torna popular em aplicações médicas e acadêmicas.

Em 2003, Robert Wilson e colaboradores desenvolveram um sensor baseado em ensaio imunológico para a detecção de trinitrotolueno (TNT). O sensor utiliza luminol como agente luminescente e glicose oxidase (Gox) como correagente, sendo utilizada para marcar os anticorpos livres na solução.

O processo consiste em três etapas. Primeiramente, os anticorpos marcados se ligam ao TNT. Em seguida, o conjunto TNT-anticorpo se liga à outra metade do anticorpo, sensível a campos magnéticos. Finalmente, o conjunto final é imobilizado na superfície do eletrodo por um campo magnético.

O conjunto Gox-anticorpo produz peróxido de hidrogênio na superfície do eletrodo, que age como correagente para o luminol, produzindo assim a emissão de ECL.

O trabalho de Wilson et al. (2003) conseguiu um limite de detecção de 31 ppb de TNT (WILSON et al., 2003). A Figura 5.5 apresenta a intensidade do sinal de ECL em função da concentração de TNT, mostrando a grande sensibilidade desse sensor e de técnicas de ECL em geral.





Fonte: WILSON et al., 2003.

Em um trabalho mais recente, o grupo de Meng Zhang desenvolveu um ensaio imunológico combinado com ECL para detecção de antígenos carcino embrionários (CEA, do inglês carcino embryonic antigen), um importante marcador para diversos tipos de tumores malignos (ZHANG et al., 2012).

No trabalho de Zhang et al. (2012), foi preparado um sensor com um eletrodo de vidro-carbono modificado com partículas de ouro. Novamente, uma das partes do anticorpo foi marcado com $Ru(bpy)_3^{2+}$ -(silica dopada) e a outra parte imobilizada no eletrodo. Assim, o CEA foi imobilizado no eletrodo e propriamente marcado com o $Ru(bpy)_3^{2+}$ formando, na superfície do eletrodo, um sanduíche. O correagente utilizado para a produção do sinal de ECL é o TPA. Na Figura 5.6 é ilustrado o processo de preparação do eletrodo e a formação do sanduíche para a detecção do antígeno.



Figura 5.6: Representação esquemática da fabricação do sensor.

Fonte: Adaptado de ZHANG et al., 2012.

Na Figura 5.7 são apresentados os resultados obtidos pelo grupo de Zhang et al. para concentrações crescentes de CEA, ilustrando a velocidade da técnica, bem como a sua sensibilidade.





Fonte: ZHANG et al, 2012.

5.2.3 APTÂMEROS

Aptâmeros são oligonucleotídeos, longas cadeias de ácidos nucleicos, capazes de se conectar a uma molécula alvo específica. Eles apresentam características, em se tratando de aplicações sensoriais, semelhantes aos anticorpos apresentados na seção 5.2.2. Entretanto, aptâmeros são, em geral, mais estáveis que anticorpos e podem ser sintetizados in vitro, dispensando a necessidade de soro animal para a sua obtenção. Essas qualidades os tornam populares em sensores associados a ECL.

Z. Lin e colaboradores desenvolveram um sensor a base de aptâmeros para detectar a presença e medir a concentração de trombina (LIN et. Al., 2010). Para tal, o aptâmero, composto por 15 bases nitrogenadas, foi dividido em dois, um trecho de captura e o outro marcado com $Ru(bpy)_3^{2+}$ -nano partículas de sílica dopadas (Ru-SNP, do inglês *ruthenium doped sílica nanoparticles*).

O trecho de captura é imobilizado na superfície de um eletrodo de ouro ao passo que o trecho com o marcador é misturado na solução, que contém o correagente DBAE para que a reação que produz ECL ocorra onde se deseja examinar a concentração de trombina.

Como, na ausência da proteína, as partes do aptâmero não interagem fortemente, a parte com o marcador é facilmente removida via lavagem. Isso faz com que não exista um sinal significativo de ECL. Quando existe trombina, as partes do aptâmero se juntam formando G-quadruplex, assim imobilizando o Ru-SNP na superfície do eletrodo, permitindo que ocorra a ECL. Na Figura 5.8 é ilustrado o princípio de funcionamento deste sensor.



Figura 5.8: Princípio de funcionamento do sensor de Trombina.

Fonte: LIN et. al., 2010.

Com o aptâmero completo imobilizado no eletrodo, é aplicado um teste de voltametria cíclica para se obter o sinal de ECL e então determinar a concentração de trombina na solução. A intensidade do sinal de ECL se mostrou proporcional ao logaritmo da concentração de trombina na solução (LIN et. Al., 2010).

Também utilizando aptâmeros, o grupo de Yan Li desenvolveu um sistema sensorial para detectar cocaína, sendo um dos primeiros trabalhos em que ECL foi utilizada para a detecção de drogas (Li et al., 2007).

Para detectar a droga, o $Ru(bpy)_3^{2+}$ foi utilizado para marcar o aptâmero exclusivo da cocaína. O aptâmero é então depositado na superfície de um eletrodo de ouro. A deposição é feita imergindo o eletrodo em uma solução preparada, contendo o aptâmero. O eletrodo é então retirado da solução e deixado para secar. Após a secagem, ele é lavado para remover qualquer partícula que não tenha aderido à superfície do ouro.

Em seguida, uma solução contendo cocaína e TPA, utilizado como correagente, foi depositada no eletrodo e deixada descansar por 4 minutos. A interação entre o aptâmero e a cocaína fez com que o $Ru(bpy)_3^{2+}$ fosse levado à superfície do eletrodo, possibilitando assim a emissão do sinal de ECL. A Figura 5.9 apresenta a intensidade da emissão de ECL do sensor produzido pelo grupo de Y. Li para crescentes concentrações de cocaína.

Figura 5.9: Intensidade do sinal de ECL para diferentes concentrações de cocaina a: solução sem cocaína. b: 5x10⁻⁸M de cocaína na solução. c:1x10⁻⁷M de cocaína na solução.



Fonte: LI et al., 2007.

Neste mesmo trabalho, os autores testaram o sensor com cafeína e heroína, drogas da mesma família da cocaína, para confirmar a seletividade do sistema. As emissões para essas outras drogas mostraram-se com intensidade semelhante ao ruído (LI et al., 2007), mostrando assim que o sistema pode ser utilizado com segurança para a detecção de cocaína.

6 METODOLOGIA

Neste capítulo são apresentados os procedimentos experimentais que serão tomados para a caracterização do eletrodo modificado pelo filme contendo Ru(bpy)₃ e para a detecção de fenotiazinas em amostras de urina sintéticas. Os procedimentos apresentados são baseados nos trabalhos de Choi et. al: "*Sol-gel-immobilized Tris*(2,2'-*bipyridyl*)*ruthenium*(*II*) *electrogenerated chemiluminescence sensor for high-performance liquid chromatography*",publicado em 2005; "*Electrogenerated chemiluminescence from Tris*(2,2'-*bipyridyl*) *ruthenium*(*II*) *immobilized in titania-perfluorosulfonate ionomer composite films*" publicado em 2003. Alterações nos métodos presentes nesses dois artigos se justificam pela adaptação às condições dos laboratórios do LME.

6.1 MATERIAIS E APARELHOS UTILIZADOS

Abaixo é apresentada a lista de materiais e aparelhos utilizados na realização dos experimentos.

- Isopropóxido de titânio (IV) (Ti(OR)₄ (R=CH(CH₃)₂): 99,99%
- Nafion 117 em solução, comprado na loja Sigma-Aldrich
- Tripopilamina (TPA) 99%
- Cloreto de rutênio tris-bipiridina
- Fenotiazina
- Potenciostato AutoLab, modelo PGSTAT 302N
- Eletrodo de carbono vitreo (0,07 cm²) como eletrodo de trabalho
- Eletrodo de platina como contra eletrodo
- Ag/AgCl como eletrodo de referência
- Espectometro Ocean Optics, modelo HR2000

6.2 PREPARAÇÃO DOS ELETRODOS

Para a montagem experimental, é preciso produzir os eletrodos envolvidos na célula eletroquímica que será utilizada como sensor. A presente seção descreve a preparação dos eletrodos utilizados nesta pesquisa.

6.2.1 ELETRODO DE REFERÊNCIA

O primeiro passo para completar a montagem experimental é a preparação de um eletrodo de referência de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl). Para tal, um fio de prata foi

oxidado em uma solução de 1 Mol/L de NaCl. Com o objetivo de agilizar a oxidação, o fio de prata, imerso na solução de NaCl é submetido a um ensaio de voltametria cíclica com potencial variando de 0 a 1,3 V com taxa de varredura de 100mV/s. Quando o voltamograma se mostrou estável por mais de três ciclos do teste, a voltametria foi interrompida. Em seguida, é preparada uma solução de 4 Mol/L de NaCl para imergir o fio de prata oxidado.

Para a estrutura física do eletrodo, utilizou-se uma ponta de pipeta, com sua saída tampada com material utilizado em ânodo de bateria. Essa providencia é necessária para isolar a solução do eletrodo de referência da solução a ser estudada, mas permitir contato elétrico entre ambas.

Por fim, a ponta de pipeta é preenchida com a solução de 4 Mol/L de NaCl e o fio de prata oxidada é colocado em contato com a solução. O eletrodo de referência finalizado é apresentado na figura 6.1.



Figura 6.1: Eletrodo de referência de Ag/AgCl preparado no laboratório.

Fonte: AUTOR, 2016.

Para o eletrodo de carbono vitreo foi utilizado um cilindro de carbono vitreo disponível no laboratório. O contato elétrico foi feito ligando o cilindro a um fio de cobre com cola de prata. Com objetivo de dar resistência mecânica ao eletrodo, o conjunto descrito anteriormente foi colocado em um tubo de plástico que foi preenchido com cola epóxi. Finalmente, o eletrodo foi polido com alumina para expor a superfície de carbono vitreo.

Devido ao método de produção, o eletrodo de carbono vitreo produzido é tridimensional. Essa limitação força que seja feito um suporte específico para a célula eletroquímica, já que o eletrodo deve ser imerso na solução de interesse e sua superfície deve

estar acessível para que seja possível qualquer medição de ECL. Apesar dessa desvantagem, o fato do eletrodo ser tridimensional faz com que, depois que ele seja exaurido devido a um grande número de testes, ele possa ser reaproveitado através da remoção da camada superficial de carbono vitreo.

Na figura 6.2 é apresentado o eletrodo final produzido no laboratório.

Figura 6.2: Eletrodo de carbono vitreo fabricado no laboratório.



- (a) Eletrodo de carbono vitreo no suporte para a célula eletroquímica. Observa-se o diâmetro do eletrodo (3mm) e o diâmetro do recipiente (3cm) que irá conter a solução utilizada na pesquisa.
- (b) Vista superior do eletrodo de carbono vítreo quando fora do recipiente que contém a célula eletroquímica.
- (c) Vista lateral do eletrodo de carbono vítreo, onde se pode observar a dimensão total do eletrodo. Fonte: AUTOR, 2016

6.2.2 ELETRODO DE OURO

Os eletrodos de ouro foram feitos a partir de lâminas de vidro revestidas de uma camada de níquel/cromo, para permitir a aderência da camada de ouro, e uma camada de ouro.

A geometria do eletrodo foi alcançada por corrosão da camada de ouro e níquel/cromo por um processo litográfico. O resultado final é apresentado na figura 6.3.



Figura 6.3: Eletrodo de ouro utilizado, onde a circunferência interna é o eletrodo de trabalho e o semicírculo no entorno desta circunferência é o contra eletrodo.

Fonte: AUTOR, 2016.

Neste caso, o contra eletrodo também foi impresso na lâmina de vidro, já que o ouro, como a platina, é inerte para o sistema analisado e uma estrutura bidimensional apresenta facilidades na preparação da célula eletroquímica.

6.2.3 ELETRODO DE ITO

Para o eletrodo de ITO, uma placa disponível no laboratório foi cortada em pedaços de uma polegada por meia polegada. Em seguida, fez-se uma máscara utilizando fita isolante deixando exposto apenas a área de ITO que será utilizada como eletrodo de trabalho e um espaço para ligar o eletrodo no potenciostato. Um esquema da montagem para o eletrodo de ITO é apresentado na figura 6.4.





Fonte: Autor

6.3 MONTAGEM EXPERIMENTAL

A montagem experimental consistiu numa célula eletroquímica contendo três eletrodos (trabalho, contra eletrodo e de referência) conectada a um potenciostato e uma fibra óptica, posicionada acima do eletrodo de trabalho e conectada a um espectrômetro Ocean Optics.

Essa montagem teve como objetivo fornecer um meio estável de controlar a tensão que polariza a célula eletroquímica e também medir com precisão a intensidade luminosa, em unidades arbitrárias, emitida pelo eletrodo de trabalho.

A figura 6.5 apresenta um esquema da montagem experimental para o eletrodo de carbono vitreo. Neste caso, a montagem experimental acompanha àquela proposta pelo artigo citado no início deste capítulo. Utiliza-se o eletrodo de carbono vitreo como eletrodo de trabalho, o eletrodo de Ag/AgCl como referência e um fio de platina como contra eletrodo.



Figura 6.5: Esquema de montagem experimental para o eletrodo de carbono vitreo.

Fonte: AUTOR, 2016.

Dada a natureza tridimensional do eletrodo de trabalho, se fez necessária a utilização de um recipiente grande o suficiente para abrigar todos os eletrodos imersos na solução. Assim, a cada teste, uma quantidade suficiente de solução, 2ml, foi colocada no recipiente.

A figura 6.6 apresenta o esquema da montagem experimental para o eletrodo de ouro. Diferentemente da montagem para o eletrodo de carbono vitreo, esta montagem utiliza uma trilha de ouro como contra eletrodo, mantendo o eletrodo de Ag/AgCl como referência.



Figura 6.6: Esquema de montagem experimental para o eletrodo de ouro.

Fonte: AUTOR, 2016.

Como esta montagem é majoritariamente bidimensional, com a exceção do eletrodo de referência, ela é mais econômica em termos de volume de solução do que a montagem utilizada para o eletrodo de carbono vitreo. Neste caso, basta aplicar uma gota suficientemente grande de solução para cobrir o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo. Em seguida é necessário encostar a ponta do eletrodo de referência na solução, tomando o cuidado de não produzir nenhum curto circuito.

A montagem experimental para o eletrodo de ITO requereu mais cuidado. O contra eletrodo teve que ser de platina, material inerte, para garantir que não exista nenhuma reação eletroquímica no contra eletrodo que pudesse inibir o fenômeno de ECL. O eletrodo de referência utilizado, mais uma vez,foi o de Ag/AgCl. Entretanto, é preciso estar atento ao estado deste eletrodo, já que se observou a deposição de um filme de prata no eletrodo no caso de contato da solução estudada com a solução interna de NaCl do eletrodo de referência.

Na figura 6.7 é ilustrado um esquema para a montagem experimental para o eletrodo de ITO.



Figura 6.7: Esquema de montagem experimental para o eletrodo de ITO.

Fonte: AUTOR, 2016.

Em todas as montagens, foi utilizado o potenciostato Autolab modelo PGSTAT 302N., disponível no laboratório e o espectrômetro HR2000 da Ocean Optics.

Para todos os casos, uma vez preparados os eletrodos, as células eletroquímicas são inseridas em uma câmara escura com o objetivo de criar uma condição de escuro reprodutível e controlar com precisão a distância entre a extremidade da fibra óptica e a superfície do eletrodo de trabalho.

6.4 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

Os procedimentos experimentais que foram realizados requereram o uso de diferentes soluções. Neste item serão descritas a preparação destas soluções levando em conta a equação 6.1

$$M = \frac{m}{m V_t} = \frac{d V_1}{m V_t} \tag{6.1}$$

Onde M é a molaridade em Mol/L, m é a massa do soluto em g, m é a massa molar do soluto em g/Moç, V_t é o volume total da solução em L, d é a densidade do soluto em g/L e V_1 é o volume do soluto em L.

• Solução para o sol-gel de dioxido de titânio:

Inicialmente, adiciona-se isopropóxido de titânio (IV) puro à álcool isopropílico, produzindo uma solução com 0,15 M de isopropóxido de titânio. A essa solução, acrescenta-se água deionizada na proporção de 5 partes de água para 1 parte de solução e uma alíquota de HCl, de modo que a concentração de ácido na solução final seja de 1mM. A mistura final é então agitada vigorosamente com uma barra magnética a temperatura ambiente por uma hora.

Finalmente, é adicionada uma parte de nafion, solução de nafion comprada pronta da loja Sigma-Aldrich, à suspensão já agitada. Para os procedimentos seguidos durante este trabalho, foram criadas soluções de óxido de titânio com porcentagens em volume de nafion, isto é – quanto do volume da solução final é composto por nafion -, de 10%, 20%, 30%, 50% e 80%.

• Solução de [Ru(bpy)₃]Cl₂

Esta solução é utilizada para incorporar o Ru(bpy) no filme de TiO₂. Para sua preparação, basta diluir o cloreto de Ru(bpy) na solução tampão de fosfato de modo a obter uma concentração de 0,5mM de Ru(bpy).

• Solução de TPA

Esta será a solução alvo do sensor a ser produzido. Portanto, foi preparada uma solução concentrada de TPA a 0,1M em solução tampão de fosfato com pH7, para que ela possa ser sucessivamente diluída durante o teste de sensibilidade do sensor. Diferentemente da solução de Ru(bpy), o tampão utilizado para as soluções de TPA variam conforme o pH desejado da solução. Para pHs entre 4 e 5, foi utilizado um tampão de ácido acético a 0,1M, para os pHs entre 6 e 12, foi utilizado um tampão de fosfato a 0,1M. A concentração da solução tampão é elevada no caso dessas soluções para que exista um excesso de portadores de carga na solução a ser estudada, não fazendo com que a falta destes portadores possa interferir no experimento.

6.5 PROCESSAMENTO DA INTENSIDADE LUMINOSA

Nos experimentos planejados, as medidas de intensidade luminosa foram coletadas utilizando o espectrômetro Ocean Optics, com auxílio do software OOI 32, que acompanha o espectrômetro. Esse conjunto é projetado para captar um sinal luminoso e determinar a intensidade luminosa, em unidades arbitrárias (u.a..), e cada comprimento de onda que compõe o sinal, como mostra a figura 6.8.

Figura 6.8: Saída do aparelho Ocean Optics HR2000. Gráfico da intensidade luminosa (unidades arbitrarias) em função do comprimento de onda.



Fonte: AUTOR, 2016.

Como se pode observar, os dados de saída do software apresentaram uma curva de intensidade luminosa em função do comprimento de onda. Entretanto, para os objetivos deste trabalho, a medida de interesse foi apenas o valor da intensidade luminosa. Por isso, foi preciso extrair um valor único de intensidade luminosa que será classificado como o sinal de ECL.

A partir da saída do software, definiu-se que a intensidade do sinal de ECL seria igual ao valor do pico da curva de intensidade luminosa em função do comprimento de onda e o nível de ruído seria definido como o valor de intensidade onde se encontra a linha de base da curva (*offset*). Dessa maneira, subestima-se a intensidade do sinal de ECL, entretanto, como a intensidade é apresentada em unidades arbitrarias, esse método possibilitou que os resultados obtidos neste trabalho fossem comparados entre si e que o limite de detecção e a sensibilidade do sistema fossem calculados com precisão.

6.5.1 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Os cálculos dos limites de detecção e quantificação foram feitos de acordo com os métodos apresentados na literatura (SHRIVASTAVA; GUPTA, 2011) e são descritos a seguir.

O primeiro método empregado fez uso da regressão linear da curva de sensibilidade do sensor, assumindo que a curva de sensibilidade possa ser escrita como na equação 6.2.

$$Y = aX + b + R^2$$

(6.2)

Onde Y é a resposta do sensor, X é a concentração do analito, *a* é a sensibilidade do sensor e R^2 é o resíduo. Têm-se que o limite de detecção (LD_r) e o limite de quantificação (LQ_r) são, respectivamente:

$$LDr = 3 \times R^2/a$$

(6.3)

$$LQr = 10 \times R^2/a$$

(6.4)

Alternativamente, LD e LQ também podem ser calculados experimentalmente, onde se determina a relação entre sinal e ruído (SNR), utilizando a altura do pico, a linha de base do sinal (offset) e a amplitude do ruído (desvio padrão da linha de base do sinal), de acordo com a equação 6.5.

$$SNR = \frac{Altura \ do \ pico - offset}{Amplitude \ do \ ruído}$$
(6.5)

Neste caso, deseja-se que a SNR seja igual a 3 para o limite de detecção (LD_e). Isso quer dizer que o pico do sinal é três vezes maior do que a amplitude do ruído. Analogamente, para o limite de quantificação (LQ_e), deseja-se que a SNR seja igual a 10.

Assim, define-se a altura do pico mínima para o parâmetro que se deseja calcular, então essa intensidade é substituída na curva de calibração obtida para que se possa descobrir qual concentração corresponde ao LD_e e o LQ_e .

6.6 CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA

O primeiro passo tomado foi definir o intervalo de potencial elétrico, que deve ser aplicado à célula eletroquímica e medir a emissão de luz que ela oferece, com cada eletrodo antes de depositar o filme de TiO₂/nafion. Isso irá fornecer uma base de comparação para se estabelecer qual a influência do filme no sinal de ECL e também informar qual deve ser a tensão de polarização dos eletrodos.

Para essa fase, é feita uma solução com 20mM de Ru(bpy) e 20mM de TPA. Essa solução é submetida a um teste de voltametria cíclica com o potencial variando de 0,6V a 1,4V com uma taxa de varredura de 100mV/s.

As medições de intensidade luminosa são feitas utilizando o espectrômetro Ocean Optics e são processadas conforme descrito na seção 6.5.

A polarização dos eletrodos deve ser feita de modo que a tensão no eletrodo de trabalho seja superior ao pico catódico observado no voltamograma resultante do teste. Deste modo, garantimos que as espécies na superfície do eletrodo estão, de fato, passando por uma reação eletroquímica e produzindo as moléculas de interesse.

6.7 MODIFICAÇÃO DO ELETRODO

Nesta etapa, o filme de TiO₂/nafion é depositado sobre a superfície do eletrodo de trabalho. A deposição é feita por *handcasting*, onde 10 μ l de solução de TiO₂/nafion é gotejada no eletrodo e se inicia o processo de secagem a temperatura ambiente. O tempo de secagem varia conforme a composição do filme.

A técnica de *handcasting* foi utilizada pela praticidade e por ser mais adequada às geometrias escolhidas para os eletrodos de trabalho utilizados nesta pesquisa.

Quando seco, o eletrodo composto, eletrodo e filme fino, é colocado em uma célula eletroquímica com uma solução de 0,5 mM de $Ru(bpy)_3^{2+}$ em tampão de fosfato, com pH7.

A incorporação do Ru(bpy) do filme de TiO_2 é monitorada por um ensaio de voltametria cíclica, que inicia a 800mV e chega a 1350 mV com taxa de varredura de
100mV/s, até que o ciclo se torne estável. Isto é, até que os picos de corrente anódico e catódico não se modifiquem com a passagem dos ciclos. Completada esta etapa, o eletrodo está pronto para ser utilizado e deve ser mantido imerso em uma solução tampão de fosfato com pH 7.

Os resultados obtidos nessa fase, para o eletrodo de carbono vitreo, devem ser comparados com os resultados obtidos por Choi et al. (2013), sintetizados na Figura 6.9.

Figura 6.9: Voltametria cíclica da solução de 0,5 mM de $Ru(bpy)_3^{2+}$ em tampão de fosfato. (--) Eletrodo de carbono vitreo. (-) Eletrodo de carbono vitreo modificado com filme de TiO₂.



Fonte: CHOI et. al., 2003.

Como se pode observar na figura 6.8, verifica-se que a magnitude da corrente circulante na célula seja maior quando o eletrodo de carbono vitreo é modificado com o filme de TiO₂. Isso se deve à incorporação de $Ru(bpy)_3^{2+}$ no filme de TiO₂/nafion, o que aumenta a condutividade do filme. Nesse caso, espera-se que o pico de corrente catódica aumente conforme as moléculas de $Ru(bpy)_3^{2+}$ são incorporadas no filme. A estabilização do voltamograma, quando os picos de corrente deixam de sofrer alterações entre ciclos, significa que o filme já está saturado com $Ru(bpy)_3^{2+}$, e portanto, em sua melhor condição para produzir sinais de ECL.

6.8 REAÇÃO DE ECL COM TPA SEM MODIFICAR O ELETRODO

Antes de utilizar os eletrodos modificados para detectar fenotiazinas é preciso certificar-se que o sistema eletroquímico é, de fato, capaz de produzir sinais de ECL. Também é preciso definir qual a melhor composição e espessura do filme de TiO₂/nafion, bem como qual o pH ideal para a emissão dos sinais de ECL. Por fim, deve-se definir qual dos eletrodos pesquisados apresenta melhor resposta e sensibilidade em termos de intensidade luminosa. Para isso, serão utilizadas soluções de TPA como analito.

O TPA é o analito escolhido porque o sistema de ECL Ru(bpy)/TPA é um dos mais estudados, como mencionado no item 2.2.2.2.

6.8.1 COMPOSIÇÃO DO FILME TIO₂/NAFION

Primeiramente, buscou-se estabelecer qual a composição ideal do filme de TiO₂/nafion a ser utilizado para modificar o eletrodo de trabalho. Assim, foram depositadas suspensões TiO₂ com 10%, 20%, 30%, 50% e 80% em volume de nafion sobre cada eletrodo de trabalho (vidro-carbono, ouro, ITO). Como ainda não se estabeleceu qual a espessura ideal para o filme, utiliza-se o método descrito na seção 6.7.

Em seguida, os eletrodos foram colocados em uma solução com 50mM de TPA em tampão de fosfato com pH7. Este conjunto será submetido a um ensaio de voltametria cíclica como descrito na seção 6.6, para que a tensão onde ocorre o pico catódico seja determinada.

Então, o eletrodo é alimentado com uma tensão constante superior à tensão em que ocorre o pico catódico para que se possam realizar as medidas de intensidade luminosa.

As composições de filme então serão comparadas entre si, escolhendo-se aquela que tiver o melhor desempenho em termos de intensidade do sinal de ECL para ser utilizada no sensor final, bem como nas etapas seguintes de caracterização.

6.8.2 ESPESSURA DO FILME TIO₂/NAFION

Uma vez definida a composição adequada do filme, é preciso observar a influência da espessura do mesmo sobre o sinal de ECL. Infelizmente, a técnica de deposição (*handcasting*) não oferece um bom controle sobre a espessura final do filme. Por isso, nessa etapa, limitouse a parametrizar a espessura do filme com relação ao número de deposições realizadas. Sendo que cada deposição consiste em um volume de 5µl da solução definida na seção 6.8.1.

Assim, cada modificação do eletrodo foi submetida aos mesmos procedimentos realizados na seção 6.8.1, obtendo-se assim uma comparação da intensidade do sinal de ECL para diferentes espessuras do filme.

Também neste caso, a espessura escolhida para ser utilizada no sensor final é a que apresentar o melhor resultado em termos de intensidade luminosa.

6.8.3 PH DA SOLUÇÃO DO ANALITO

Uma vez definido o filme ideal em termos de composição e espessura, deve-se determinar qual o pH da solução do analito que favorece a produção do sinal de ECL.

Para tal, foram estudadas soluções com pH variando de 4 a 12 com concentrações de 20mM de TPA, com cada eletrodo modificado. Os eletrodos foram polarizados pelo potenciostato com um valor constante de tensão definido pelo voltamograma realizado na seção 6.6. Após cada teste, o eletrodo foi lavado com água destilada e devidamente seco, para que resíduos de soluções anteriores não provocassem alterações nos dados obtidos.

Os dados de tensão e corrente são obtidos pelo potenciostato e o sinal de ECL é medido pelo espectrômetro. A análise dos dados permite avaliar a influência do pH da solução sobre a intensidade do sinal de ECL.

6.8.4 CURVA DE SENSIBILIDADE PARA O TPA

Até este ponto do trabalho, foi definido o filme ideal, em termos de composição e espessura, para modificar o eletrodo de trabalho e o pH ideal para a solução do analito, de modo a maximizar intensidade do sinal de ECL. Com estas especificações definidas, deve-se agora estabelecer a curva de sensibilidade do sensor com relação ao analito, neste caso, o TPA.

Para isso, o sensor deve ser imerso em soluções com concentrações decrescentes de TPA, partindo de uma solução com 50mM.

A solução de TPA é diluída até que o espectrômetro não seja mais capaz de detectar o sinal de ECL produzido pelo sistema eletroquímico. Esses dados são então submetidos a uma regressão linear para que se possa calcular o limite de detecção, limite de quantificação e sensibilidade dos sensores.

Os resultados serão comparados entre os eletrodos testados (vidro-carbono, ouro, ITO) a fim de selecionar o que apresentar as melhores características e utilizá-lo para a detecção de fenotiazinas.

Em resumo, após o fim desta etapa, ter-se-á definido qual a composição e espessura ideal para o filme de TiO₂/nafion, o pH ideal da solução que contém o analito para maximizar o sinal de ECL e o melhor material para a confecção do eletrodo de trabalho. Isso conclui a etapa de projeto e determinação do sensor. O melhor sensor obtido é aquele que apresentar os limites de detecção e quantificação mais baixos e o sinal de ECL mais intenso.

6.9 SISTEMA DE ECL RU(BPY)₃/FENOTIAZINAS

Derivados de fenotiazina formam um grupo de antidepressivos muito utilizados em pacientes psiquiátricos. Monitorar a concentração de tais componentes no corpo do paciente é importante para assegurar que o medicamento está sendo ingerido de maneira adequada e se possa fazer uma análise confiável da resposta que o tratamento está oferecendo.

Fenotiazina é uma substância do grupo das tiazinhas, contendo um átomo de nitrogênio em uma cadeia circular de átomos de carbono, sendo assim passíveis de reagirem com o $Ru(bpy)_3^{2+}$ e produzirem sinais de ECL. Diversos trabalhos exploram a produção de ECL utilizando aminas, bem como vários artigos de revisão também foram publicados (Yuan et al., 2012, Lee, 1997).

O mecanismo para a produção de ECL utilizando aminas alifáticas como correagente para o $Ru(bpy)_3^{2+}$ foi proposto por Nosffsinger et al. em 1987, e está apresentado nas equações 6.6 a 6.10.

$$Ru(bpy)_{3}^{2+} \to Ru(bpy)_{3}^{3+} + e^{-}$$
(6.6)

$$R_2 N C H_2 R' + R u (b p y)_3^{3+} \to R_2 N^+ C H_2 R' + R u (b p y)_3^{2+}$$
(6.7)

$$R_2N^+ \cdot CH_2R' + H_2O + Ru(bpy)_3^{2+} \to 2H^+ + R_2NH + COHR' + Ru(bpy)_3^+$$
(6.8)

$$Ru(bpy)_{3}^{+} + Ru(bpy)_{3}^{3+} \to Ru(bpy)_{3}^{2+*} + Ru(bpy)_{3}^{2+}$$
(6.9)

$$Ru(bpy)_{3}^{2+*} \to Ru(bpy)_{3}^{2+} + h\nu$$
 (6.10)

A Tabela 6.1 apresenta a estrutura esquemática da fenotiazina.



Tabela 6.1: Estrutura dos derivados de fenotiazina utilizados.

Fonte: AUTOR, 2016.

6.10 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS FISIOLÓGICAS PARA OS ESTUDOS

Infelizmente, não foi possível obter urina sintética ou orgânica para realizar os estudos aqui propostos. Então, foi utilizada uma solução de fosfato com concentração de 0,1M como substituto.

As soluções foram preparadas de modo que possuíssem pH 7, o que as aproxima de soluções fisiológicas em geral. Os estudos foram iniciados com uma concentração de 50mM de fenotiazina na solução de fosfato. Assim, para a caracterização do sensor, são realizadas sucessivas diluições da solução original.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos durante as experiências realizadas no laboratório do LME, bem como uma comparação com os resultados publicados na literatura para experimentos semelhantes.

Algumas mudanças na metodologia proposta tiveram que ser aplicadas devido à imprevistos que ocorreram durante a prática experimental. Os ajustes, quando houverem, serão mencionados também nessa seção.

7.1 ECL PARA A SOLUÇÃO DE RU(BPY)₃ E TPA

Este foi o primeiro teste realizado no laboratório e segue de acordo com a metodologia apresentada na seção 6.6. A figura 7.1 apresenta o voltamograma obtido para uma solução de 20mM de [Ru(bpy)₃]Cl₂ e 20mM de TPA com o eletrodo de carbono vitreo. Os voltamogramas obtidos para os eletrodos de ouro e ITO foram omitidos deste trabalho já que apresentam comportamento semelhante, de maneira que a apresentação de apenas um deles é suficiente para apontar todos os resultados importantes.





Fonte: AUTOR, 2016.

Primeiramente, observa-se a formação do pico de corrente catódica para um potencial aplicado de 1,15 V. Tal resultado é esperado já que a formação dos picos de corrente depende principalmente dos reagentes químicos.

Outro ponto digno de nota na figura 7.1 é o fato de que o pico de corrente catódica diminui para cada ciclo completo do teste. Isso ocorre porque a célula eletroquímica utilizada é estática, de modo que o único mecanismo disponível para repor as moléculas de TPA na superfície do eletrodo é a difusão. Como este processo é mais lento que o consumo do TPA na superfície do eletrodo, observa-se uma diminuição na concentração do correagente na região do eletrodo. Isso diminui a intensidade da corrente que passa pelo eletrodo de trabalho e também a intensidade do sinal de ECL.

Os eletrodos de ouro e ITO apresentaram comportamento semelhante, com o pico de corrente catódica aparecendo para um potencial aplicado de 1,15 V e com a magnitude deste pico de corrente decaindo a medida que mais ciclos eram completados.

Como conclusão desta primeira fase de experimentos, ficou estabelecido que os eletrodos devem ser polarizados a 1,25 V, uma tensão acima do pico de corrente catódica, para que se possa observar com segurança o fenômeno de ECL.

7.2 INCORPORAÇÃO DE RU(BPY)₃ NO FILME DE TIO₂

Após a corrente de polarização estar adequadamente estabelecida, o passo a ser seguido é a deposição do filme composto de TiO₂/nafion na superfície do eletrodo de trabalho e, em seguida, fazer a incorporação do $Ru(bpy)_3^{2+}$ na estrutura do filme. Para essa fase, a metodologia adotada está descrita na seção 6.7, já que ainda não é possível determinar a proporção ideal de nafion no filme ou a espessura do mesmo.

A figura 7.2 apresenta o resultado de um teste de voltametria cíclica utilizado para incorporar o $Ru(bpy)_3^{2+}$ no filme de TiO₂/nafion.



Figura 7.2: Teste de voltametria cíclica realizado com uma solução de 50mM de $Ru(bpy)_3^{2+}$ no eletrodo de carbono vitreo com o filme de TiO₂/nafion depositado.

Fonte: AUTOR, 2016.

Observa-se que, como o esperado, a magnitude dos picos de corrente anódica e catódica aumentam ao longo do teste, revelando a incorporação do $Ru(bpy)_3^{2+}$ no filme que cobre a superfície do eletrodo.

Também, é possível observar que esse aumento não é indefinido, já que, eventualmente, o filme fica saturado com Ru(bpy). Essa saturação depende da porcentagem em volume de nafion presente no filme, já que ele é o composto que retém o Ru(bpy) no filme por apresentar carga elétrica negativa. Portanto, quanto maior a quantidade de nafion no filme, mais Ru(bpy) pode ser incorporado no mesmo, tornando o processo de incorporação mais longo.

Vale notar que a secagem do filme foi realizada a temperatura ambiente e ela foi consideravelmente mais lenta do que quando descrita na literatura (CHOI et. al., 2003), podendo levar até 40 minutos para ser completa. Também neste caso, quanto maior a proporção de nafion no filme, maior o tempo de secagem necessário.

A critério ilustrativo, nas figuras 7.3 e 7.4 são apresentados os eletrodos modificados de ouro e ITO. Nas figuras 7.3(a) e 7.4(a) estão os eletrodos modificados com o filme de TiO₂/nafion depositados. As figuras 7.3(b) e 7.4(b) mostram os eletrodos após a incorporação de Ru(bpy) no filme. É possível observar que, antes da incorporação de Ru(bpy) o filme é translucido, sendo difícil vê-lo no eletrodo de ITO. Entretanto, após a incorporação de Ru(bpy), o filme adquire uma coloração alaranjada, oferecendo um indicativo visual, além do elétrico apresentado na figura 7.2, que, de fato, o filme foi modificado e agora dispõe de Ru(bpy) em sua estrutura.



Figura 7.3: Eletrodos de ouro utilizados nos experimentos.

(a) Eletrodo de ouro com o filme composto depositado.
(b) Eletrodo de ouro depois do processo de absorção de Ru(bpy).
Fonte: AUTOR, 2016.



Figura 7.4: Eletrodos de ouro utilizados nos experimentos.

(a) Eletrodo de ouro com o filme composto depositado.(b) Eletrodo de ouro depois do processo de absorção de Ru(bpy).Fonte: AUTOR, 2016.

Novamente, como as características eletroquímicas que eram de interesse nessa etapa são semelhantes para os três eletrodos estudados, os voltamogramas do eletrodo modificado de ouro e do eletrodo modificado de ITO foram omitidos.

7.3 SINAL DE ECL EM FUNÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO FILME DE TIO₂

Esta etapa começa a caracterizar o sensor a ser produzido e segue a metodologia descrita na seção 6.8.1.

Para cada composição de filme, foi realizado um processo de deposição, secagem e incorporação para preparar a amostra. Em seguida o eletrodo modificado foi imerso em soluções contendo 100mM de TPA para o caso do eletrodo de carbono vitreo e 50mM de TPA para os demais eletrodos. Essa diferença se deve ao fato de que o eletrodo de carbono vitreo foi o primeiro a ser caracterizado completamente. Posteriormente, o TPA comprado se tornou escasso para os demais eletrodos, fazendo com que as concentrações utilizadas tivessem que ser reduzidas.

Para cada ponto do gráfico, os dados foram processados como descrito na seção 6.5 e as medidas foram repetidas entre 10 e 15 vezes, para que o dado obtido possuísse relevância estatística.

As figuras 7.5, 7.6 e 7.7 apresentam as curvas da intensidade do sinal de ECL em função da proporção em volume de nafion no filme que recobre o eletrodo de trabalho.



Figura 7.5: Intensidade do sinal de ECL em função da porcentagem em volume de nafion no filme de TiO₂ utilizando um eletrodo de trabalho de carbono vitreo.

(▲) Apresenta a intensidade do sinal de ECL para a dada composição do filme.
 (■) Apresenta o nível de ruído do sistema.
 Fonte: AUTOR, 2016.



Figura 7.6: Intensidade do sinal de ECL em função da porcentagem em volume de nafion no filme de TiO₂ utilizando um eletrodo de trabalho de ouro.

(▲) Apresenta a intensidade do sinal de ECL para a dada composição do filme.
 (■) Apresenta o nível de ruído do sistema.
 Fonte: AUTOR, 2016.



Figura 7.7: Intensidade do sinal de ECL em função da porcentagem em volume de nafion no filme de TiO₂ utilizando um eletrodo de trabalho de ITO.

(▲) Apresenta a intensidade do sinal de ECL para a dada composição do filme.
 (■) Apresenta o nível de ruído do sistema.
 Fonte: AUTOR, 2016.

Observa-se que, para os três tipos de eletrodos, a intensidade do sinal de ECL tem um comportamento semelhante, sendo mais intensa em proporções intermediárias de nafion e menos intensa nos extremos. Isso ocorre porque, para comancorado na estrutura do filme, o que faz com que a sua concentração se torne o fator limitante da reação de ECL. Para as proporções elevadas de nafion, como 80% em volume, o eletrodo acaba adquirindo uma resistência de superfície muito elevada, o que torna a oxidação das espécies mais lenta e acaba enfraquecendo o sinal de ECL.

Esse tipo de resultado é condizente com a literatura, como mostra a figura 7.8, retirada de (CHOI et. al., 2003), que apresenta a intensidade de ECL em função da proporção em volume de nafion no filme de TiO₂/nafion para um eletrodo de carbono vitreo.

Figura 7.8: Intensidade do sinal de ECL em função da composição do filme de TiO2 presente na literatura.



(•) Apresenta o pico de corrente anódica em função da porcentagem de nafion no filme de TiO₂.
 (•) Apresenta a intensidade do sinal de ECL em função da porcentagem de nafion no filme de TiO₂.
 Fonte: CHOI et al., 2003.

Apesar do fato de que a proporção de 50% de nafion foi a que apresentou o melhor resultado em termos de intensidade de sinal de ECL, ela não foi escolhida para ser utilizada nas etapas seguintes e no sensor final. Essa decisão se deve ao fato de que a solução com 50% de nafion apresentou problemas de aderência à superfície dos eletrodos de trabalho, o que torna a deposição do filme de difícil reprodução. Por isso, escolheu-se a proporção de 20% de nafion no filme de TiO₂ já que esta solução apresentou melhor aderência e, por consequência, é mais fácil de reproduzir e produzir resultados mais confiáveis.

Na figura 7.9 são apresentadas as intensidades máximas obtidas para o sinal de ECL para cada eletrodo nesta fase da pesquisa. Note que, apesar do eletrodo de carbono vitreo apresentar uma intensidade superior aos demais, a solução de TPA utilizada com este eletrodo era mais concentrada que as demais. Observa-se que, para todos os eletrodos, o filme com 50% de volume de nafion apresentou o sinal de ECL mais intenso.



Figura 7.9: Comparativo dos melhores desempenhos dos eletrodos estudados com relação à composição do filme.

Fonte: AUTOR, 2016.

7.4 SINAL DE ECL EM FUNÇÃO DA ESPESSURA DO FILME DE TIO₂

Uma vez definida a composição adequada para o filme de TiO₂/nafion, foi preciso estudar a influência da espessura do filme no sinal de ECL. Esta etapa seguiu a metodologia apresentada na seção 6.8.2, com cada polarização dos eletrodos sendo repetida entre 5 e 15 vezes. Assim como no caso da seção 7.3, a concentração de TPA utilizada para testar o eletrodo de carbono vitreo foi maior do que a dos demais eletrodos pelos motivos apresentados no item 7.3.

Os resultados para os eletrodos de carbono vitreo, ouro e ITO são apresentados nas figuras 7.10, 7.11 e 7.12, respectivamente.



Figura 7.10: Intensidade do sinal de ECL em função do número de deposições por "handcasting" de 5µl de solução do filme de TiO₂/nafion para o eletrodo de carbono vitreo.

(▲) Apresenta a intensidade do sinal de ECL.
(■) Apresenta o nível de ruído do sistema.
Fonte: AUTOR, 2016.



Figura 7.11: Intensidade do sinal de ECL em função do número de deposições por "handcasting" de 5µl de solução do filme de TiO₂/nafion para o eletrodo de ouro.

(▲) Apresenta a intensidade do sinal de ECL.
(■) Apresenta o nível de ruído do sistema.
Fonte: AUTOR, 2016.



Figura 7.12: Intensidade do sinal de ECL em função do número de deposições por "handcasting" de 5µl de solução do filme de TiO₂/nafion para o eletrodo de ITO.

(▲) Apresenta a intensidade do sinal de ECL.
 (■) Apresenta o nível de ruído do sistema.
 Fonte: AUTOR, 2016.

Os resultados obtidos nessa etapa foram curiosos, já que o eletrodo de ITO e de ouro mostraram uma tendência de aumentar a intensidade do sinal de ECL com o aumento da espessura do filme enquanto o eletrodo de carbono vitreo se comportou de maneira contraria, com o sinal de ECL perdendo intensidade com o aumento da espessura do filme.

Infelizmente, não foram encontrados estudos comentando sobre a espessura do filme no sinal de ECL neste caso. Sendo assim, uma explicação preliminar para essa diferença de comportamento pode ser feita observando a resistência dos eletrodos. Enquanto os eletrodos de ITO e ouro tem uma resistência de 30 e 10 ohms respectivamente, o eletrodo de carbono vitreo apresenta uma resistência de 500 ohms. Assim, o aumento de resistência do eletrodo devido à deposição do filme de TiO₂/nafion é menos relevante nos eletrodos metálicos, o que permite que a maior quantidade $Ru(bpy)_3^{2+}$ influa positivamente na intensidade do sinal de ECL. Já no caso do eletrodo de carbono vitreo, o aumento na resistência do eletrodo induz a uma diminuição na corrente que circula pela célula eletroquímica. Como a resistência do eletrodo de carbono vitreo já é relevante, a diminuição da corrente acaba tendo mais influência que o aumento na concentração de $Ru(bpy)_3$, o que influi negativamente na intensidade do sinal de ECL.

Ao fim desta fase, foi escolhida a espessura ideal para cada um dos eletrodos utilizados, sendo uma deposição de 5µl para o eletrodo de carbono vitreo, três deposições de 5 µl para o eletrodo de ITO.

A figura 7.13 apresenta os sinais de ECL mais intensos obtidos nesta fase da pesquisa. Mais uma vez, deve-se ter cuidado ao analisar a intensidade obtida para o eletrodo de carbono vitreo, já que a solução de TPA para este eletrodo é mais concentrada do que as demais. Neste estudo, observa-se que para o eletrodo de carbono vitreo, a maior intensidade de sinal obtida ocorreu para a menor espessura do filme, uma camada depositada. Enquanto para os demais eletrodo, a intensidade do sinal aumentou conforme a aumento da espessura do filme.



Figura 7.13: Comparativo dos melhores desempenhos dos eletrodos estudados com relação à espessura do filme.

Fonte: AUTOR, 2016

7.5 SINAL DE ECL EM FUNÇÃO DO PH DA SOLUÇÃO

Agora, o filme que modifica o eletrodo já pode ser definido, utilizando a composição escolhida na seção 7.3 e a espessura escolhida na seção 7.4. Assim, esta etapa da caracterização se dedica a investigar a influência do pH da solução na intensidade do sinal de ECL.

Nesta etapa foi seguida a metodologia proposta na seção 6.8.3 e os eletrodos foram polarizados com uma tensão de 1,25 V. Os testes foram repetidos entre 10 e 15 vezes para cada pH estudado.

Na figura 7.14 é apresentada a curva de intensidade do sinal de ECL em função do pH da solução do analito.



Figura 7.14: Curva de intensidade do sinal de ECL em função do pH para o eletrodo de carbono vitreo.

(▲) Apresenta a intensidade do sinal de ECL.
 (■) Apresenta o nível de ruído do sistema.
 Fonte: AUTOR, 2016.

Como esperado, o sinal de ECL é mais intenso para pHs neutros, entre 6 e 8. Isso é esperado porque esse comportamento já foi observado outras vezes na literatura (Leland e Powell., 1990). No entanto, a queda abrupta no sinal de ECL para os pHs básicos não era esperada. Essa queda indica que a solução está interferindo no filme, ou o removendo da superfície do eletrodo, ou degradando a base de carbono vitreo. Esta última conclusão é possível porque, após cada teste, foi necessário polir novamente o eletrodo de carbono vitreo após cada polarização e medida subsequente.

A figura 7.15 apresenta os resultados da influência do pH na intensidade luminosa emitida pelo eletrodo de ouro modificado com o filme de TiO₂/nafion.



Figura 7.15: Curva de intensidade do sinal de ECL em função do pH para o eletrodo de ouro.

(▲) Apresenta a intensidade do sinal de ECL.
 (■) Apresenta o nível de ruído do sistema.
 Fonte: AUTOR, 2016.

No caso do eletrodo de ouro se observa mais uma vez que pHs levemente ácidos ou neutros apresentaram os melhores resultados com relação à intensidade do sinal de ECL. Neste caso, observa-se também uma queda mais suave da intensidade do sinal conforme o pH da solução se torna mais básico. Isso demonstra que o eletrodo de ouro interage menos com a solução do analito ou oferece melhor aderência para o filme composto.

A figura 7.16 mostra os resultados obtidos utilizando o eletrodo de ITO como base para o filme composto.



Figura 7.16: Curva de intensidade do sinal de ECL em função do pH para o eletrodo de ITO.

(▲) Apresenta a intensidade do sinal de ECL.
 (■) Apresenta o nível de ruído do sistema.
 Fonte: AUTOR, 2016.

Assim como observado no eletrodo de ouro, o eletrodo de ITO apresenta bons níveis de intensidade para pHs neutros. Entretanto, o filme é removido do eletrodo quando exposto a soluções ácidas. Isso faz com que seja muito difícil medir o sinal de ECL nesses pontos já que, na maioria das tentativas, o filme perde contato com a superfície do eletrodo antes do termino do ensaio. Por outro lado, para pHs básicos, o filme não apresentou o mesmo comportamento, ficando bem aderido à superfície do eletrodo, a ponto de poder ser utilizado em mais de um ensaio.

Infelizmente, como a maioria dos líquidos fisiológicos tem pH neutro, essa melhor adesão quando exposto a soluções básicas não é de grande utilidade para este trabalho.

7.6 SENSIBILIDADE DO CONJUNTO DE ELETRODOS PARA TPA

Esta é a última etapa na caracterização dos sensores baseados em ECL utilizando o sistema Ru(bpy)/TPA. Ela consiste em medir a curva de sensibilidade do sensor e assim calcular seus limites de detecção e quantificação, bem como a sua sensibilidade. Para isso, foi utilizada a metodologia proposta na seção 6.8.4.

A figura 7.17 mostra a curva de sensibilidade do eletrodo de carbono vitreo modificado com o filme de TiO_2 com 20% em volume de nafion produzido com um "handcast" de 5µl.



Figura 7.17: Curva de sensibilidade para o sensor de carbono vitreo.

(**▲**) Apresenta a intensidade do sinal de ECL.

(
 Apresenta o nível de ruído do sistema.

(--) Apresenta a regressão linear dos dados obtidos para a intensidade do sinal de ECL.

Y é a equação da regressão linear dos dados obtidos para a intensidade do sinal de ECL. Fonte: AUTOR, 2016.

Fonte: AUTOR, 2010

Na equação 7.1 é apresentada a regressão linear dos dados obtidos para o eletrodo de carbono vitreo.

$$Y = 0,8965X + 154,16, R^2 = 0,9335 \tag{7.1}$$

Aplicando o método de cálculo do LD e LQ utilizando a regressão linear têm-se que, para o eletrodo de carbono vitreo, o LDr é de 3,13 mM, o LQr é de 10.41 mM e o sensor tem uma sensibilidade de 0,89 u.a../mM.

Utilizando o método que avalia a SNR do sinal, temos um LDe de 10,41 mM e um LQe de 51,13 mM.

Os dados obtidos indicam, então, que esse sensor é capaz de acusar a concentração de TPA na solução para concentrações superiores a 10 mM e é capaz de detectar a presença do analito para concentrações até 3 mM. Essas figuras são muito inferiores aos dados presentes na literatura, que possuem limites de detecção na ordem de 1 μ M (Choi et. Al.,2005). Tal discrepância se deve, possivelmente, ao aparato experimental utilizado e à geometria do eletrodo.

Mesmo oferecendo figuras inferiores aos presentes na literatura, pode-se considerar que os resultados obtidos foram bons, já que o sensor foi capaz de detectar o analito e responder a concentrações na faixa de 0,05 mM.

Para melhor apresentar os dados obtidos, na figura 7.18 são apresentados os resultados obtidos para o eletrodo de carbono vitreo em escala monolog, que permite melhor observar as medidas para baixas concentrações de analito.



Figura 7.18 Curva de sensibilidade para o sensor de carbono vitreo em escala monolog.

(**△**) Apresenta a intensidade do sinal de ECL.

(--) Apresenta a regressão exponencial dos dados obtidos para a intensidade do sinal de ECL. Y é a equação da regressão exponencial dos dados obtidos para a intensidade do sinal de ECL. Fonte: AUTOR, 2016.

Na figura 7.19 é mostrada a curva de sensibilidade do eletrodo de ouro modificado com o filme de TiO₂ com 20% em volume de nafion produzido com dois "handcasts" de 5µl.



Figura 7.19: Curva de sensibilidade para o sensor de ouro.

(**△**) Apresenta a intensidade do sinal de ECL.

(

 Apresenta o nível de ruído do sistema.

(--) Apresenta a regressão linear dos dados obtidos para a intensidade do sinal de ECL. Y é a equação da regressão linear dos dados obtidos para a intensidade do sinal de ECL. Fonte: AUTOR, 2016.

Na equação 7.2 é apresentada a regressão linear dos dados obtidos para o eletrodo de ouro.

$$Y = 2,0089X + 157,92 \ ; \ R^2 = 0,9051$$

(7.2)

Aplicando o método de cálculo do LD e LQ utilizando a regressão linear têm-se que, para o eletrodo de carbono vitreo, o LDr é de 1,35 mM, o LQr é de 4,5 mM e o sensor tem uma sensibilidade de 2,00 u.a../mM.

Utilizando o método que avalia a SNR do sinal, temos um LDe de 4,50 mM e um LQe de 20,94 mM.

Os limites de detecção e quantificação do eletrodo de ouro ainda estão aquém dos dados obtidos na literatura, mas são superiores aos obtidos para o eletrodo de carbono vitreo estudado neste trabalho. Essa melhora pode ser explicada pela geometria do eletrodo de ouro, que levou a uma resistividade inferior ao eletrodo de carbono vitreo e pelo ouro ser uma superfície reflexiva, o que faz com que ele aproveite melhor o sinal luminoso produzido pelo sistema de ECL.

Para melhor apresentar os dados obtidos, a figura 7.20 apresenta os resultados obtidos para o eletrodo de ouro em escala monolog, que permite melhor observar as medidas para baixas concentrações de analito.



Figura 7.20: Curva de sensibilidade para o sensor de carbono vitreo em escala monolog.

(▲) Apresenta a intensidade do sinal de ECL.

(--) Apresenta a regressão exponencial dos dados obtidos para a intensidade do sinal de ECL. Y é a equação da regressão exponencial dos dados obtidos para a intensidade do sinal de ECL. Fonte: AUTOR, 2016.

A figura 7.21 mostra a curva de sensibilidade do eletrodo de ITO modificado com o filme de TiO₂ com 20% em volume de nafion produzido com três "handcast" de 5μ l.



Figura 7.21: Curva de sensibilidade para o sensor de ouro.

(▲) Apresenta a intensidade do sinal de ECL.

(

 Apresenta o nível de ruído do sistema.

(--) Apresenta a regressão linear dos dados obtidos para a intensidade do sinal de ECL. Y é a equação da regressão linear dos dados obtidos para a intensidade do sinal de ECL. Fonte: AUTOR, 2016.

A equação 7.3 apresenta a regressão linear dos dados obtidos para o eletrodo de ITO.

$$Y = 1,8945X + 146,35; R^2 = 0,9639$$
(7.3)

Aplicando o método de cálculo do LD e LQ utilizando a regressão linear têm-se que, para o eletrodo de carbono vitreo, o LDr é de 1,52 mM, o LQr é de 5,08 mM e o sensor tem uma sensibilidade de 1,89 u.a../mM.

Utilizando o método que avalia a SNR do sinal, temos um LDe de 5,08 mM e um LQe de 28,37 mM.

O eletrodo produzido com ITO apresentou um comportamento interessante, já que, quando exposto a altas concentrações do analito, apresentou a resposta luminosa mais intensa entre os três tipos de eletrodos testados. Entretanto, teve resultados inferiores ao eletrodo de ouro para baixas concentrações do analito. Esse desempenho ruim em baixas concentrações prejudicou os limites de concentração e quantificação do sensor.

Para melhor apresentar os dados obtidos, na figura 7.22 são apresentados os resultados obtidos para o eletrodo de ITO em escala monolog, que permite melhor observar as medidas para baixas concentrações de analito.



Figura 7.22: Curva de sensibilidade para o sensor de carbono vitreo em escala monolog.

Na tabela 7.1 são resumidos os resultados obtidos referentes às características dos sensores estudados neste trabalho.

Observe que medidas referentes à corrente circulante na célula eletroquímica durante o processo ou dados sobre a intensidade máxima obtida foram omitidos. A primeira porque, apesar do fato de existir uma corrente elétrica circulante proporcional à intensidade do sinal de ECL, também se observa a circulação de corrente na célula eletroquímica na ausência de ECL, não sendo assim suficiente a medida de corrente para garantir que o sensor está respondendo ao analito. Já os dados de intensidade máxima são de segunda importância para

 ^(▲) Apresenta a intensidade do sinal de ECL.
 (--) Apresenta a regressão exponencial dos dados obtidos para a intensidade do sinal de ECL.
 Y é a equação da regressão exponencial dos dados obtidos para a intensidade do sinal de ECL.
 Fonte: AUTOR, 2016.

este trabalho, que tem por objetivo produzir um sensor que detecte a menor concentração possível do analito em questão.

	~	2	
Eletrodo	Carbono vitreo	Ouro	ПО
Sensibilidade (u.a./mM)	0,89	2,00	1,89
Limite de detecção	3,12	1,35	1,52
(regressão linear) (mM)			
Limite de detecção	10,41	4,50	5,08
(experimental) (mM)			
Limite de quantificação	12,09	3,52	9,89
(regressão linear) (mM)			
Limite de quantificação	51,13	20,94	28,37
(experimental) (mM)			

Tabela 7.1: Resumo dos dados obtidos para os sensores com os três materiais utilizados para o eletrodo de trabalho.

Fonte: AUTOR, 2016.

Pode-se observar que o eletrodo de ouro apresentou melhores resultados em termos de sensibilidade quando comparado aos demais eletrodos. Isso se justifica pela baixa resistividade do eletrodo de ouro e por ter uma superfície reflexiva.

O eletrodo de ITO, quando super estimulado, apresenta maior intensidade do que os demais. Entretanto, apresenta uma resposta inferior quando exposto a concentrações mais baixas do analito. Isso o torna uma opção pior quando comparado ao eletrodo de ouro, já que esse trabalho busca o limite de detecção mais baixo possível para poder detectar traços de substâncias de interesse em soluções fisiológicas. Essa resposta inferior do eletrodo de ITO em baixas concentrações pode ser justificada pela baixa aderência do filme de TiO₂/nafion na superfície do ITO.

7.7 ESTUDO COM FENOTIAZINA

A detecção de fenotiazina em solução de fosfato é o objetivo final deste trabalho. Para tal, foi escolhido o eletrodo de ouro, já que este apresentou os melhores resultados durante os testes preliminares utilizando TPA como analito.

Assim, o eletrodo de ouro foi preparado com a deposição do filme composto de TiO₂/nafion e passou pelo procedimento de incorporação de Ru(bpy) como descrito anteriormente. Pronto o eletrodo, foram realizados testes de voltametria cíclica com soluções de fenotiazina para se certificar que o sistema estava funcionando adequadamente e, em seguida, polarizou-se o sistema com uma tensão constante de 1,2 V no eletrodo de trabalho para se fazer a coleta dos dados.

Os dados coletados estão apresentados na figura 7.23.



Figura 7.23: Curva de sensibilidade para soluções de fenotiazina utilizando o sensor com eletrodo de trabalho de ouro.

(▲) Apresenta a intensidade do sinal de ECL.
(■) Apresenta o nível de ruído do sistema.
(--) Apresenta a regressão linear dos dados obtidos para a intensidade do sinal de ECL. Y é a equação da regressão linear dos dados obtidos para a intensidade do sinal de ECL. Fonte: AUTOR, 2016.

Pode-se observar que o sensor foi capaz de detectar a presença de fenotiazina na solução de fosfato. Entretanto, ele só é capaz de acusar a presença do analito quando este se encontra em grandes concentrações, superiores a 10mM. Concentrações muito superiores às esperadas.

A regressão linear obtida para o sistema de ECL utilizando fenotiazina como correagente é apresentada na equação 7.5

$$y = 0,374x + 145,6 \tag{7.5}$$

$$R^2 = 0,9627$$

Essa limitação pode ser explicada pela baixa solubilidade da fenotiazina pura em água, já que as medicações utilizadas contêm derivados de fenotiazina, como a cloropromazina. Também, os problemas da montagem experimental que afetaram a sensibilidade com relação ao TPA influenciam neste resultado.

Dos dados obtidos em laboratório, podemos concluir que o LDr é 7,79 mM e o LQr é 25,91 mM e a sensibilidade do sensor é de 0,374 u.a./mM. Como esperado, as figuras do sensor para fenotiazina são inferiores às obtidas para o TPA, que é um correagente muito mais ativo em sistemas de ECL.

8 PROSSEGUIMENTOS NA PESQUISA

Apesar dos bons resultados obtidos nesse trabalho, o limite de detecção obtido ainda é superior ao apresentado na literatura. Por isso, nessa sessão são apresentadas uma série de sugestões para que pesquisas futuras possam obter resultados melhores tomando este trabalho como ponto de partida.

8.1 COM RELAÇÃO À ESPESSURA

Nesse trabalho é mostrado que a espessura do filme composto de TiO₂/nafion tem grande influência sobre a intensidade luminosa do sinal de ECL. Infelizmente, a literatura não explora essa influência em detalhes.

Como a técnica de deposição utilizada neste trabalho foi o "handcasting", não foi possível ter um controle adequado sobre a espessura final do filme, o que dificulta um estudo mais detalhado sobre esta relação. Assim, sugere-se que futuros trabalhos busquem melhor explorar a relação entre espessura do filme e intensidade do sinal de ECL

8.2 COM RELAÇÃO AOS ELETRODOS

A principal melhoria que pode ser feita com relação aos eletrodos é quanto a sua geometria. Quanto ao eletrodo de carbono vitreo, como mostrado na figura 6.2, é importante transplantar a geometria em três dimensões para uma geometria de duas dimensões. Essa transposição possibilita uma economia de solução utilizada no teste e também permite que se utilize outra técnica de deposição do filme além do handcasting.

O eletrodo de ouro foi feito com uma geometria, como mostra a figura 6.2, baseada no trabalho (SANGINARIO, 2000). Essa geometria apresenta a vantagem de ser bidimensional, mas o fato do contra eletrodo envolver o eletrodo de trabalho dificulta a deposição do filme de TiO₂/nafion, já que o filme não pode sobrepor ambos os eletrodos. Mais uma vez, essa geometria dificulta a deposição do filme por uma técnica que não seja o handcasting. Como apontado na seção 8.1, a espessura do filme de TiO₂/nafion tem papel crucial na intensidade luminosa do sinal de ECL. Uma geometria que permita um método de deposição como o dip coating é interessante porque permite que se tenha um controle melhor sobre a espessura depositada no eletrodo. O que, por sua vez, possibilita que um estudo mais detalhado sobre a influência da espessura do filme sobre o sinal de ECL seja realizado.

Quanto ao eletrodo de ITO, assim como os demais, é preciso revisar a geometria. Entretanto, este eletrodo mostrou muito problemas com relação à aderência do filme de TiO₂/nafion. Portanto, é importante que se busquem tratamentos para o ITO com o objetivo de aumentar a aderência do filme, viabilizando assim o eletrodo. Outro fato importante em relação ao ITO é que ele é o único dos eletrodos testados que não pode ser colocado em um sistema com um eletrodo de quase referência de prata devido à deposição de uma camada de prata no eletrodo de trabalho durante a reação eletroquímica.

8.3 COM RELAÇÃO AO POTENCIOSTATO

Um potenciostato é um equipamento caro que pode realizar uma grande quantidade de estudos eletroquímicos. No caso deste sensor, uma vez que se tenha feito a incorporação de Ru(bpy) no filme de TiO₂/nafion, é apenas necessário que o potenciostato polarize a célula com três eletrodos. Portanto, é mais conveniente projetar um circuito elétrico a partir da figura 3.3. Assim, pode-se almejar o projeto de um produto que possa ser comercializado, ou mesmo realizar testes sem depender de um equipamento específico.

9 CONCLUSÃO

O objetivo dessa dissertação é o de reproduzir um sensor baseado em ECL para a detecção de fenotiazina em uma solução fisiológica. Para tal, foram estudados três materiais (carbono vitreo, ouro, ITO) para a produção do eletrodo de trabalho. Para produzir o sensor, o eletrodo de trabalho foi modificado com um filme TiO₂/nafion. Assim, esta pesquisa investigou maneiras de otimizar este filme para produzir o sinal de ECL mais intenso possível.

Os dados obtidos foram comparados com aqueles apresentados por Choi et. al em 2005, já que o estudo feito por este grupo apresenta semelhanças aos apresentados nesta dissertação.

A primeira parte da pesquisa concentrou-se em otimizar o filme de TiO₂/nafion. Nesta fase, observou-se que a melhor resposta em termos de ECL ocorreu para o filme com 50% em volume de nafion para os três eletrodos. Apesar disso, essa composição de filme mostrou problemas de adesão na superfície dos eletrodos, então, para o prosseguimento da pesquisa, optou-se por utilizar o filme com 20% em volume de nafion, já que este filme apresentou intensidade satisfatória e não mostrou problemas de adesão no eletrodo de carbono vitreo e ouro.

Seguindo a otimização do filme, fez-se um estudo sobre a influência da espessura do filme sobre o sinal de ECL. Nesse caso, nem todos os materiais se comportaram da mesma maneira. O eletrodo de carbono vitreo apresentou maior intensidade do sinal de ECL para filmes mais finos, enquanto os eletrodos de ouro e ITO apresentaram uma resposta mais intensa quando modificados com filmes mais espessos.

O estudo da espessura concluiu a otimização do filme para a produção do sensor. Assim, para os estudos subsequentes, foram escolhidos os melhores filmes para cada eletrodo. Para o sensor utilizando o eletrodo de carbono vitreo, foi utilizado o filme com 20% em volume de nafion e foi feita apenas uma deposição. Para o eletrodo de ouro, foi utilizado o filme com 20% em volume de nafion e foram feitas duas deposições. Para o eletrodo de ITO foi utilizado o filme com 20% de nafion e foram feitas três deposições.

Após a otimização do filme, o sensor foi caracterizado utilizando TPA como analito. O eletrodo de ITO se mostrou promissor, mas apresentou problemas com relação à adesão do filme de TiO₂/nafion e uma resposta muito fraca para baixas concentrações de analito, o que desencorajou a utilização deste material para a confecção do sensor. O eletrodo de carbono vitreo apresentou a pior resposta entre os três materiais estudados. Um dos motivos para esse desempenho pobre está na geometria tridimensional escolhida para o eletrodo.

Finalmente, o eletrodo de ouro foi aquele que apresentou o melhor desempenho quando se trata dos limites de quantificação e detecção. Por isso, ele foi escolhido como base do sensor produzido para tentar detectar a presença de fenotiazina em uma solução de fosfato.

Os resultados finais referentes ao desempenho dos sensores desenvolvidos são apresentados na tabela 7.1, onde é possível observar os limites de detecção e quantificação obtidos para cada tipo de eletrodo de trabalho.

Após a caracterização dos sensores e a constatação de que o melhor material para a confecção do eletrodo de trabalho, em termos de qualidade do sensor, detectou-se com sucesso a presença de fenotiazina na solução de fosfato como mostra a figura 7.23. Entretanto, o desempenho do sensor foi inferior ao desempenho presente na literatura. Neste trabalho, conseguiu-se detectar a presença de fenotiazina até a concentração de 10 mM. Esse desempenho pobre pode ser justificado pela montagem experimental, já que foi utilizado um aparelho especializado para medir o espectro de um sinal luminoso para medir a intensidade do mesmo.

Apesar do desempenho aquém do esperado dos sensores em termos de sensibilidade, esta pesquisa foi capaz de comparar os materiais alternativos para a produção de um sensor de ECL para a detecção de fenotiazina.

Descobriu que, se a prioridade for o desempenho do sensor, deve-se utilizar ouro como eletrodo de para esse tipo de sistema, que se mostrou uma boa alternativa ao carbono vitreo, material mais utilizado na literatura. Também, o ITO revelou ter potencial para esse ser aproveitado nesse tipo de sistema, mas precisa de estudos mais profundos para solucionar o problema da adesão do filme. O que é interessante já que apresenta um custo inferior ao ouro e pode ser depositado em substratos flexíveis ou descartáveis, o que aumentaria o alcance desse sensor em termos de aplicações comerciais.

Neste trabalho foi produzido um sensor capaz de detectar a presença de fenotiazina em uma solução fisiológica. Também, foi feito um estudo direcionado a otimizar o filme de TiO₂/nafion para gerar o sinal de ECL mais intenso possível e novos materiais para a produção do sensor foram estudados. Completando com sucesso todos os objetivos aqui propostos.
10 REFERÊNCIAS

BARD, A. J. Electrochemical methods fundamentals and applications, 2 ed. Nova York: Ed. Hamilton. 2001.

BEIDEMAN, F. E.; HERCULES, D. M. Electrogenerated chemiluminescence from 9,10-diphenylanthracene cations reacting with radical anions. Journal of Physical Chemistry, vol. 86, n. 17, p. 2203-2209, 1979.

BLACKBURN, G. F. et al. Electrochemiluminescence detection for development of immunoassays and DNA probe assays for clinical diagnostic. **Clinical Chemistry**, vol. 37,n. 9, p. 1532-1539, 1991.

BOLLETA, F. et al. Polypyridine transition metal complexes as light emission sensitizers in the electrochemical reduction of the persulfate ion. **Inorganica Chimica** Acta,vol. 62, p. 207-213, 1982.

BOWIE, A. R.; SANDERS, M. G.; WORSFOLD, P. J. Analytical applications of liquid phase chemiluminescence reactions a review. Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, vol. 11, p. 61-90, 1996.

BRINKER, C. J. Sol-gel transition in simple silicates. Journal of Non-Crystalline Solids, vol.48, p.47-52, 1982.

CHANDROSS, E. A.; LONGWORTH, J. W. Excimer formation and emission via the annihilation of electrogenerated aromatic hydrocarbon radical cations and anions. **Journal of the American Chemical Society.** vol. 87, n. 14, p. 3259-3260, 1965.

CHANG, M.-M.; SAJI, T.; BARD, A. J. Electrogenerated chemiluminescence. 30. Electrochemical oxidation of oxalate ion in the presence of luminescers in acetonitrile solutions. Journal of the American Chemical Society. vol. 99, n. 16, p. 5399-5403,

CHOI, H. N.; CHO, S.-H.; LEE, W.-Y. Electrogenerated chemiluminescence from tris(2,2-bipyridyl)ruthenium(II) immobilized in titania-perfluorosulfonated ionomer composite films. **Analytical Chemistry.** vol. 75, p. 4250-4256, 2003.

CHOI, H. N. et al. Sol–gel-immobilized tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) electrogenerated chemiluminescence sensor for high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**. vol. 541, p. 49-56, 2005.

DENNANY, L.; FORSTER, R. J.; RUSLING, J. F. Catalytic voltammetry detection of DNA. Journal of the American Chemical Society. vol. 125, p. 5213-5218, 2003.

DOWNEY, T. M.; NIEMAN, T. A. Chemiluminescence detection using regenerable tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) immobilized in Nafion. **Analytical Chemistry.** vol. 64, p. 261-268, 1992.

DUFFOR, R. T. Luminescence of grignard compounds in electric and magnetic fileds, and related electrical phenomena. **Journal of the American Chemical Society**. vol. 49, p. 1858-1864, 1927.

FAULKNER, L. R.; TACHIKAWA, H.; BARD, A. J. Electrogenerated chemiluminescence. VII. the influence of an external magnetic field on luminescence intensity. **Journal of the American Chemical Society.** vol. 94, n. 3, p. 691-699, 1972.

Feltre, R., Química, 6 ed. São Paulo: FTD, 2004. (v.3 Química orgânica).

GORMAN, B. A. et al. Tris(2,2-bipyridyl)ruthenium(II) chemiluminescence. **Royal Society of Chemistry**, vol. 616, n. 131, p. 616-639, 2006.

HARVEY, N. Luminescence during electrolysis. Journal of Physical Chemistry, 1929.

HENCH, L. L.; WEST, J. K. The sol-gel orocess. Chemical. Reviews. vol. 90, p. 33-72, 1990.

HERCULES, M. D. Chemiluminescence resulting from electrochemically generated species. **Science**. vol. 145, p. 808-809, 1964.

HODGKINSON, A. Oxallc acid in biology and mediclne. Academic Press London. vol. 101, n. 2, 1977.

HU, L.; XU, G. Applications and trends in electrochemiluminescence. Chemical Society Reviews. vol. 39, p. 3275-3304, 2012.

JOHNSTON, et al. Electrochemical measurement of the solvent accessibility of nucleobases using electron transfer between DNA and metal complexes. Journal of the American Chemical Society. vol. 117, p. 8933-8938, 1995.

KETTER, J. B.; WIGHTMAN, R. M. Tuning emissive states in electrogenerated chemiluminescence. Journal of the American Chemical Society. vol. 126, p. 10183-10189, 2004.

KLEIN, L. C.; GARVEY, G. J. Kinetics of the sol-gel transition. Journal of Non-Crystalline Solids, vol. 38, p.45-49, 1980.

KOBOS, R. K.; RAMSEY, T. A. Enzyme electrode system for oxalate determination utilizing oxalate decarboxylase immobilized on a carbon dioxide sensor. **Analytica Chimica Acta**. vol. 121, p. 110-118, 1980.

LAI, R. Y.; FLEMING, J. J. Electrogenerated chemiluminescence. 74. Photophysical, electrochemical, and electrogenerated chemiluminescent studies of selected nonplanar pyrenophanes. Journal of Physical Chemistry. vol. 108, p. 376-383, 2004.

LEE, W.-Y. Tris (2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) electrogenerated chemiluminescence in analytical science. **Microchimica Acta.** vol. 127, n. 1, p. 19-39, 1997.

LELAND, J. K.; POWELL, M. J. Electrogenerated chemiluminescence: an oxidative reduction type ECL reaction sequence using tripropyl amine. **Journal of the Electrochemical Society.** vol. 137, n. 10, p. 3127-3131. 1990.

LI, Y. et al. Electrogenerated chemiluminescence aptamer-based biosensor for the determination of cocaine. **Electrochemistry Communications.** vol. 9, p. 2571-2575, 2007.

LIU, X. Q.; SHI, L. H.; NIU, W. X. Wirelike dinuclear ruthenium complexes connected by bis(ethynyl) oligothiophene. Angewandte Chemie International Edition 46. vol. 46, n. 14, p. 5651-5664, 2007.

MALOY, J. T.; BARD, A. J. Electrogenerated chemiluminescence. VI. Efficiency and mechanisms of 9,10-diphenylanthracene, rubrene, and pyrene systems at a rotating-ring-disk electrode. **Journal of the American Chemical Society.** vol. 93, n.23, p. 5968-5981, 1971.

MARTIN, C. R. et al. The heterogeneous rate constant for the Ru(bpy)+/2+ couple at glassy carbon electrode in aqueous solution. **Journal of Electroanalytical Chemistry.** vol, 151, p. 267-271, 1983.

MELO, L. O. Preparação e caracterização de filmes finos de sol-gel de Nb₂O₅. Dissertação [Mestrado.]. Universidade de São Paulo, 2001.

MEMMING, R. Mechanism of the electrochemical reduction of persulfates and hydrogen peroxide. Journal of The Electrochemical Society. vol. 161, n. 6, p.785-790, 1969.

MIAO, W. et al. Electrogenerated Chemiluminescence 69: the tris(2,2-bipyridine)ruthenium(II), (Ru(bpy)32+)/Tri-n-propylamine (TPrA) system revisited. A new route involving TPrA cation radicals. **Journal of the American Chemical Society.** vol. 124, p. 14478-14485, 2002.

NOFFSINGER, J. B.; DANIELSON, N. D. Generation of chemiluminescence upon reaction of aliphatic amines with tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(III). **Analytical Chemistry.** vol. 59, p. 865-869, 1987.

PIGHIN, A.; CONWAY, B. E. A correlation between the quantum efficiency of electrogenerated chemiluminescence and the redox potentials of rubrene in various solvents. **The Electrochemical Society.** vol. 122, n. 5, p.619-624, 1975.

RICHTER, M. M. Electrochemiluminescence (ECL). **Chemical. Reviews.** vol. 104, n. 6, p. 3003-3033, 2004.

RUBINSTEIN, I.; BARD, A. J. Electrogenerated chemiluminescence. 37. Aqueous ecl systems based on tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(2+) and oxalate or organic acids. **Journal of the American Chemical Society.** vol. 103, p. 512-516, 1981.

RUBINSTELN, I.; MARTIN, C. R.; BARD, A. J. Electrogeneratecl chemiluminescent determination of oxalate. **Analytical Chemistry.** vol. 55, p. 1580-1582, 1983.

SANGINARIO, A.; DEMARCHI, D.; CIVERA, P. Carbon Nanotube Electrodre for Electrochemiluminescence Biosensors. In: Annual International Conference of the IEEE EMBS, 32. Conference Buenos Aires, Argentina, 2010. SHRIVASTAVA, GUPTA, Methods for LOD and LOQ determination. Chronicles of **Young Scientists.** vol. 2, n 1, 2011

SENTANIN, F. C. Desenvolvimento de janelas eletrôcromicas. Tese [Doutorado]. Universidade de São Paulo, 2012.

WEI, H. et al. Label free electrochemiluminescence protocol for sensitive DNA detection with a tris(2,20-bipyridyl)ruthenium(II) modified electrode based on nucleic acid oxidation. **Electrochemistry Communications.** vol. 9, p. 1474-1479, 2007.

WERNER, T. C. et al. Electrochemiluminescence of perylene. The Role of direct excimer formation. Journal of the American Chemical Society. vol. 92, n. 19, p. 5560-5565, 1969.

WHITE, H. S.; BARD, A. J. Electrogenerated chemiluminescence and chemiluminescence of the Ru(2,21 - bpy)32+-S2O82- system in acetonitrile-water solutions.. Journal of the American Chemical Society. vol. 104, n.25, p. 6891-6895, 1982.

Williams, C. et al. Assessment of sequence-based p53 gene analysis in human breast cancer: messenger RNA in comparison with genomic DNA targets. **Clinical. Chemistry.** vol. 44, n. 3, p. 455-459, (1998).

WILSON, R. et al. A paramagnetic bead based enzyme electrochemiluminescence immunoassay for TNT. **Electroanalytical Chemistry.** vol.557, p. 109-118, 2003.

WU, S.-J. L. et al. Detection of dengue viral RNA using a nucleic acid sequence-based amplification assay. **Journal of clinical microbiology.** vol. 39, n.8, p. 2794–2798, 2001.

YUAN, Y. et al. Coreactants of tris(2,2-bipyridyl)ruthenium(II) Electrogenerated Chemiluminescence. **Electrochimica Acta.** vol. 82, p. 484-492, 2012.

ZHANG, J. et al. Electrogenerated chemiluminescence DNA biosensor based on hairpin DNA probe labeled with ruthenium complex. **Analytical Chemistry.** vol. 80, p. 2888-2894, 2008.

ZHANG, M. et al. Ultrasensitive electrochemiluminescence immunoassay for tumor marker detection using functionalized Ru-silica@nanoporous gold composite as labels. **The Royal Society of Chemistry.** vol. 137, p. 680–685, 2012.

ZOSKI, C. G. Handbook of Electrochemistry. [Online]. Acesso: http://www.sciencedirect.com/science/book/9780444519580, 2007.