INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

ALEX DA SILVA LIMA

**Uso da microscopia eletroquímica de varredura
(SECM) no estudo de sistemas micelares e do
transporte de espécies químicas através de
membranas lipídicas**

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
14/06/2015

ALEX DA SILVA LIMA

**Uso da microscopia eletroquímica de varredura (SECM) no
estudo de sistemas micelares e do transporte de espécies químicas
através de membranas lipídicas**

*Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Química)*

Orientador: Prof. Dr. Mauro Bertotti

São Paulo
2015

Lima, Alex da Silva

L732us Uso da microscopia eletroquímica de varredura (SECM) no estudo de sistemas micelares e do transporte de espécies químicas através de membranas lipídicas / Alex da Silva Lima. -- São Paulo, 2015.
136p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.

Orientador: Bertotti, Mauro

1. Métodos eletroquímicos : Análise 2. Microscopia eletroquímica de varredura : Química analítica 3. Microeletrodo : Físico-química 4. Surfactantes 5. Lipídeos I. T. II. Bertotti, Mauro, orientador.

543.0871 CDD

À minha minha mãe, Barbára
Aos meus irmãos, Tatiane e Felipe
Ao Prof. Mauro Bertotti

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mauro Bertotti, pela orientação, amizade e pela oportunidade.

Aos Prof. Dr. Ivano G. R. Gutz e Prof. Dr. Roberto M. Torresi, pelos ensinamentos e por terem participado do meu exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Omar El Seoud, pela ajuda nos experimentos envolvendo surfactantes, e ao Prof. Dr. Joaquim Procópio, pela ajuda na preparação das BLMs.

I would like to express my sincerest thanks to Prof Dr. Shigeru Amemyia for his lessons during my short term research at the University of Pittsburgh.

Aos demais docentes da área de Química Analítica do IQ-USP, pela amizade e ensinamentos oferecidos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Sensores Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos (LSEME), Aline, Anandhakumar, Ana, Carla, Drochss, Gabriel (Capeta), Luiza, Lucas, Nathália, Pollyana e Victor.

Aos amigos e ex-membros do LSEME Prof. Dr. Tiago L. Ferreira (Pé) e sua esposa Dra. Helena Junqueira, Prof. Dr. Thiago R. C. L. Paixão e sua esposa Profa. Dra. Juliana Naozuka, Dra. Maiara O. Salles e seu marido Ms. André G. Oliveira.

Às minhas companheiras de trabalho, que contribuíram ativamente na realização desse trabalho: Carla S. Santos (novamente), Aline Speranza, Aline Parlato e a Aurea Migoto.

Ao Gabriel (novamente), por ter feito as representações esquemáticas utilizadas nessa tese.

Às técnicas Cristina e Lúcia, pelo auxílio, pelas conversas e momentos de descontração.

Aos membros do LAIA e do L₂ESQ, pela ajuda e pelos momentos de descontração.

A toda galera do Scientific Beer.

A todos os amigos e colegas do IQ-USP.

Ao Grupo de Corrida CEPEUSP pelos momentos de descontração e de atividades físicas.

Aos amigos da época de graduação da FCT-Unesp, em especial ao “*Grupão*”....

Aos meus amigos de Osasco, pelo apoio.

Em especial à minha família (tios e primos), pois sem o apoio deles eu não teria conseguido realizar mais esse sonho.

À agência de fomento FAPESP, pela bolsa de doutorado e pela Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior.

Ao CNPq, CAPES e ao Instituto de Química pelo suporte financeiro e oportunidade.

A todos aqueles que eu esqueci de enumerar, pois escrever essas simples palavras é umas das partes mais difíceis da elaboração de uma tese. Obs: copieei a maioria dessas coisas dos agradecimentos do meu mestrado....

Muito Obrigado!!

“Life is nothing but a movement of electrons !”

Albert Szent-Gyorgyi,

RESUMO

Lima, A. S. **Uso da microscopia eletroquímica de varredura (SECM) no estudo de sistemas micelares e do transporte de espécies químicas através de membranas lipídicas.** 2015. 136 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A presente tese versa sobre resultados obtidos na aplicação da microscopia eletroquímica de varredura no estudo de sistemas micelares e no estudo de bicamadas lipídicas. Os estudos envolvendo sistemas micelares foram realizados utilizando a SECM no modo substrato-gerador/microeletrodo-coletor. Neste modo de operação, um microeletrodo de platina foi posicionado próximo a um substrato de platina e utilizado para monitorar espécies eletrogeradas nesse substrato. Conhecendo o tempo necessário para a espécie eletrogerada difundir do substrato até o microeletrodo, foi possível aplicar a equação de Einstein-Smoluchowski para determinar o coeficiente de difusão da espécie eletroativa e de micelas de surfactantes. Como as micelas não são eletroativas, o ferroceno eletrogerado no substrato e incorporado nas micelas foi utilizado como sonda para a estimativa do tempo de difusão. Os resultados obtidos para o surfactante brometo de tetradecil trimetil amônio ($C_{14}TABr$) corroboram dados reportados na literatura, demonstrando a utilidade da metodologia proposta no estudo de sistema micelares. Também foram realizados experimentos envolvendo micelas do surfactante cloreto de 1-alkyl-3-metilimidazólio, $C_xMelmCl$ ($x = 10, 12, 14, 16$) e com os resultados obtidos foi possível evidenciar o efeito da cadeia carbônica no coeficiente de difusão das espécies. Os experimentos envolvendo a permeação de substâncias através de bicamadas lipídicas foram realizados em duas etapas. Os primeiros ensaios foram realizados utilizando modelo de membrana semipermeável (papel celofane) com o intuito de verificar a aplicabilidade da SECM no monitoramento de espécies eletroativas que permeiam através da membrana. Na segunda etapa, apresentou-se metodologia para a obtenção de microfuros em folhas de poliestireno utilizados para a formação das bicamadas lipídicas, assim como detalhes sobre a construção da célula de medidas utilizadas nos experimentos de permeação. Foram realizados experimentos envolvendo o uso de bicamadas lipídicas planas obtidas pelo método de Miller preparadas com lecitina de soja. Esses experimentos foram realizados com o intuito de avaliar a estabilidade e para verificar a permeabilidade de algumas substâncias nas bicamadas formadas. Os experimentos de permeação foram realizados posicionando um microeletrodo próximo à membrana, com posterior detecção amperométrica da espécie eletroativa que atravessa a membrana.

Palavras-chave: Microscopia Eletroquímica de Varredura; Microeletrodo; Micelas; Bicamadas Lipídicas

ABSTRACT

Lima, A. S. **The use of scanning electrochemical microscopy (SECM) on studies of micellar systems and in the transport of chemical species through lipid membranes.** 2015. 136 p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

This thesis shows results on the use of scanning electrochemical microscopy in the study of micellar systems and lipid bilayers. Studies involving micellar systems were performed by using SECM in the substrate-generator/tip-collector mode. In this operation mode a platinum microelectrode was positioned close to a platinum substrate and used to monitor electrogenerated species on this surface. Taking into account the time for the electrogenerated species to diffuse from the substrate to the microelectrode, the diffusion coefficient of the electroactive species and of the micelles can be calculated by applying the Einstein-Smoluchowski equation. As micelles are not electroactive, ferrocene electrogenerated on the substrate and incorporated into the micelles was used as a probe to estimate the diffusion time. The results obtained for tetradecyl trimethyl ammonium bromide ($C_{14}TABr$) corroborate those reported in the literature, demonstrating the applicability of the proposed methodology in the study of micellar systems. Experiments with micelles obtained from 1-alkyl-3-methylimidazolium, $C_xMelmCl$ ($x = 10, 12, 14, 16$) chloride surfactants were also performed and results showed the effect of the carbon chain in the diffusion coefficient. Experiments involving the permeation of chemical species through lipid bilayers were carried out in two steps. A membrane model (cellophane) was preliminary used in order to investigate the possibility of using SECM as a tool for monitoring the permeation of electroactive species through the membrane. Then, a methodology for obtaining microholes in polystyrene sheets used to form lipid bilayers was presented, as well as details about the design of an electrochemical cell used in the permeation experiments. Experiments involving the use of planar lipid bilayers obtained by the method of Miller prepared using soybean lecithin were performed. These experiments were carried out in order to evaluate the stability and to check the permeation of some substances through the prepared bilayers. Permeation experiments were performed by placing the microelectrode close to the membrane with subsequent amperometric detection of any electroactive species that cross the membrane.

Keywords: Scanning Electrochemical Microscopy; Microelectrode; Micelles; Lipid Bilayers

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 COLOIDE POR ASSOCIAÇÃO: SURFACTANTES E LIPÍDIOS.....	12
1.2 TRANSPORTE DE MASSA.....	16
1.3 MICROSCOPIA ELETROQUÍMICA DE VARREDURA	19
1.3.1 Microeletrodos.....	22
1.3.2 “Feedback” (Retroalimentação)	25
1.3.3 Modo gerador-coletor.....	32
2. OBJETIVOS	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 REAGENTES	37
3.2 INSTRUMENTAÇÃO.....	37
3.3 CONSTRUÇÃO DOS ELETRODOS.....	38
3.4 DETERMINAÇÃO DE COEFICIENTES DE DIFUSÃO EM SISTEMAS MICELARES	38
3.5 MODELOS DE MEMBRANA SEMIPERMEÁVEL	39
3.6 CONSTRUÇÃO DA CÉLULA DE MEDIDA PARA BLM	40
3.7 OBTENÇÃO DAS BICAMADAS LIPÍDICAS	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROELETRODOS PARA APLICAÇÕES EM SECM	41
4.2 DETERMINAÇÃO DE COEFICIENTES DE DIFUSÃO EM SISTEMAS MICELARES	55
4.2.1 Determinação do coeficiente de difusão de espécies eletroativas com comportamento eletroquímico conhecido	57
4.2.2 Comportamento eletroquímico de íons ferrocínio em soluções aquosas	65
4.2.3 Determinação do coeficiente de difusão de micelas de $C_{14}TABr$	69
4.2.4 Determinação do coeficiente de difusão micelar de $C_{12}MelmCl$	78
4.3 ESTUDO DA DIFUSÃO DE ESPÉCIES ATRAVÉS DE BICAMADAS LIPÍDICAS	87
4.3.1 Difusão de espécies através de modelos de membranas	87
4.3.2 Obtenção e caracterização de bicamadas lipídicas planas (BLM).....	95
4.3.3 Monitoramento de espécies através das BLMs	108
5. CONCLUSÕES.....	125
6. ESTUDOS FUTUROS	126
6.1 CONSTRUÇÃO DE NANOELETRODOS	126
6.2 ESTUDO DE TRANSPORTE DE MATERIAIS ATRAVÉS DE BICAMADAS LIPÍDICAS	126
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
APÊNDICE 1: APLICAÇÃO ANALÍTICA DA SECM: DETERMINAÇÃO DE PARACETAMOL NA PRESENÇA DE ÁCIDO ASCÓRBICO.....	I
APÊNDICE 2: CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPIPETAS PARA APLICAÇÕES NA MICROSCOPIA ELETROQUÍMICA	X
SÚMULA CURRICULAR.....	XVII

1. INTRODUÇÃO

1.1 Coloide por associação: Surfactantes e Lipídios

O termo coloide, segundo a IUPAC, é utilizado quando moléculas ou agregados de moléculas/partículas estão dispersos em um meio e possuem, pelo menos em uma direção, dimensões entre 1 nm e 1 μ m. Além dessa definição, que leva em conta o tamanho das partículas, a IUPAC também utiliza a descontinuidade do sistema para classificá-lo como coloidal; nesse caso, o mesmo deve possuir descontinuidade na mesma ordem de grandeza supracitada (EVERETT, 1972).

Diariamente nos deparamos com dispersões coloidais, as quais necessariamente possuem uma fase dispersa (fase descontínua), formada por moléculas ou partículas e uma fase contínua (solvente) (LEVINE, 2008). Exemplos comuns dessas dispersões são a neblina, que é um líquido disperso em gás, o isopor, que é um sistema constituído de um gás disperso em um sólido, a fumaça, que é um sólido disperso em um gás, dentre outros. No entanto, um sistema coloidal que chama a atenção são os coloides por associação, devido às aplicações no ramo industrial como, por exemplo, na indústria farmacêutica e de alimentos (WASHINGTON, 1990; WHITE, 1972), e na área biológica (BLANAZS; ARMES; RYAN, 2009; KUNZ, 2010).

Coloides por associação, de uma maneira geral, são agregados constituídos pela auto-associação de unidades de moléculas anfifílicas. Essas moléculas possuem como principal característica duas regiões distintas em sua estrutura. Uma delas é conhecida como grupo liofílico, a qual apresenta grande afinidade pelo meio em que a molécula está dispersa. A outra possui pouca afinidade pelo meio ao seu redor e é denominada grupo liofóbico (HIEMENZ;

RAJAGOPALAN, 1997). Quando em solução aquosa, essas regiões são conhecidas como hidrofílica (cabeça polar) e hidrofóbica (cauda apolar).

Os surfactantes ou tensoativos são os principais exemplos de moléculas anfifílicas. Em uma determinada concentração, essas substâncias possuem a tendência de se agrupar em agregados coloidais, conhecidos como micelas. Essa concentração onde ocorre a formação espontânea de micelas é denominada *concentração micelar crítica* (cmc). Os processos de agregação são acompanhados por mudanças nas características físico-químicas da solução, as quais podem ser monitoradas por diversas técnicas como, por exemplo, as técnicas eletroquímicas (FERREIRA et al., 2010; MANDAL; NAIR, 1991; NESMĚRÁK; NĚMCOVÁ, 2006).

De uma maneira geral, as propriedades dos sistemas micelares podem ser determinadas utilizando medidas diretas e indiretas. Nas medidas diretas monitora-se alguma propriedade da solução com o aumento da concentração de surfactante como, por exemplo, tensão superficial, pressão osmótica, índice de refração, viscosidade e condutividade elétrica. Já no caso das medidas indiretas, monitora-se alguma propriedade de uma substância (sonda) adicionada à solução em função do aumento da concentração de surfactante, sendo que métodos voltamétricos e espectroscópicos são comumente utilizados (NESMĚRÁK; NĚMCOVÁ, 2006).

Além da cmc, outras importantes propriedades em sistemas micelares são o número de agregação (N_{agg}), o qual traz informações sobre o número de monômeros que constituem uma micela, o volume da micela e o raio hidrodinâmico, os quais trazem informações sobre a dimensão das micelas e o coeficiente de difusão da micela (D_{mic}).

A determinação do coeficiente de difusão de micelas pode ser realizada por técnicas espectroscópicas, como por exemplo RMN e espalhamento de luz, porém as técnicas

eletroquímicas se destacam devido ao seu baixo custo, em relação a outras técnicas, portabilidade e possibilidade de miniaturização (BARD; FAULKNER, 2000; CUI et al., 2008; FERREIRA et al., 2007; GIMEL; BROWN, 1996).

Além dos surfactantes, os lipídios são outra importante classe de moléculas anfifílicas. Os lipídios, assim como outras biomoléculas, são produzidos por organismos vivos e desempenham papel fundamental para a vida. De maneira geral, são moléculas insolúveis em água e suas funções relacionam-se ao armazenamento de energia na forma de ácidos graxos, como sinalizadores de processos intra/extracelulares e, principalmente, como constituinte majoritário das membranas biológicas (SIMONS; TOOMRE, 2000; VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2008).

As membranas biológicas são estruturas que constituem o envoltório das células e das organelas intercelulares e são compostas basicamente por uma bicamada lipídica entremeada de proteínas e uma pequena quantidade de carboidrato (SIMONS; IKONEN, 1997; SINGER; NICOLSON, 1972). A sua principal função é regular os processos biológicos com base na composição do meio intracelular, controlando o fluxo de nutrientes, produtos de degradação, íons e outras espécies químicas para dentro das células (LEHNINGER; NELSON; COX, 2005; VOET; VOET, 2006).

As bicamadas lipídicas são constituídas basicamente de fosfolipídios (glicerofosfolipídios e esfingomielinas) e sua formação é um processo energeticamente favorável quando os fosfolipídios estão em ambiente aquoso, pois estas são moléculas que, assim como os tensoativos, possuem uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica (TIEN; OTTOVA, 2001). A estrutura destes compostos consiste em um núcleo de glicerol ligado por meio de uma ligação éster, ou mais raramente éter, com duas cadeias hidrofóbicas derivadas de ácido graxo (denominadas caudas) e por uma ligação éster a um grupamento fosfato (denominado cabeça). As caudas dos

fosfolipídios tendem a se agregar, formando vesículas denominadas lipossomos ou ainda bicamadas lipídicas (LEHNINGER; NELSON; COX, 2005; VOET; VOET, 2006).

Com o intuito de facilitar o estudo de sistemas biológicos, cuja complexidade é muito grande, é interessante explorar modelos que possuam um número diminuto de variáveis. Uma alternativa para esse tipo de abordagem é o emprego de sistemas biomiméticos como, por exemplo, as bicamadas lipídicas planas, as quais são modelos simplificados e fidedignos de membranas celulares (SIMONS; VAZ, 2004; WINTERHALTER, 2000).

As bicamadas lipídicas planas, também conhecidas como *Black Lipids Membrane* (BLM) possuem as mesmas propriedades físico-químicas das bicamadas constituintes das membranas biológicas e são susceptíveis à modificação com proteínas e diferentes tipos de lipídios (SIMONS; VAZ, 2004). Estudos eletrofisiológicos envolvendo o uso de *patch clamp*, normalmente, são realizados explorando as BLMs e possibilitam obter informações relacionadas ao transporte de materiais e sobre propriedades elétricas (GREWER et al., 2013).

Outra técnica explorada para o estudo de transporte de materiais através das BLMs é a microscopia eletroquímica de varredura (SECM). Recentemente, alguns grupos de pesquisas mostraram a utilização da SECM na determinação de parâmetros de permeabilidade de alguns compostos e sobre a transferência de carga de membranas não modificadas e modificadas (AMEMIYA; BARD, 2000; AMEMIYA et al., 2000; MATHAI et al., 2009; MISSNER; POHL, 2009; TSIONSKY et al., 1999a; WILBURN; WRIGHT; CLIFFEL, 2006; ZOCHER et al., 2013, 2013, 2013).

1.2 Transporte de massa

Assim como exposto na seção anterior, os estudos das propriedades dos agregados de surfactantes e lipídios são de extrema importância para o entendimento e desenvolvimento de novas metodologias, sejam elas para aplicações industriais ou para o desenvolvimento de sistemas biomiméticos. Uma propriedade de grande interesse em ambos os sistemas é o transporte de massa, a qual proporciona informações sobre a difusão de micelas de surfactante ou de espécies através de uma bicamada lipídica.

De maneira geral, difusão é o movimento observado sempre que existir uma diferença de concentração de uma dada espécie ou pela sua movimentação natural entre dois pontos num determinado meio. Quando a difusão ocorre com a formação de um gradiente de concentração, este fenômeno é denominado de *intradifusão* (Mutual Diffusion) e quando ocorre em consequência da movimentação natural das espécies é conhecida como *interdifusão* (Self-diffusion) (LEVINE, 2008).

Em 1855 o físico e fisiologista Adolf E. Fick reportou a primeira Lei de Fick (Equação 1). Utilizando dados empíricos, Fick mostrou que a velocidade da movimentação de uma espécie é proporcional à diferença de concentração, ou seja, o fluxo de uma dada espécie é proporcional ao gradiente de concentração (MOORE, 1962).

$$J_o(x, t) = -D_o \frac{\partial C_o(x, t)}{\partial x} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: J_o é o fluxo da espécie, em quantidade de matéria pelo produto do tempo e área, por exemplo, $\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$, D_o é o coeficiente de difusão, em unidade de área pelo tempo ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), e

$\frac{\partial C_o}{\partial x}$ é o gradiente de concentração, onde C_o é a concentração em quantidade de matéria pelo volume (mol cm^{-3}), e x é a posição em unidade de comprimento, por exemplo, centímetros (cm).

É interessante notar que a Lei de Fick possui a mesma forma das equações que descrevem a condutividade térmica $q_x = -k \frac{\partial T}{\partial x}$ (Lei de Fourier) e a condutividade elétrica $V = I R$ (Lei de Ohm). Esta última pode ser escrita relacionando corrente com o gradiente de potencial elétrico $I = -G \frac{\partial \phi}{\partial x}$ e, assim como as outras duas equações, descreve o fluxo de uma grandeza em função do gradiente de concentração e possui uma constante de proporcionalidade.

Além disso, a Equação 1 é válida somente quando a difusão ocorre em condição de estado estacionário, ou seja não varia com o tempo. Essa limitação pode ser contornada utilizando a segunda lei de Fick (Equação 2), a qual descreve o efeito da difusão sobre a variação de concentração com o tempo.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (\text{Equação 2})$$

A primeira e a segunda Lei de Fick descrevem o fluxo de espécies em uma direção e o fluxo com a direção e o tempo, respectivamente. No entanto, não trazem informações sobre o deslocamento dessas espécies. Essa informação é descrita pela equação de Einstein–Smoluchowski (Equação 3), a qual correlaciona a dimensão do deslocamento randômico com a raiz quadrada do produto do coeficiente de difusão da espécie e o tempo (LEVINE, 2008).

$$\Delta x = \sqrt{Dt} \quad (\text{Equação 3})$$

As equações apresentadas descrevem matematicamente a difusão de uma espécie em determinado meio, mas não são aplicáveis a transporte de materiais através de biomembranas, o qual é objeto de grande interesse na comunidade científica. Esse interesse deriva do fato de que com base no entendimento desse processo é possível explicar como ocorre a entrada de nutrientes em células, a regulação da concentração de metabólitos, a secreção e absorção de drogas e substâncias tóxicas e o equilíbrio iônico de células (SAIER, 2000).

De maneira geral, o transporte através de biomembranas pode ocorrer por duas vias, sendo uma conhecida como transporte não mediado, em que algumas substâncias atravessam as biomembranas por difusão, e outro como transporte mediado, o qual possui a participação de alguns transportadores, como as proteínas transportadoras de membrana. No transporte mediado algumas substâncias atravessam as biomembranas passivamente, devido à diferença de concentração dos meios e sem gasto energético (transporte passivo), ou ativamente, ocorrendo contra um gradiente de concentração e com gasto energético (transporte ativo) (VOET; VOET, 2006).

Apesar de sistemas biomiméticos, aos quais se incluem as bicamadas lipídicas planas (BLM, *Black Lipids Membrane*), serem modelos simplificados, eles têm sido usados no estudo de membranas celulares, cuja complexidade é muito grande (SIMONS; VAZ, 2004; WINTERHALTER, 2000). Essas membranas sintéticas apresentam pouca permeabilidade a íons e à maioria de compostos polares, com exceção de algumas substâncias que são pequenas e não possuem carga como, por exemplo, moléculas de água, ureia e glicerol. Entretanto, compostos como os corantes verde de malaquita (SRIVASTAVA; EISENTHAL, 1998) e azul de metileno (MELLISH et al., 2002) conseguem penetrar nas bicamadas lipídicas com relativa facilidade por apresentarem certo grau de lipofilicidade.

1.3 Microscopia eletroquímica de varredura

A microscopia eletroquímica de varredura (SECM, *Scanning Electrochemical Microscopy*) faz parte de um grupo de técnicas conhecido como *Scanning Probe Microscopy* (SPM) (BOTTOMLEY, 1998). As SPM possuem como particularidade a utilização de uma sonda para obter informações físicas e/ou químicas de uma amostra. Assim como a microscopia de força atômica (AFM, *Atomic Force Microscopy*) e a microscopia de tunelamento (STM, *Scanning Tunneling Microscope*), que são as técnicas mais populares entre as SPM, a SECM também utiliza uma ponta com dimensões reduzidas, neste caso eletrodos, para aquisição de informação das amostras em estudo. Esses eletrodos devem possuir necessariamente dimensões micrométricas ou sub-micrométricas e são classificados em função de sua dimensão como microeletrodos e nanoeletrodos, respectivamente (BARD; MIRKIN, 2012). Além da sonda, o aparato instrumental da SECM possui um sistema de posicionamento de alta precisão, composto por um motor de passo e uma cerâmica piezoelétrica, uma célula eletroquímica, que pode utilizar um ou dois eletrodos de trabalho, e um bipotenciostado, todos interfaceados e controlados por um microcomputador (Figura 1).

Figura 1: Representação esquemática do aparato experimental utilizado na SECM.

O princípio de funcionamento da SECM envolve o monitoramento da corrente utilizando um microeletrodo posicionado próximo à superfície de uma amostra (substrato), a qual se encontra imersa em uma solução. De maneira geral, a corrente monitorada pelo microeletrodo, quando operado a potencial controlado, está relacionada com processos faradaicos que ocorrem com substâncias eletroativas deliberadamente adicionadas à solução ou provenientes do substrato.

A SECM possui um sistema de posicionamento e o microeletrodo pode ser deslocado com grande precisão nas direções x , y e z com velocidade constante na ordem de $\mu\text{m s}^{-1}$ com o motor de passo, ou nm s^{-1} quando esse deslocamento é realizado com a cerâmica piezoelétrica. Esse aparato instrumental possibilita o mapeamento da amostra mantendo-se fixa a posição do microeletrodo na direção z , em região muito próxima à superfície do substrato, e alterando-se a posição do microeletrodo nas direções x e y enquanto monitora-se a corrente. Além do uso do

sensor no modo amperométrico, outra alternativa consiste no monitoramento de potencial utilizando micro ou nanossensores potenciométricos, os quais trazem informações localizadas sobre a mudança do potencial monitorado com o dispositivo provocada por alguma substância na interface em estudo (HORROCKS et al., 1993; KISS; NAGY, 2015; SERRAPEDE et al., 2013)

Descrições matemáticas dos fenômenos que ocorrem quando um microeletrodo é aproximado a uma superfície imersa em solução contendo uma substância eletroativa vêm sendo publicadas desde 1989. Nessa ocasião, o Prof. Allen J. Bard e colaboradores reportaram o termo “*Scanning Electrochemical Microscopy*” (BARD; MIRKIN, 2012; BARD et al., 1990). Desde então, o número de artigos de revisão e áreas do conhecimento na qual a SECM vem sendo empregada cresce a cada ano. Por exemplo, nos últimos anos constam aplicações da SECM em estudos de corrosão, estudos de processos heterogêneos de transferência de elétrons, fenômenos de interface e processos biológicos (BARD; LI; ZHAN, 2006; BERGNER; VATSYAYAN; MATYSIK, 2013; EDWARDS et al., 2006a; LIMA et al., 2009; LUO et al., 2014; PUST; MAIER; WITTSTOCK, 2008; THOMAS et al., 2015; WITTSTOCK et al., 2007; ZHAN et al., 2013). Uma interessante discussão sobre as perspectivas do uso da SECM e seu acoplamento com outras técnicas pode ser encontrada no artigo de revisão publicado pela Profa. Dra. Christine Kranz (KRANZ, 2014). Neste artigo, a autora utiliza uma adaptação para a SECM do *Gartner hype cycle*, que mostra a maturidade e a aceitação de novas tecnologias.

Em função da vasta gama de aplicações e possibilidade de acoplamento com outras técnicas, existem diversas metodologias para a aquisição de dados utilizando a SECM (BARD; MIRKIN, 2012). No entanto, todas são variações dos modos de operação conhecidos como *feedback* e *generation/collection*, os quais podem ser traduzidos como retroalimentação e gerador/coletor, respectivamente. (KWAK; BARD, 1989; ZHOU; UNWIN; BARD, 1992). Essas metodologias serão abordadas com mais detalhes nas próximas seções dessa tese. Como o

principal componente da SECM é o sensor micrométrico, tópico especial sobre as características desse dispositivo será apresentado no próximo item.

1.3.1 Microeletrodos

O bom funcionamento dos experimentos SECM está relacionado principalmente com a resposta do microeletrodo e, portanto, os fundamentos teóricos e princípios de funcionamento experimental são essenciais para todos os usuários dessa técnica. Microeletrodos com diferentes geometrias podem ser utilizados em experimentos SECM, incluindo aqueles de configuração cônica, cilíndrica e disco-anel (*Dual Function*) (ETIENNE; MOULIN; GOURHAND, 2013; LEONHARDT et al., 2013; MIRKIN; FAN; BARD, 1992; NEBEL et al., 2013; THAKAR et al., 2013). No entanto, no presente trabalho serão abordados apenas microeletrodos com geometria de microdisco, os quais são os mais amplamente explorados em trabalhos com a SECM (BARD; MIRKIN, 2012; CORNUT et al., 2011).

Microeletrodos podem ser definidos como dispositivos que possuem pelo menos uma de suas dimensões na escala micrométrica ou sub-micrométrica. No entanto, essa definição não leva em conta parâmetros temporais, o que torna esse conceito de menor precisão. Desta forma, microeletrodos podem ser melhor definidos como eletrodos que possuem dimensão igual ou menor que a da camada de difusão formada durante um experimento eletroquímico (BARD; FAULKNER, 2000; PAIXÃO; BERTOTTI, 2009; ZOSKI, 2002b). Para microeletrodos a dimensão da área ativa deve ser similar ao tamanho da camada difusão formada.

O transporte de massa em sistemas eletroquímicos pode ser descrito pela equação de Nernst-Planck, que descreve matematicamente o movimento de uma espécie em solução (Equação 4) (BARD; FAULKNER, 2000; CIOBANU et al., 2007).

$$J_j(x) = -D_j \frac{\partial C_j(x)}{\partial x} - \frac{z_j F}{RT} D_j C_j \frac{\partial \phi(x)}{\partial x} + C_j v(x) \quad (\text{Equação 4})$$

onde: J_j é o fluxo da espécie j à distância x da superfície do eletrodo ($\text{mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$), D_j é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$), C_j é a concentração (mol cm^{-3}), $\frac{\partial C_j}{\partial x}$ é o gradiente de concentração, $\frac{\partial \phi}{\partial x}$ é o gradiente do campo elétrico e v é a velocidade com que um elemento infinitesimal de volume se move (cm s^{-1}).

A Equação 4 descreve o fluxo de uma dada espécie e possui três termos. O primeiro está relacionado com a difusão, o segundo com a migração e o terceiro com a convecção, ou seja, três diferentes tipos de fenômenos de transporte de massa. A difusão, assim como explicado anteriormente, está relacionada com a formação de um gradiente de concentração (Lei de Fick), a migração ocorre devido à movimentação das espécies pela influência de um campo elétrico originado da aplicação de um potencial ao eletrodo e o transporte convectivo é devido à movimentação deliberada da solução (agitação). No entanto, o efeito da migração e da convecção pode ser minimizado pela adição de um eletrólito suporte adequado à solução e com a realização das medidas sem distúrbio mecânico ou de variações de temperatura, respectivamente. Nessas condições, a resposta eletroquímica depende apenas da difusão (BARD; FAULKNER, 2000).

Diferentemente de eletrodos com tamanhos convencionais, alguns milímetros, onde prevalece a difusão linear semi-infinita, ou seja, em apenas uma direção, em microeletrodos a difusão ocorre essencialmente de maneira radial à superfície eletródica. Esse mecanismo de transporte de massa é muito eficiente, pois ocorre em um espaço tridimensional. Assim, quando o potencial aplicado ao microeletrodo é alterado de uma condição onde não há processo eletródico para outra em que passa a fluir corrente, atinge-se rapidamente uma condição conhecida como

estado estacionário, em que se forma uma camada de difusão hemisférica em torno da superfície do microeletrodo (FORSTER; KEYES, 2007). Esse comportamento é descrito pela Equação 5,

$$j_L = \frac{nFD^{1/2}C}{\pi^{1/2}t^{1/2}} + \frac{4nFDC}{\pi r} \quad (\text{Equação 5})$$

onde, j_L é a densidade de corrente no estado estacionário, n é o número de elétrons, F é a constante de Faraday, D é o coeficiente de difusão da espécie eletroativa, C é a concentração da espécie eletroativa no seio da solução, t é o tempo após a alteração do potencial e r é o raio do microeletrodo.

O primeiro termo da equação corresponde à variação da corrente em processo eletródico governado por difusão linear semi-infinita (equação de Cottrell) e é dominante para tempos curtos. Já o segundo termo da equação não depende do tempo e define a condição de estado estacionário. Este termo é representativo para tempos longos. Entretanto, como o raio dos microeletrodos situa-se em escala micrométrica, o segundo termo dessa equação se torna dominante após poucos milissegundos e a corrente passa a ser independente do tempo (Equação 6).

$$j_L = \frac{4nFDC}{\pi r} \quad (\text{Equação 6})$$

Sabendo que $j_L = I/A$ e $A = \pi r^2$, a Equação 6 pode ser reescrita da seguinte maneira:

$$I_L = 4nFD r C \quad (\text{Equação 7})$$

onde I_L é a corrente no estado estacionário, também conhecida como corrente limite.

Os microeletrodos são utilizados na SECM em função de algumas características únicas apresentadas por eletrodos com essas dimensões. Apesar de o uso de eletrodos micrométricos requerer instrumentação mais sofisticada como consequência das baixas correntes medidas, existem inúmeras vantagens como a reduzida queda ôhmica (iR), o que possibilita a realização de experimentos em meios com alta resistência e na ausência de eletrólito suporte. Além disso, a dupla camada elétrica formada sobre os microeletrodos possui dimensões reduzida, conseqüentemente, a constante de tempo (RC) do carregamento é pequena. Outra vantagem a ser destacada no uso de microeletrodos na SECM é o transporte de massa mais efetivo provocado pela difusão radial, de tal forma que a situação de estado estacionário é atingida em frações de segundos e as medidas são feitas com menor influência de efeitos hidrodinâmicos (BARD; FAULKNER, 2000; BARD et al., 1993). Apesar de a miniaturização possibilitar a aplicação desses dispositivos em amostras de dimensões reduzidas, a realização dos experimentos se torna cada vez mais complicada e isso exige um maior treinamento do operador e instrumentação adequada para manipulação.

1.3.2 “*Feedback*” (Retroalimentação)

O modo de operação mais explorado na microscopia eletroquímica é o *feedback*. Esse tipo de procedimento de realização de experimentos SECM foi o primeiro a ter uma abordagem teórica reportada, quando em 1989 o grupo do Prof. Allen J. Bard simulou, utilizando o método dos elementos finitos, a corrente faradaica durante a aproximação de um microeletrodo a superfícies condutoras e isolantes (KWAK; BARD, 1989).

A principal característica do *feedback* é que neste modo de operação trabalha-se com um microeletrodo e um substrato imersos em um eletrólito suporte contendo uma espécie eletroativa

conhecida como mediador redox. Esta substância é necessariamente adicionada à solução e sua seleção é realizada em função do tipo de informação pretendida e da natureza do substrato em estudo (BARD; MIRKIN, 2012; WITTSTOCK et al., 2007). Superfícies sólidas como ouro, platina, polímeros ou membranas biológicas podem ser empregadas como substrato, assim como alguns líquidos que formam duas fases (BARD; MIRKIN, 2012).

Com o intuito de exemplificar esse modo de operação, serão apresentadas três situações em que o microeletrodo e o substrato estão imersos em uma solução contendo um mediador redox na sua forma reduzida (Red) (Figura 2). Também será assumido que ao microeletrodo está sendo aplicado um potencial suficiente para a obtenção da corrente limite, no qual o mediador redox se transforma eletroquimicamente em sua forma oxidada (Oxi). Na primeira situação, (Figura 2-A) o microeletrodo está posicionado no seio da solução, ou seja, longe do substrato. Nesta condição, a superfície do microeletrodo é envolvida por uma camada de difusão hemisférica, tem-se uma resposta característica de um microeletrodo e a corrente não varia com o tempo e pode ser calculada utilizando-se a Equação 7 (BARD; FAULKNER, 2000).

Figura 2: Representação esquemática da resposta do microeletrodo posicionado em três situações hipotéticas: no seio da solução (A), próximo a uma superfície isolante (B) e próximo a uma superfície condutora (C).

Na segunda condição experimental (Figura 2-B), o microeletrodo é posicionado a poucos micrometros da superfície de um substrato isolante. Nesta situação, como a separação microeletrodo/substrato é muito pequena, a difusão do mediador redox fica dificultada e ocorre diminuição da corrente em relação àquela medida no seio da solução. Esse fenômeno é conhecido como *negative feedback*, o qual pode ser traduzido para o português como: difusão com acesso restrito (BARD; MIRKIN, 2012; BARD et al., 1989; KWAK; BARD, 1989).

Na terceira e última situação (Figura 2-C), o microeletrodo também é posicionado a poucos micrometros da superfície de um substrato, mas desta vez a superfície em estudo é condutora. Nesta circunstância, o produto eletrogerado no microeletrodo (Oxi) difunde até a superfície do substrato, onde, dependendo do potencial, ocorre a reação reversa, ou seja, a espécie Oxi é reduzida no substrato, regenerando Red. O fenômeno proporciona uma retroalimentação

devido aos inúmeros ciclos redox, gerando assim um aumento na corrente quando essa é comparada com aquela obtida com o microeletrodo posicionado no seio da solução. Esta retroalimentação pode ocorrer sem que seja aplicado potencial ao substrato, pois como ambas as espécies Red/Oxi estão presentes, o sistema comporta-se como uma pilha de concentração, obedecendo à equação de Nernst. Isto faz com que a superfície do condutor assuma um potencial, na situação abordada, mais negativo do que o potencial do par redox eletrogerado, ocasionando o processo de regeneração da espécie Red (WIPF; BARD, 1991). Este fenômeno é denominado *feedback* positivo (retroalimentação) e ocorre apenas quando o mediador redox sofre uma reação eletroquímica reversível em um substrato condutor (BARD; MIRKIN, 2012; KWAK; BARD, 1989).

Uma característica interessante no *feedback* é que a variação na corrente acontece de maneira gradual quando o microeletrodo é aproximado de um substrato condutor ou de um substrato isolante. Em função deste comportamento, é possível correlacionar a corrente monitorada com a distância em que o microeletrodo se encontra do substrato e assim obter um gráfico conhecido como *curva de aproximação*. É importante destacar que, durante a aproximação, a resposta do microeletrodo mantém as características citadas anteriormente, ou seja, para um substrato condutor ocorre aumento da corrente (*feedback* positivo) e para um substrato isolante há diminuição na corrente (difusão com acesso restrito).

Assim como citado anteriormente, a primeira descrição matemática do modo *feedback* foi reportada pelo grupo do Prof. Bard (KWAK; BARD, 1989). Nesse artigo, são apresentadas equações que descrevem curvas de aproximação e demonstra-se que as curvas para difusão com acesso restrito são fortemente influenciadas pela razão entre o raio da parte isolante dos microeletrodos (r_{vidro}) e pelo raio do microdisco (r_{micro}). Esta razão é conhecida como RG ($RG = r_{\text{vidro}} / r_{\text{micro}}$) e sua representação esquemática é apresentada na Figura 3.

Figura 3: Representação esquemática do RG para um microeletrodo de disco.

Alguns anos depois, Amphlett e Denuault realizaram melhorias no trabalho anteriormente publicado, obtendo expressões mais completas para os fenômenos de *feedback* positivo (Equação 8) e difusão com acesso restrito (Equação 9) (AMPHLETT; DENUAULT, 1998).

$$I_T[L] = \frac{I}{I_\infty} = k'_1 + \frac{k'_2}{L} + k'_3 \exp\left(\frac{k'_4}{L}\right) \quad (\text{Equação 8})$$

$$I_T[L] = \frac{I}{I_\infty} = \frac{1}{k_1 + \frac{k_2}{L} + k_3 \exp\left(\frac{k_4}{L}\right)} \quad (\text{Equação 9})$$

onde k'_1 , k'_2 , k'_3 , k'_4 e k_1 , k_2 , k_3 , k_4 são constantes condicionais dependentes do RG do microeletrodo, I_T é corrente medida pelo microeletrodo em dada distância (I_{micro}) dividido pela corrente medida pelo microeletrodo no seio da solução (I_∞) e L é a separação entre o microeletrodo e o substrato (d) dividida pelo seu raio (r) (AMPHLETT; DENUAULT, 1998).

Uma característica da abordagem matemática adotada por Ampheltt e Denuault para a determinação do RG é a necessidade de uso de curvas de trabalho obtidas com essas equações, pois o RG não é um parâmetro presente nas expressões e as curvas são definidas para alguns poucos valores de RG. Para contornar essa limitação, Lefrou e Cornut propuseram expressões que possuem o RG como um dos parâmetros variáveis e, dessa forma, é possível obter as curvas de aproximação para *feedback* positivo e negativo. A Equação 10 apresenta a expressão final reportada por Lefrou, a qual descreve as curvas de aproximação para *feedback* positivo (LEFROU, 2006) e a Equação 13 apresenta a expressão desenvolvida por Lefrou e Cornut para a difusão com acesso restrito (CORNUT; LEFROU, 2007).

$$I_T[L, RG] = \alpha[RG] + \frac{\pi}{4\beta[RG]\arctan(L)} + \left(1 - \alpha[RG] - \frac{1}{2\beta[RG]}\right) \frac{2}{\pi} \arctan(L) \quad (\text{Equação 10})$$

onde:

$$\alpha[RG] = \ln 2 + \ln 2 \left(\left(1 - \frac{2}{\pi} \arccos \frac{1}{RG}\right) - \ln 2 \left(1 - \left(\frac{2}{\pi} \arccos \frac{1}{RG}\right)\right)^2 \right) \quad (\text{Equação 11})$$

$$\beta[RG] = 1 + 0,639 \left(\left(1 - \frac{2}{\pi} \arccos \frac{1}{RG}\right) - 0,186 \left(1 - \left(\frac{2}{\pi} \arccos \frac{1}{RG}\right)\right)^2 \right) \quad (\text{Equação 12})$$

$$I_T[L, RG] = \frac{\frac{2,08}{RG^{0,358}} \left(L - \frac{0,145}{RG}\right) + 1,585}{\frac{2,08}{RG^{0,358}} (L + 0,0023RG) + 1,57 + \frac{\ln RG}{L} + \frac{2}{\pi RG} \ln \left(1 + \frac{\pi RG}{2L}\right)} \quad (\text{Equação 13})$$

Como pode ser visualizado, as equações desenvolvidas por Lefrou e Cornut (Equações 10 e 13) possuem uma complexidade maior que as equações reportadas por Ampheltt e Denuault (Equações 8 e 9). No entanto, para curvas de aproximação de *feedback* positivo ambas expressões podem ser utilizadas, pois essas curvas não são muito dependentes do RG do microeletrodo e o

resultado final é praticamente o mesmo (Figura 4-B). Esta pequena influência do RG na curva de aproximação no caso do *feedback* positivo está relacionada com o forte efeito da retroalimentação que ocorre quando o microeletrodo está posicionado próximo à superfície de um substrato condutor, a qual não é dependente da difusão de espécies do seio da solução para a região entre o microeletrodo e o substrato (BARD; MIRKIN, 2012).

Figura 4: Efeito do RG (valores marcados nas curvas) sobre curvas de aproximação teóricas para difusão com acesso restrito (A) e *feedback* positivo (B).

Como pode ser observado na Figura 4-A para difusão com acesso restrito, as curvas de aproximação são amplamente influenciadas pelo RG, pois o aumento da parte isolante do microeletrodo dificulta a chegada de material à superfície eletroativa (BARD; MIRKIN, 2012). Assim, para a determinação do RG, quando se trabalha com difusão com acesso restrito, recomenda-se o uso da Equação 13.

As curvas de aproximação são de total importância nos experimentos SECM, pois trazem informações sobre a distância em que o microeletrodo se encontra do substrato, sobre a natureza do substrato (isolante ou condutor) e sobre a reatividade da superfície (BARD; MIRKIN, 2012;

GAMBOA et al., 2010; LEFROU; CORNUT, 2010; SALLES et al., 2010). Além disso, as curvas também podem ser utilizadas para caracterizar os microeletrodos, conforme será mostrado em seção posterior relativa à construção de microeletrodos.

Experimentos utilizando o modo *feedback* podem também ser realizados de outras maneiras como, por exemplo, aplicando um potencial a um substrato condutor. Esse tipo de abordagem é amplamente explorado no estudo de cinética de transferência de elétrons de reações heterogêneas entre a superfície de eletrodos modificados e um mediador redox (CANNES; KANOUI; BARD, 2003; RITZERT et al., 2013; WIPF; BARD, 1991). O modo *feedback* também foi explorado em estudos envolvendo líquidos iônicos (LOVELOCK et al., 2010, 2011), interfaces líquido-líquido (DING; QUINN; BARD, 2001), entre outros (BARD; MIRKIN, 2012).

1.3.3 Modo gerador-coletor

Os primeiros experimentos utilizando o modo de operação gerador/coletor foram realizados por Engstrom e colaboradores em estudos envolvendo a determinação do perfil de concentração formado na interface de um eletrodo (ENGSTROM et al., 1986, 1987). Apesar dos créditos pela criação da SECM serem normalmente atribuídos ao Prof. Allen J. Bard, os experimentos realizados por Engstrom são considerados os primeiros experimentos envolvendo a SECM.

De maneira geral, o termo Gerador/Coletor (G/C) pode ser utilizado para nomear diversos experimentos envolvendo a SECM. No entanto, as suas principais aplicações se concentram nos modos amperométricos conhecidos como Microeletrodo-Gerador/Substrato-Coletor (TG/SC, *tip generation/substrate collection*) e Substrato-Gerador/Microeletrodo-Coletor (SG/TC, *substrate generation/tip collection*) (BARD; MIRKIN, 2012). Em ambos os casos, diferentemente do modo

feedback, o mediador redox é gerado in-situ durante os experimentos por um substrato e coletado no microeletrodo ou vice versa (Figura 5).

Figura 5: Representação esquemática do modo de operação SECM Substrato-Gerador/Microeletrodo-Coletor (A) e Microeletrodo-Gerador/Substrato-Coletor (B).

No modo TG/SC o microeletrodo é utilizado como eletrodo “gerador” e o substrato como eletrodo “coletor” (Figura 5-B). Neste caso, normalmente o microeletrodo é posicionado próximo à superfície de um substrato e é aplicado um potencial suficiente para a eletrogeração de uma espécie que será utilizada como mediador redox. No espaço existente entre o microeletrodo e o substrato, ocorre a difusão do mediador redox eletrogerado até a superfície do substrato, onde é realizada sua “coleta”. Quando o substrato é um eletrodo metálico, usualmente a este é aplicado um potencial para promover a reação contrária no caso de o mediador redox passar por transformação eletroquímica reversível (FERNÁNDEZ; BARD, 2004). Cumpre ressaltar que

quando o substrato possui alguns milímetros, a eficiência de coleta é unitária devido à grande diferença de área entre o microeletrodo e o substrato, desde que a espécie gerada seja estável e a separação entre microeletrodo substrato não seja muito grande (CANNAN et al., 2011).

As principais aplicação do modo TG/SC se concentram em estudos envolvendo mecanismos de reações heterôgeneas e homogêneas (BARD; MIRKIN, 2012; FERNÁNDEZ; BARD, 2004). Um artigo interessante sobre o estudo de reações homogêneas foi publicado pelo grupo do Prof. P. R. Unwin, onde foram obtidas informações sobre processos químicos acoplados a reações eletródicas com base na dependência do fator de coleta com a distância microeletrodo/substrato e da cinética da reação química acoplada (CANNAN et al., 2011). Outros estudos relevantes envolvendo o modo TG/SC foram reportados pelo grupo do Prof. S. Amemiya na obtenção de constantes de transferência eletrônica (AMEMIYA et al., 2011; NIORADZE; KIM; AMEMIYA, 2011). A TG/SC também foi aplicada na obtenção de imagens relacionadas com reatividade de eletrocalisadores (JOHNSON; WALSH, 2012; WENG; HSIEH, 2011).

No modo de operação SG/TC, o substrato desempenha o papel de “gerador” e o microeletrodo atua como eletrodo “coletor” (Figura 5-A). Assim como no modo TG/SC, o microeletrodo também é posicionado próximo à superfície de um substrato, mas nesse caso o potencial a ele aplicado tem como objetivo promover a transferência de elétrons com a espécie gerada no substrato. Este modo de operação possui algumas limitações, pois em alguns casos o movimento do microeletrodo pode perturbar a camada de difusão formada na superfície do substrato. Além disso, não se obtém uma condição de estado estacionário no substrato de tamanho convencional. Outro problema diz respeito à restrição de acesso à superfície do substrato ao se trabalhar com microeletrodos cujo RG é grande (BARD; MIRKIN, 2012; PUST; MAIER; WITTSTOCK, 2008). Além disso, diferentemente do modo TG/SC, no modo SG/TC o

fator de coleta é muito baixo. Essas limitações comprometem a elaboração de um tratamento teórico dos dados obtidos ao se utilizar essa configuração.

Apesar das limitações, o modo SG/TC vem sendo aplicado com sucesso em estudos para a obtenção do perfil de concentração de espécies eletrogeradas (BALTES et al., 2004), consumidas ou que atravessam o substrato. Exemplos incluem canais, membranas (AMEMIYA et al., 2000; EDWARDS et al., 2006b; SHEN et al., 2012) ou zonas reativas na superfície de substratos (mapeando-se o substrato com o microeletrodo nos eixos x e y) (MINGUZZI et al., 2015; REIS et al., 2014; VALIM et al., 2013).

O modo de operação SG/TC também vem sendo utilizado no desenvolvimento de metodologias para determinação de coeficiente de difusão e os trabalhos utilizam como estratégia a determinação do tempo necessário para a espécie de interesse difundir do gerador para o coletor (CSÓKA; NAGY, 2004; MIRKIN; ARCA; BARD, 1993; NAGY; GYETVAI; NAGY, 2009). Estudos sobre a determinação da razão entre os coeficiente de difusão de espécies nas formas oxidada e reduzida também foram reportados na literatura (MARTIN; UNWIN, 1997, 1998).

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Desenvolvimento de uma metodologia para a determinação do coeficiente de difusão de micelas utilizando a SECM no modo gerador/coletor.
- Utilização da SECM no estudo de transporte de substâncias através de bicamadas lipídicas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Todas as soluções utilizadas para a realização dos experimentos foram preparadas a partir de reagentes de grau de pureza analítica dissolvidos em água desionizada (processada em sistema Nanopure Infinity, Barnstead).

3.2 Instrumentação

- Microscópio eletroquímico de varredura

Os experimentos com a SECM foram realizados com um microscópio eletroquímico (Sensolytics GmbH Bochum, Alemanha), empregando-se um sistema de 3 ou 4 eletrodos: eletrodo de trabalho (microeletrodo e/ou substrato), eletrodo de referência (Ag/AgCl, KCl sat.) e auxiliar (fio de platina).

- Potenciostato

As medidas voltamétricas e amperométricas foram realizadas utilizando-se um bipotenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT30 (Ecochemie, Holanda) e empregando-se um sistema de 3 ou 4 eletrodos: eletrodo de trabalho (microeletrodo e/ou substrato), eletrodo de referência (Ag/AgCl, KCl sat.) e auxiliar (fio de platina).

3.3 Construção dos eletrodos

- Microeletrodos

Os microeletrodos foram construídos com base na estratégia mais convencional, em que microfibras de platina ($r = 10$ ou $12,5 \mu\text{m}$ – Goodfellow, UK) foram diretamente encapsuladas em capilares de vidro de borosilicato (I.D. $0,5 \text{ mm}$, O.D. $1,0 \text{ mm}$ - Sutter Instruments, USA). As fibras foram encapsuladas utilizando o aparelho Flaming/Brown Micropipette Puller modelo P-97 da Sutter Instrument Co.[®]. O polimento foi realizado utilizando lixa d'água 1200 e feltro com alumina $1 \mu\text{m}$ para exposição da fibra. O bom funcionamento dos microeletrodos fabricados foi evidenciado registrando-se voltamogramas em soluções de ferricianeto de potássio em meio de KCl.

- Eletrodos de referência e auxiliar

Como eletrodo de referência foi utilizado um eletrodo Ag/AgCl produzido pela eletrooxidação de Ag em meio de Cl^- . Este conjunto foi acondicionado em uma ponteira de micropipeta contendo solução saturada de KCl. O contato iônico do eletrodo com a solução externa foi realizado usando-se um pedaço de separador de bateria (PEDROTTI; ANGNES; GUTZ, 1996). O eletrodo auxiliar consistiu em um fio de platina imobilizado em tubo de vidro.

3.4 Determinação de coeficientes de difusão em sistemas micelares

Os valores de coeficiente de difusão foram determinados utilizando sondas eletroquímicas ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$ e íons ferrocínio) em meio aquoso e na presença de surfactantes nos experimentos SECM utilizando o modo “*collection/generation*”, onde o substrato condutor foi o gerador e o

microeletrodo foi o coletor. Para tanto, foi aplicado um degrau de potencial no eletrodo gerador, segundo o seguinte procedimento:

a) Partiu-se do pressuposto que a solução continha apenas espécies na forma oxidada. Inicialmente, ambos os eletrodos foram polarizados em um potencial onde nenhuma reação eletródica pudesse acontecer.

b) Após 5 s do início do experimento, ao eletrodo gerador foi aplicado um potencial necessário para a geração da espécie reduzida.

Como a distância que separa os eletrodos é conhecida, pois a separação entre microeletrodo e substrato pode ser alterada de maneira controlada e com grande precisão, o valor do coeficiente de difusão (D) foi calculado em função do tempo que a espécie gerada leva para atingir o eletrodo coletor.

3.5 Modelos de membrana semipermeável

Para a realização dos experimentos SECM, o papel celofane ($\sigma = 40 \mu\text{m}$, COOPERCEL, São Paulo) foi adaptado horizontalmente em uma célula eletroquímica que continha dois compartimentos, sendo um posicionado abaixo do papel celofane e preenchido com uma solução contendo a espécie eletroativa em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (solução doadora), e o segundo compartimento situado sobre o papel celofane, contendo uma solução aceptora ($\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e os eletrodos utilizados para a realização das medidas eletroquímicas.

3.6 Construção da célula de medida para BLM

A célula de medida e o suporte das BLMs foram fabricados em acrílico e em uma folha de poliestireno com 50 μm de espessura, respectivamente, utilizando uma cortadora a laser *L-Solution* modelo LS100 (Gravograph, BR).

3.7 Obtenção das bicamadas lipídicas

As bicamadas lipídicas foram preparadas pelo método de Mueller (MUELLER et al., 1963), utilizando fosfatidilcolina (lecitina de soja) dissolvida em n-decano (10 mg mL^{-1}). Esta mistura foi espalhada com um capilar de vidro em uma folha de poliestireno contendo um microfuro com dimensão de 350 μm . Como a formação das BLMs só ocorre em solução aquosa, este procedimento foi realizado com a folha de poliestireno imersa em uma solução de tampão HEPES 10 mmol L^{-1} em NaCl $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,4$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Construção e caracterização de microeletrodos para aplicações em SECM

O bom funcionamento dos experimentos SECM está relacionado principalmente com a resposta do microeletrodo. Em função dessa relação, o desenvolvimento e o domínio de estratégias para sua construção é uma etapa fundamental para todos os experimentos envolvendo microscopia eletroquímica. Diversas metodologias de construção estão reportadas na literatura (MAUZEROLL; LESUER, 2007; PAIXÃO; BERTOTTI, 2009; SZUNERITS; THOUIN, 2007; ZOSKI, 2002b), no entanto os microeletrodos utilizados na SECM devem possuir algumas características específicas, tais como dimensão da ponta na escala micrométrica ou submicrométricas e baixos valores de RG (CORNUT et al., 2011; DANIS et al., 2014b, 2015; KRANZ, 2014). Neste contexto, nesta seção são apresentados os resultados obtidos na construção e caracterização de microeletrodos metálicos (platina) para aplicações na microscopia eletroquímica.

Os microeletrodos metálicos foram construídos utilizando estratégias convencionais para a obtenção de microeletrodos de disco, em que microfibras de platina foram encapsuladas e seladas em capilares de vidro com auxílio de um puxador de pipeta. A caracterização dos microeletrodos assim construídos foi realizada primeiramente por uma inspeção visual utilizando um microscópio óptico. Em uma segunda etapa, esses microeletrodos foram caracterizados por voltametria cíclica para posterior utilização na SECM.

A inspeção visual é realizada normalmente durante a etapa de polimento, que consiste em processo fundamental na construção dos microeletrodos. Durante essa etapa pode ocorrer aparecimento de fissuras na superfície dos microeletrodos, má exposição da microfibra ou seu

rompimento (Figura 6). Portanto, a caracterização visual tem como objetivo garantir que a superfície dos microeletrodos esteja na forma de um microdisco.

Figura 6: Imagens de microeletrodos fabricados com microfibras de Pt ($r = 10\ \mu\text{m}$) com fissuras na ponta (imagem da esquerda) e microfibras rompidas (imagem da direita).

A Figura 7 mostra duas imagens de um microeletrodo, uma lateral (imagem à direita) e uma frontal (imagem à esquerda). Na imagem lateral pode-se visualizar a presença da microfibra de Pt utilizada na construção do microeletrodo na parte central do vidro. Nota-se também que as dimensões da ponta do microeletrodo estão próximas à da microfibra utilizada, $20\ \mu\text{m}$ de diâmetro. Na imagem frontal é possível notar que a microfibra estava exposta lateralmente, pois é possível visualizar um pequeno ponto claro na região central do vidro.

Figura 7: Imagens de um microeletrodo polido confeccionado para aplicações em SECM. Microfibra utilizada: Pt ($r = 10\ \mu\text{m}$).

Após a inspeção visual, os microeletrodos construídos foram caracterizados por voltametria cíclica. Nesta etapa, o funcionamento dos microeletrodos foi avaliado com base na resposta voltamétrica em experimentos realizados em solução de ferricianeto de potássio $10\ \text{mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1\ \text{mol L}^{-1}$. A Figura 8 apresenta um voltamograma cíclico obtido com um microeletrodo de platina.

Figura 8: Voltamograma cíclico obtido em solução de ferricianeto de potássio 10 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando um microeletrodo de platina. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Como pode ser visualizado na Figura 8, o voltamograma apresenta um perfil sigmoidal com baixa histerese e patamares de corrente característicos da resposta de um microeletrodo (BARD; FAULKNER, 2000). Esse patamar de corrente, conhecido como corrente de estado estacionário, não depende do tempo e pode ser utilizado para determinar o raio do microeletrodo utilizando a equação que descreve o seu comportamento ($I_L = 4nFDrC$). Utilizando a Equação 7 foi encontrado um raio igual a $7,8 \text{ }\mu\text{m}$. Um ponto a destacar ao se fabricar microeletrodos com essa metodologia é que o raio calculado usualmente difere do valor fornecido pelo fabricante das microfibras. O afinamento na microfibras é geralmente ocasionado pelo programa de aquecimento aplicado pelo puxador de pipetas. Essa observação norteou trabalhos posteriores em que se desejou obter microeletrodos com dimensões menores, conforme será discutido ainda nesta seção.

A terceira e última etapa na caracterização dos microeletrodos envolveu experimentos SECM para obter informações adicionais sobre raio e RG. Assim como discutido anteriormente, a corrente monitorada durante a obtenção das curvas de aproximação é amplamente dependente da distância do microeletrodo à superfície de um substrato isolante. Além disso, a corrente limite também é influenciada quando o RG do microeletrodo é pequeno, pois pode ocorrer contribuição da difusão lateral (*back diffusion*) (DANIELE; DENUAULT, 2014). Em função desse fenômeno, utiliza-se uma equação modificada com um termo adicional para considerar a contribuição da difusão lateral, que é dependente do RG (LEFROU; CORNUT, 2010; LEFROU, 2006).

$$I_L = \beta 4nFDrC \quad (\text{Equação 14})$$

onde: β é dado pela Equação 12 (p. 30) e é dependente do RG do microeletrodo.

Com o intuito de ilustrar o efeito da difusão lateral na determinação da dimensão dos microeletros, foram realizados cálculos para avaliar a contribuição desse fenômeno no valor estimado. Para tanto, utilizou-se a Equação 14 e foi considerada uma situação hipotética na qual a concentração de ferricianeto de potássio seria 10 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, coeficiente de difusão $7,6 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ e uma corrente limite de $29,3 \text{ nA}$. Com esses dados, tem-se um microeletrodo com raio de $10 \text{ }\mu\text{m}$ e RG acima de 300, ou seja, a parte isolante teria uma dimensão 300 vezes maior que a da microfibr. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 9.

Figura 9: Contribuição da difusão lateral no tamanho do raio do microeletrodo. Cálculos realizados considerando concentração de ferricianeto de potássio igual a 10 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, coeficiente de difusão igual a $7,6 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ e uma corrente constante de $29,3 \text{ nA}$.

A Figura 9 mostra que para valores de RG acima de 20, a contribuição lateral pode ser desprezada e a estimativa do raio do microeletrodo pode ser realizada utilizando a equação simplificada, a qual é geralmente utilizada para descrever o comportamento de um microeletrodo (Equação 7, p. 25). No entanto, para valores de RG abaixo de 20, quando essa equação é utilizada obtêm-se valores de corrente maiores do que os esperados, resultando em maior valor para o raio do microeletrodo. Essa discrepância pode chegar a 30% para microeletrodos com RG igual a 1. Em função desse comportamento e com o intuito de evitar erros provocados pela difusão lateral, a determinação do raio dos microeletrodos utilizados nesse trabalho foi feita utilizando curvas de aproximação e a Equação 14.

A Figura 10 apresenta uma curva de aproximação teórica e a obtida experimentalmente em uma solução de ferricianeto de potássio 10 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando um *wafer* de silício como substrato. Esse substrato foi selecionado por possuir uma superfície bastante plana e isolante.

Figura 10: Curva de aproximação obtida em uma solução de ferricianeto de potássio 10 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando um *wafer* de silício como substrato. Curva teórica (linha contínua) e curva experimental (pontos). Velocidade de aproximação $10 \text{ } \mu\text{m s}^{-1}$. Potencial do microeletrodo $-100 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl Sat.})}$.

Como pode ser observado na figura acima, a curva de aproximação obtida possui o comportamento característico do fenômeno de difusão com acesso restrito. Nesta condição, ocorre uma diminuição na razão entre a corrente monitorada pelo microeletrodo em uma dada distância do substrato e a corrente monitorada no seio da solução (I/I_{∞}) à medida que a separação entre microeletrodo e o substrato isolante diminui (BARD; MIRKIN, 2012; KWAK; BARD,

1989). A determinação dos parâmetros avaliados foi realizada comparando os dados experimentais com as curvas de aproximação teóricas para difusão com acesso restrito, sendo que a melhor correlação entre as curvas teórica e experimental ocorreu para RG igual a 14. Considerando esse valor de RG, o raio calculado do microeletrodo foi de 7,7 μm . Comparando os valores encontrados, desprezando a difusão lateral e considerando esse fenômeno, para esse eletrodo, não ocorreu uma variação considerável, sendo o erro ocasionado pela difusão lateral igual a 1,2%.

A análise da Figura 10 permite observar a mudança do perfil da curva de aproximação experimental para regiões próximas à superfície do substrato. Esse comportamento indica que no ponto $d/r = 0,75$ e $I/I_{\infty} = 0,37$ o microeletrodo provavelmente tocou o substrato. Todavia, por não estar totalmente paralelo à superfície do substrato, o acesso do mediador redox ao microdisco de Pt continuou a ocorrer. Sabendo que $r = 7,7 \mu\text{m}$ e que $d/r = 0,75$, foi calculada a distância (d) entre a área ativa do microeletrodo (microdisco de Pt) e a superfície do substrato quando a lateral do microeletrodo encostou nessa superfície. O valor encontrado foi de 5,8 μm e existem duas possíveis explicações para esse fenômeno. Uma delas consiste na eventual existência de irregularidades na superfície do substrato e/ou do microeletrodo. A outra refere-se ao posicionamento do microeletrodo no suporte do microscópio eletroquímico. Como o *wafer* de silício possui uma superfície extremamente plana e o *holder* do microscópio é específico para as dimensões do microeletrodo utilizado, tem-se que a irregularidade da superfície dos microeletrodos é, normalmente, provocada pelo processo de polimento, pois, por ser um processo manual, exige um treinamento específico do operador.

Assim como o RG tem influência no mecanismo de transporte da espécie eletroativa à superfície do microeletrodo, esse parâmetro também exerce efeito no posicionamento do microeletrodo em regiões vizinhas à superfície do substrato. A Figura 11 apresenta uma

representação esquemática de uma situação hipotética em que um microeletrodo está encostado na superfície de um substrato que possui um desnivelamento (não é totalmente plano).

Figura 11: Representação esquemática da influência do RG no posicionamento do microeletrodo próximo à superfície de um substrato.

Como o substrato possui um desnível, pode-se perceber pela análise da Figura 11 que a lateral do microeletrodo encosta na superfície do substrato e que a superfície do microdisco não está totalmente paralela ao substrato. A distância (d) entre a superfície do microeletrodo e do substrato nesta situação é dada pelas seguintes equações:

$$d = r_{vidro} \tan \theta \quad (\text{Equação 15})$$

$$d/r = RG \tan \theta \quad (\text{Equação 16})$$

Considerando $\theta = 1^\circ$ e $r = 10 \text{ }\mu\text{m}$, para microeletrodos com $\text{RG} = 10$ tem-se $d/r = 0,17$, o que corresponde a uma distância entre microeletrodo e substrato de $1,7 \text{ }\mu\text{m}$. Em outra situação com os mesmo valores de θ e r , mas com um RG pequeno, por exemplo, $1,9$, tem-se $d/r = 0,03$, o que corresponde a $d = 0,3 \text{ }\mu\text{m} = 300 \text{ nm}$. Os exemplos apresentados demonstram a importância do controle da geometria dos microeletrodos utilizados na SECM, visto que o efeito de irregularidades existentes na superfície do substrato e/ou do microeletrodo durante o posicionamento aumenta com o aumento do RG. Além disso, pode-se perceber que quanto menor o RG, menor é a separação alcançável entre a superfície do substrato e a região eletroativa do microeletrodo. Em geral, as curvas de aproximação consistem em poderosa ferramenta para a caracterização de microeletrodos e podem ser também utilizadas para obter informações sobre a disposição da fibra na superfície do microeletrodo (CORNUT et al., 2011; SUN; MIRKIN, 2007).

A Figura 12 apresenta uma curva de aproximação obtida com um microeletrodo de platina construído e caracterizado com procedimento idêntico ao apresentando anteriormente. Para esse microeletrodo foi encontrado um raio de $7,0 \text{ }\mu\text{m}$ e um $\text{RG} = 8$. Diferentemente do caso relatado anteriormente, esse microeletrodo tocou a superfície quando estava a $1,9 \text{ }\mu\text{m}$ do substrato em consequência do menor RG, ou seja, com um microeletrodo de raio praticamente igual ao anterior, aproximadamente $7 \text{ }\mu\text{m}$, mas com RG 42% menor, foi possível posicioná-lo muito mais próximo do substrato.

Figura 12: Curva de aproximação obtida em uma solução de ferricianeto de potássio 10 mmol L^{-1} em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando um *wafer* de silício como substrato. Curva teórica (linha contínua) e curva experimental (pontos). Velocidade de aproximação $10 \mu\text{m s}^{-1}$. Potencial do microeletrodo $-100 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl Sat.})}$.

Assim como citado anteriormente, o programa de aquecimento aplicado pelo puxador de pipeta durante a fabricação dos microeletrodos pode alterar a dimensão das microfibras. Essa alteração é provocada devido à elevada temperatura do sistema de aquecimento do equipamento, que pode atingir valores próximos e/ou superiores à temperatura de fusão da platina. Com base nesse fato, microeletrodos com raio próximo ou menor do que $1 \mu\text{m}$ foram fabricados e caracterizados conforme procedimento já discutido. A Figura 13 apresenta voltamogramas cíclicos e curvas de aproximação obtidos para três diferentes microeletrodos de platina utilizando como mediador redox íons ferricianeto e a Tabela 1 mostra dados referentes a esses microeletrodos.

Tabela 1: Caracterização dos microeletrodos de platina obtidos por afinamento da microfibrila.

Microeletrodo	Raio – Voltametria (μm)	Raio – SECM (μm)	RG	Distância do substrato (μm)
A	1,2	1,2	95	1,4
B	1	0,9	20	1,6
C	0,7	0,7	15	2,5

Como pode ser visualizado na Figura 13, microeletrodos com raio de aproximadamente 1 μm foram obtidos partindo de um microfibrila de 10 μm . No entanto, o procedimento não possui uma reprodutibilidade elevada, pois a dimensão dos microeletrodos é controlada pelo polimento de sua ponta e assim como citado anteriormente isso exige um treinamento do operador. Uma dificuldade encontrada para a construção de microeletrodos com essas dimensões é o controle do RG. Como pode ser observado na Tabela 1, microeletrodos com raios similares tiveram valores de RG completamente diferentes. Outra característica de microeletrodos com essas dimensões é a possibilidade de posicioná-los mais próximos à superfície do substrato (microeletrodos A e B). No entanto, não foi possível realizar esse procedimento com o microeletrodo C. Apesar de esse microeletrodo possuir $\text{RG} = 15$ e raio de 700 nm, ele tocou a superfície do substrato quando estava a 2,5 μm . Este comportamento pode estar relacionado com a disposição da microfibrila, ou seja, pode ter ocorrido a formação de uma cavidade e a área eletroativa estar localizada em seu interior (SUN; MIRKIN, 2007).

Figura 13: Voltamogramas cíclicos e curvas de aproximação obtidos com três diferentes microeletrodos de platina. Solução de ferricianeto de potássio 10 mmol L^{-1} em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Velocidade aproximação $10 \text{ } \mu\text{m s}^{-1}$. Potencial do microeletrodo $-100 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl Sat.})}$.

De maneira geral, o procedimento adotado para a construção de microeletrodos para aplicação em SECM apresentou resultados satisfatórios para os fins desse trabalho. No entanto, a dependência da habilidade do operador para o controle da geometria e da dimensão pode levar a uma baixa reprodutibilidade. Uma alternativa para evitar esse problema vem sendo adotada por outros grupos de pesquisa e consiste no uso do *Focused Ion Beam* (FIB) (VOLKERT; MINOR, 2007). Com o uso do FIB é possível “cortar” com precisão nanométrica a ponta dos microeletrodos e assim aumentar a reprodutibilidade de fabricação (AMEMIYA et al., 2011; NIORADZE et al., 2013).

4.2 Determinação de coeficientes de difusão em sistemas micelares

A metodologia utilizada na determinação de coeficientes de difusão usando SECM foi elaborada com base na equação de Einstein–Smoluchowski (Equação 3). Essa equação, assim como abordado na introdução, traz informações sobre a dimensão do deslocamento randômico de uma espécie e mostra a dependência com o tempo e o coeficiente de difusão (LEVINE, 2008). Logo, caso seja conhecida a distância entre dois pontos e o tempo necessário para a espécie percorrer esse trajeto, é possível aplicar essa equação e determinar o coeficiente de difusão.

Neste contexto, a microscopia eletroquímica no modo de operação substrato-gerador/microeletrodo-coletor (*SG/TC*) pode ser aplicada, pois é possível estimar a distância entre microeletrodo e substrato e monitorar o tempo que uma espécie eletroativa requer para difundir do substrato até o microeletrodo. A Figura 14 apresenta a representação esquemática de um experimento SG/TC, considerando que inicialmente só existam espécies oxidadas na solução.

Figura 14: Representação esquemática do experimento SECM no modo SG/TC.

Como d é conhecido, o coeficiente de difusão pode ser obtido utilizando a seguinte equação (MOSBACH et al., 2001):

$$d = K\sqrt{Dt_D} \quad (\text{Equação 17})$$

onde: d = distância entre o eletrodo coletor (microeletrodo) e o eletrodo gerador (substrato).

K = constante que depende da geometria do espaço no qual a espécie eletroquímica gerada difunde e do posicionamento do microeletrodo.

D = coeficiente de difusão da espécie eletroativa.

t_D = tempo que a espécie leva para chegar ao microeletrodo.

Os valores de K podem ser obtidos por simulação digital ou calibrando-se o sistema com espécies com D conhecidos (PAIXÃO et al., 2006). No presente trabalho, os valores de K foram obtidos em meio de ferricianeto de potássio (em KCl 0,1 mol L⁻¹), espécie que possui comportamento eletroquímico e coeficiente de difusão bem definidos (BARD; FAULKNER, 2000).

Esta seção está subdividida em quatro partes, sendo que em um primeiro momento serão apresentados os resultados obtidos com espécies com comportamento eletroquímico conhecido. Na segunda parte será discutido o comportamento eletroquímico de íons ferrocínio em soluções aquosa e micelar. Na terceira e na quarta parte serão apresentados dados referentes à determinação do coeficiente de difusão de micelas formadas a partir de brometo de tetradecil trimetil amônio (CTABr) e de cloreto de 1-alkil-3-metilimidazólio.

4.2.1 Determinação do coeficiente de difusão de espécies eletroativas com comportamento eletroquímico conhecido

A metodologia utilizada para a determinação do coeficiente de difusão foi testada inicialmente com espécies eletroquímicas de comportamento conhecido. Para tanto, microeletrodos de platina com raio entre 7 – 10 μm foram posicionados a uma altura de 100 μm de um substrato de Pt ($r = 2 \text{ mm}$). A estimativa da distância entre o substrato e o microeletrodo foi realizada com base em uma curva de aproximação (Figura 15).

Figura 15: Curva de aproximação obtida em uma solução de ferricianeto de potássio 10 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando um eletrodo de platina como substrato. Curva teórica (linha contínua) e curva experimental (pontos). Velocidade de aproximação $2,5 \mu\text{m s}^{-1}$. Potencial do microeletrodo $-100 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl Sat.})}$.

Como pode ser visualizado na Figura 15, diferentemente do comportamento obtido quando a curva de aproximação foi obtida com um substrato isolante (Figura 10), para o substrato de platina (condutor) ocorreu um aumento na razão entre as correntes (I/I_{∞}) à medida que a separação entre microeletrodo e substrato foi reduzida. Este aumento de corrente está relacionado com a retroalimentação na interface do substrato e é característico do fenômeno de *feedback* positivo (BARD; MIRKIN, 2012). Notou-se também que em um determinado ponto ($d/r = 0,3$), a curva sofre uma mudança no seu perfil, o que indica que o microeletrodo está encostado na superfície do substrato. Todavia, ainda observa-se um sinal de corrente, provavelmente devido ao posicionamento do microeletrodo, que pode não estar totalmente paralelo à superfície do substrato. Com base no raio do microeletrodo e o ponto no gráfico onde ocorre uma mudança no perfil da curva de aproximação, foi possível estimar a separação quando o microeletrodo tocou o substrato. O valor obtido foi de 2,2 μm .

Após esta estimativa, o eletrodo coletor (microeletrodo de Pt) foi posicionado a uma altura de 100 μm do eletrodo gerador (substrato de platina) e em seguida foi aplicado um programa de potencial ao eletrodo gerador para promover a geração de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ a partir de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Simultaneamente a esse procedimento, o eletrodo coletor permaneceu polarizado com o intuito de monitorar a espécie eletroquimicamente gerada. As etapas são as seguintes:

a) Inicialmente, ambos os eletrodos foram polarizados em um potencial de 500 mV *vs.* Ag/AgCl_(KCl sat.), onde não ocorre reação eletródica.

b) Após 5 s do início do experimento, ao eletrodo gerador (substrato) foi aplicado um potencial necessário para que ocorresse a geração da espécie reduzida (-100 mV *vs.* Ag/AgCl_(KCl sat.)) e o eletrodo coletor foi mantido em um potencial de 500 mV *vs.* Ag/AgCl_(KCl sat.).

Os potenciais aplicados aos eletrodos foram selecionados com base nos potenciais de redução do ferricianeto de potássio e da oxidação da sua forma reduzida (ferrocianeto). O programa de potencial aplicado ao eletrodo gerador e a resposta obtida no eletrodo coletor são apresentados na Figura 16.

Figura 16: Programa de potencial aplicado ao substrato (A); dependência da corrente monitorada no eletrodo coletor com o potencial aplicado ao eletrodo gerador (B). Separação entre SG e TC: 100 μm . Medidas realizadas em um solução de ferricianeto de potássio 15 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} . Potencial do microeletrodo 500 mV vs. Ag/AgCl_(KCl Sat.).

Como pode ser visualizado, até $t = 5$ s não há sinal de corrente no eletrodo coletor, ou seja, não ocorre a chegada de nenhum material eletroativo à sua superfície. Entretanto, após a aplicação de -100 mV vs. Ag/AgCl_(KCl sat) ao eletrodo gerador (em $t = 5$ s), nota-se um aumento na corrente monitorada no eletrodo coletor, a qual está relacionada com a chegada, por difusão, da espécie eletroquimicamente gerada no substrato.

Nota-se ainda que o aumento de corrente não ocorreu instantaneamente após a aplicação do potencial ao eletrodo gerador (Figura 16-B em destaque). É necessário certo intervalo de

tempo para que a espécie eletroquimicamente gerada difunda e alcance o eletrodo coletor. Este tempo é denominado tempo de difusão (t_D) (*time of flight*). Após a estimativa do t_D e com base na equação (Equação 17), a constante K foi determinada relacionando diferentes separações entre gerador e o coletor (d) com o produto do tempo de difusão (t_D) e o coeficiente de difusão do íon ferrocianeto ($6,3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) (Figura 17).

Figura 17: Dependência de $(Dt_D)^{1/2}$ com o espaçamento entre os eletrodos.

Pelo coeficiente angular da reta mostrada na Figura 17, foi obtido o valor de K igual a $3,73 \pm 0,07$. Conhecendo o valor de K , outros experimentos foram realizados com o intuito de avaliar a aplicabilidade de SECM na determinação do coeficiente de difusão da espécie eletroativa $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando como precursor o complexo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$. A dependência da corrente monitorada pelo eletrodo coletor com o tempo é mostrada na Figura 18.

Figura 18: Dependência da corrente monitorada pelo eletrodo coletor (microeletrodo) com o tempo para a espécie eletroquimicamente gerada $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando como precursor $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$. Potencial do microeletrodo $100 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl Sat.})}$. Espaçamento entre os eletrodos de $100 \mu\text{m}$.

Os valores do tempo de difusão (t_D) e do coeficiente de difusão (D) estimado para a espécie eletroativa $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foram $(0,93 \pm 0,01) \text{ s}$ e $(7,73 \pm 0,08) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, respectivamente. O coeficiente de difusão estimado mostrou boa concordância com o valor encontrados na literatura $(7,7 \pm 0,1) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (WANG; LIMON-PETERSEN; COMPTON, 2011). Cabe destacar que como a constante K engloba a geometria da célula e possíveis erros de posicionamento do microeletrodo, para eliminar a influência desses parâmetros o valor dessa constante foi determinado a cada novo experimento envolvendo a determinação de coeficientes de difusão.

Com o objetivo de demonstrar a versatilidade da SECM para a determinação de coeficientes de difusão, foi realizado um estudo do efeito da viscosidade sobre o coeficiente de difusão do ferrocianeto. Para tanto, foram executados experimentos em que a viscosidade da solução foi alterada pela adição de glicerol. A Figura 19 apresenta as curvas correspondentes à variação de corrente com o tempo obtidas com o microeletrodo posicionado a 100 μm de um substrato de Pt em soluções com diferentes proporções de glicerol/água (m/v).

Figura 19: Dependência da corrente no eletrodo coletor (microeletrodo) com o tempo durante a geração de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ a partir de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 10 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} para diferentes concentrações de glicerol. Potencial do microeletrodo 500 mV vs. Ag/AgCl_(KCl Sat.). Espaçamento entre os eletrodos de 100 μm .

Como pode ser visualizado na Figura 19, após a aplicação de -100 mV vs. Ag/AgCl_(KCl Sat.) ao substrato ($t = 5$ s) há aumento da corrente medida no microeletrodo e o efeito da viscosidade

da solução nas curvas obtidas é perceptível. A corrente diminuiu com o aumento da quantidade de glicerol e ocorreu aumento no tempo requerido para a chegada dos íons ferrocianeto à superfície do microeletrodo, como consequência da diminuição do coeficiente de difusão dos íons ferrocianetos. Com base na metodologia apresentada anteriormente e utilizando $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ para a determinação da constante K (dados não mostrados), foi determinado o coeficiente de difusão para cada concentração de glicerol. A Tabela 2 apresenta os valores obtidos.

Tabela 2: Resultados obtidos na determinação do coeficiente de difusão de íons ferrocianeto em KCl em misturas contendo água e glicerol em diferentes proporções.

Solução	$\eta / \text{mPa s}$	t_D / s	$D / 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
0%	1,00	0,8	6,3
10%	1,31	1,0	5,0
20%	1,76	1,3	3,9
30%	2,50	1,9	2,6
40%	3,72	2,7	1,9
50%	6,00	4,9	1,0
60%	10,80	9,4	0,5

Com base nos resultados apresentados na Tabela 2, foi utilizada a relação de Stokes-Einstein (LEVINE, 2008) (Equação 18) para avaliar o efeito da viscosidade sobre o coeficiente de difusão do íon ferrocianeto.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H^0} \quad (\text{Equação 18})$$

onde k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, η é a viscosidade da solução e R_H^0 é o raio hidrodinâmico.

De acordo com esta equação, o coeficiente de difusão para esferas isoladas numa solução ideal é inversamente proporcional à viscosidade da solução. Tal proporcionalidade não é mantida em sistemas não-ideais. A Figura 20 apresenta a relação entre o coeficiente de difusão, calculado usando a Equação 17, e o inverso da viscosidade. Sendo essa relação linear, conclui-se que o sistema obedece à equação de Stokes-Einstein e tal fato indica que a mistura água/glicerol possui um comportamento ideal, ou seja, pode-se considerar que íons ferrocianeto difundem como esferas isoladas nessas condições (LEVINE, 2008). Os resultados obtidos tiveram boa concordância com aqueles reportados na literatura utilizando microestruturas geradoras/coletoras (FERREIRA et al., 2007).

Figura 20: Dependência do coeficiente de difusão do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ com o inverso da viscosidade do meio. $R^2 = 0,99842$.

4.2.2 Comportamento eletroquímico de íons ferrocínio em soluções aquosas

Constatada a potencialidade da SECM para a determinação de coeficientes de difusão, foram realizados experimentos utilizando sistemas micelares compostos pelo tensoativo C₁₄TABr (brometo de tetradecil trimetil amônio) com o objetivo de determinar o coeficiente de difusão das micelas formadas em concentrações acima da concentração micelar crítica (cmc).

Entretanto, para a determinação do coeficiente de difusão de micelas, se faz necessário o uso de uma sonda eletroativa, pois essas micelas não são eletroativas. As sondas eletroativas utilizadas neste tipo de experimento devem ter como características: (i) afinidade química pela pseudo-fase micelar (expressa por elevado coeficiente de partição na micela); (ii) tamanho compatível com as dimensões do interior da micela. A sonda mais utilizada é o ferroceno, devido às suas características eletroquímicas favoráveis, elevado coeficiente de transferência eletrônica, e solubilidade extremamente baixa em água (CHARLTON; DOHERTY, 2000).

Em função dessas características, primeiramente foi realizada a caracterização eletroquímica de íons ferrocínio, precursor de provável sonda a ser utilizada na determinação do coeficiente de difusão de micelas, o ferroceno.

Os íons ferrocínio são a forma oxidada do ferroceno, molécula organometálica composta por dois anéis de ciclopentadienil ligados a um átomo central Fe²⁺ (WERNER, 2012). Por possuir uma baixa solubilidade em água (1×10^{-8} mol L⁻¹) (CHARLTON; DOHERTY, 2000), os estudos eletroquímicos envolvendo ferroceno são tipicamente realizados em solventes orgânicos. O processo de oxidação ocorre com a participação de um elétron, originando o cátion ferrocínio (Equação 19).

Por possuir carga, os íons ferrocínio são solúveis em meio aquoso e tal fato pode ser evidenciado experimentalmente. O comportamento eletroquímico desse cátion foi estudado por voltametria cíclica utilizando um microeletrodo de platina ($r = 10 \mu\text{m}$) em soluções na ausência e na presença de diferentes eletrólitos (KCl , SO_4^{-2} e BF_4^-) (Figura 21). O íon tetrafluoroborato foi selecionado, pois é o contra íon que acompanha o ferrocínio comercializado.

Figura 21: Terceiro ciclo de voltamogramas obtidos com um microeletrodo de platina ($r = 10 \mu\text{m}$) em soluções contendo íons ferrocínio 5 mmol L^{-1} na ausência (A) e na presença de Cl^{-1} (B), SO_4^{-2} (C) e BF_4^{-} $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (D). $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$; sentido da varredura de $0,5 \text{ V}$ para $-0,1 \text{ V}$, com posterior reversão de potencial.

Como pode ser visualizado na Figura 21, os voltamogramas obtidos apresentaram um perfil diferente daquele obtido rotineiramente com microeletrodos. Considerando uma situação hipotética, em que um voltamograma é registrado em uma solução contendo apenas a espécie em sua forma oxidada, ao se realizar a varredura de potencial não se espera o aparecimento de um

componente anódico. Esta suposição é embasada no fato de que o transporte de massa é muito efetivo ao se trabalhar com microeletrodos (FORSTER; KEYES, 2007; PAIXÃO; BERTOTTI, 2009; ZOSKI, 2002b). No entanto, nota-se que os voltamogramas obtidos apresentam perfis similares para os diferentes tipos de eletrólitos, mas possuem um componente catódico, resultante da redução do íon ferrocínio, e um componente anódico. Uma possível explicação para esse fenômeno está na baixa solubilidade da espécie formada na redução do íon ferrocínio, ou seja, ferroceno. Como a solubilidade do ferroceno em água está na ordem de 10^{-8} mol L⁻¹, provavelmente essa espécie eletrogerada ficou adsorvida na superfície do microeletrodo. Esta suposição foi confirmada com o estudo voltamétrico do ferrocínio em meio contendo micelas de surfactante (Figura 22).

Figura 22: Terceiro ciclo de voltamogramas obtidos em soluções contendo íons ferrocínio 5 mmol L⁻¹ na ausência (a) e na presença de C₁₄TABr 5 mmol L⁻¹ (b) e 120 mmol L⁻¹ (c). Microeletrodo de Pt (r = 5 µm). $\nu = 50$ mV s⁻¹.

Como pode ser visualizado na Figura 22, curvas c e b, quando os experimentos foram realizados em solução contendo tensoativo ocorreu uma mudança no perfil dos voltamogramas e uma diminuição das correntes relacionadas com os processos eletródicos, ou seja, ocorreu uma diminuição dos componentes anódico e catódico com o aumento da concentração de $C_{14}TABr$. No caso do componente anódico, o aumento da concentração de surfactante criou um microambiente propício para o ferroceno eletrogerado, proporcionando sua saída da superfície do microeletrodo. Na concentração igual a 120 mmol L^{-1} do surfactante, a corrente anódica foi próxima de zero, o que caracteriza o comportamento esperado para um voltamograma obtido com microeletrodos. No caso da diminuição da componente catódica com a presença de $C_{14}TABr$, este fenômeno pode ter sido provocado por eventual interação do ferrocínio com as micelas (Figura 22-b e c). Com base nesses resultados pode-se concluir que, por não serem observadas mudanças significativas no processo catódico referente à redução do ferrocínio com o aumento da concentração de $C_{14}TABr$, essa sonda possui uma baixa afinidade pelo meio micelar, ao contrário do que ocorreu com a espécie eletrogerada (ferroceno), que possui alta afinidade pelas micelas formadas pelo surfactante.

4.2.3 Determinação do coeficiente de difusão de micelas de $C_{14}TABr$

A determinação do coeficiente de difusão micelar do brometo de tetradecil trimetil amônio ($C_{14}TABr$) foi realizada conforme a metodologia apresentada na seção 4.2.1. Este surfactante foi selecionado para validar a metodologia desenvolvida com base nos resultados obtidos e confrontados com os reportados na literatura (FERREIRA et al., 2010).

Os experimentos foram realizados com o objetivo de determinar o coeficiente de difusão das micelas de $C_{14}TABr$ na concentração micelar crítica (cmc). Entretanto, para essa

determinação, se fez necessário o uso de uma sonda eletroativa, pois as micelas utilizadas não são eletroativas. A sonda utilizada nesses experimentos foi o ferroceno, eletrogerado pela redução de íons ferrocínio. A Figura 23 apresenta a representação esquemática dos experimentos realizados, onde, assim como mostrado na seção anterior, os íons ferrocínio (FC^+) inicialmente não apresentam afinidade pelo interior da micela Figura 23-A. Todavia, após a aplicação de um potencial adequado no substrato gerador, é possível gerar eletroquimicamente o ferroceno (FC), que possui grande afinidade pelo meio micelar (Figura 23-B).

Figura 23: Representação esquemática dos experimentos SECM em sistemas micelares. A) Substrato não polarizado; B) Substrato polarizado.

Com base nos voltamogramas apresentados na Figura 22 foram selecionados os potenciais aplicados ao eletrodo gerador e ao eletrodo coletor e foi realizado um procedimento similar ao apresentado em 4.2.1:

a) Inicialmente, um microeletrodo de Pt ($r = 5 \mu\text{m}$) foi posicionado a $100 \mu\text{m}$ de separação do substrato utilizando uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 10 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

b) A estimativa da constante da célula (K) foi realizada utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ obtido eletroquimicamente através de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 10 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, assim como explicado anteriormente.

c) Após a estimativa de K , a célula eletroquímica foi lavada com água destilada e posteriormente adicionou-se uma solução de íons ferrocínio 1 mmol L^{-1} em C_{14}TABr $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

d) As medidas foram realizadas polarizando inicialmente ambos os eletrodos em um potencial de $500 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat.})}$, no qual não ocorre reação eletródica.

e) Após 5 s do início do experimento, ao eletrodo gerador (substrato) foi aplicado um potencial necessário para que ocorra a geração da espécie reduzida ($-100 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat.})}$) e o eletrodo coletor foi mantido em um potencial de $500 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat.})}$.

A dependência da corrente no eletrodo coletor (microeletrodo) com o tempo durante a geração de FC a partir de FC^+ 1 mmol L^{-1} em C_{14}TABr $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ é apresentada na Figura 24.

Figura 24: Dependência da corrente no eletrodo coletor (microeletrodo) com o tempo durante a geração de FC a partir de FC^+ 1 mmol L^{-1} em $C_{14}TABr$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ iniciada em $t = 5 \text{ s}$. Potencial aplicado ao microeletrodo $-100 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(KCl \text{ Sat.})}$. Espaçamento entre os eletrodos de $100 \mu\text{m}$.

Como pode ser visualizado, assim como nos experimentos apresentados anteriormente, até $t = 5 \text{ s}$ não há sinal de corrente monitorada pelo microeletrodo, ou seja, não ocorre a chegada de nenhum material eletroativo a sua superfície. Após a aplicação de $-100 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(KCl \text{ sat})}$ ao substrato (em $t = 5 \text{ s}$), em questão de mais alguns segundos nota-se um aumento na corrente no microeletrodo, a qual está relacionada com a chegada, por difusão, da espécie eletroquimicamente gerada no substrato (FC). O aumento do tempo de difusão (t_D), quando comparado com aquele obtido em solução contendo ferricianeto de potássio (Figura 16), está relacionado com a presença das micelas em solução, ou seja, no início do experimento o FC^+ , por possuir carga, encontra-se fora das micelas. Quando é aplicado o potencial ao substrato ocorre a

geração do FC, que possui características hidrofóbicas e preferencialmente irá para o interior das micelas. Como o tamanho da micela é muito maior do que o dos íons estudados anteriormente, o tempo requerido para a espécie chegar à superfície do microeletrodo é maior e, dessa forma, o t_D estimado neste experimento é maior. As concentrações das soluções tensoativo:sonda utilizadas foram mantidas sempre na razão 100:1 em função do número de agregação ($N_{agg} = 72$ a 74) (HANSSON et al., 2000; LIANOS; ZANA, 1981), de tal forma a garantir que para cada molécula de FC eletroquimicamente formada houvesse pelo menos uma micela disponível em solução. O tempo de difusão e o valor do coeficiente de difusão estimado para esse sistema foram $(5,1 \pm 0,3)$ s e $(4,0 \pm 0,1) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, respectivamente. O valor estimado difere significativamente dos valores normalmente encontrados para ferroceno livre em solução aquosa ($D = 6,7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) (GEORGES; DESMETTRE, 1984) em função da inserção da espécie eletroativa (ferroceno) no interior da micela de $C_{14}TABr$.

Também foi avaliado o efeito da separação entre eletrodo gerador e eletrodo coletor sobre o tempo de difusão e os valores de corrente medidos com o eletrodo coletor. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 25.

Figura 25: Dependência do tempo de difusão e da corrente monitorada no eletrodo coletor com a separação entre eletrodo gerador e eletrodo coletor. Medidas realizadas em uma solução contendo $\text{FC}^+ 1 \text{ mmol L}^{-1} + \text{C}_{14}\text{TABr } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Como pode ser observado, ocorre uma diminuição da corrente medida no eletrodo coletor com o aumento da separação entre eletrodo gerador e eletrodo coletor. Essa diminuição foi provocada pela difusão das espécies eletrogeradas para o seio da solução, a qual acarreta uma diminuição da quantidade de material que chega à superfície do microeletrodo. Além disso, o tempo de difusão aumenta com o aumento da distância gerador-coletor, o que já era esperado, pois o espaço (d) percorrido pelo conjunto micela+sonda até a superfície do eletrodo coletor é maior.

Também foi avaliado o efeito da concentração de C_{14}TABr sobre o coeficiente de difusão. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 26.

Figura 26: Dependência do coeficiente de difusão micelar do C₁₄TABr em função da concentração do tensoativo. Proporção concentração tensoativo:sonda 100:1.

É conhecido o fato de que a estrutura micelar e as interações inter-micelares são dependentes de variáveis experimentais, incluindo: a estrutura do surfactante (comprimento da parte hidrofóbica, da “cabeça” polar e natureza do contra-íon), sua concentração, natureza e concentração de outras espécies presentes em solução (orgânicas ou inorgânicas), temperatura, e condições de cisalhamento da solução. Em estudos de sistemas micelares utilizando métodos eletroquímicos assume-se, geralmente, que a interação intermicelar não afeta o comportamento eletroquímico da sonda (CHARLTON; DOHERTY, 1999, 2000). Como pode ser observado na Figura 26, ocorre uma diminuição do coeficiente de difusão com o aumento da concentração de tensoativo. Isto se deve ao aumento das interações entre as micelas. Em concentrações acima de 0,1 mol L⁻¹ de tensoativo ocorreu uma mudança no coeficiente angular do gráfico, pois pode ter ocorrido mudanças na geometria das micelas (HIEMENZ; RAJAGOPALAN, 1997)

Mesmo em concentrações muito próximas à cmc, as micelas iônicas interagem entre si e, conseqüentemente, o coeficiente de difusão micelar medido, D_{Obs} , é menor do que aquele que seria observado na cmc; D_{cmc} . Para contornar este problema, é preciso determinar o coeficiente de difusão micelar em diferentes concentrações de surfactante (Figura 27), e aplicar a teoria de interação linear (DICKINSON, 1983), mostrada na Equação 20.

$$D_{Obs} = D_{cmc} [1 - k_D(C_{Surf} - cmc)] \quad (\text{Equação 20})$$

onde k_D = coeficiente de interação intermicelar; C_{Surf} = concentração de tensoativo.

Como pode ser observado na Figura 27, ocorre uma diminuição do coeficiente de difusão com o aumento da concentração de tensoativo. Tal fato está relacionado com o aumento das interações entre as micelas. Com base nesses resultados obtidos e na teoria de interação linear (Equação 20), foi determinado o coeficiente de difusão na cmc de micelas de $C_{14}TABr$. O valor encontrado foi $D_{cmc} = (1,1 \pm 0,3) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

Figura 27: Dependência do coeficiente de difusão micelar com a concentração de $C_{14}\text{TABr}$ obtida aplicando a Equação 20 ($R = 0.9901$).

Os valores de coeficiente de difusão na cmc podem ser utilizados para calcular o raio hidrodinâmico, o volume de uma micela e o número de agregação. O cálculo do raio hidrodinâmico foi realizado utilizando a equação de Stokes-Einsten (LEVINE, 2008) (Equação 18):

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H^0} \quad (\text{Equação 18})$$

Onde: k = constante de Boltzmann = $1,38 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-1} \text{ K}^{-1}$

T = temperatura = 298.15 K

η = viscosidade da solução = 0,00894 P

D = coeficiente de difusão = $1,15 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$

R_H^0 = raio hidrodinâmico

O valor encontrado foi $R_H^0 = 21,2 \pm 0,3 \text{ \AA}$. O volume da micela foi determinado utilizando o raio hidrodinâmico e considerando que a micela fosse uma esfera (Eq. 4):

$$V_{\text{mic}} = 4/3\pi(R_H^0)^3 = \text{volume da micela} = 39891 \text{ \AA}^3 \quad (\text{Eq. 4})$$

O número de agregação N_{agg} obtido foi:

$$\Rightarrow N_{\text{agg}} = \text{número de agregação} = V_{\text{mic}} / v_{\text{mon,hydr}} = 72,65 \approx 73 \pm 2.$$

Onde: $v_{\text{mon,hydr}}$ = volume do monômero hidratado = $549,1 \text{ \AA}^3$

O valor do N_{agg} encontrado foi concordante com valores encontrados na literatura (Tabela 3):

Tabela 3: Resultados obtidos para D_{cmc} , R_H e N_{agg} para micelar de $C_{14}\text{TABr}$

$C_{14}\text{TABr}$	$D_{\text{cmc}} / 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$	R_H	N_{agg}
(FERREIRA et al., 2010)	1,08	20,2	68
Método proposto	$1,15 \pm 0,01$	$21,2 \pm 0,3$	73 ± 2

4.2.4 Determinação do coeficiente de difusão micelar de $C_x\text{MelmCl}$

Utilizando a mesma abordagem empregada na determinação do coeficiente de difusão micelar de $C_{14}\text{TABr}$, foram realizados experimentos com surfactantes cloreto de 1-alkil-3-metilimidazólio, $C_x\text{MelmCl}$ ($x = 10, 12, 14, 16$). Esta classe de surfactantes também é conhecida como líquidos iônicos tensoativos, por possuírem as principais características dos líquidos iônicos (GALGANO; EL SEOUD, 2010, 2011).

Inicialmente, foi realizado o estudo eletroquímico do FC^+ em uma solução do surfactante $\text{C}_{10}\text{MelmCl}$. A Figura 28 apresenta os voltamogramas obtidos com um microeletrodo de Pt ($r = 10 \mu\text{m}$). A proporção entre surfactante e a sonda foi mantida em 50:1 em função do valor calculado para N_{agg} do $\text{C}_{10}\text{MelmCl}$ ser igual a 32 (GALGANO; EL SEOUD, 2011).

Figura 28: Voltamogramas cíclicos obtidos com um microeletrodo de Pt ($r = 10 \mu\text{m}$) em solução contendo $\text{C}_{10}\text{MelmCl}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na ausência (a) e na presença de FC^+ 2 mmol L^{-1} . $V = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

Como pode ser observado na Figura 28, na ausência de FC^+ o voltamograma obtido não apresenta sinal de corrente relacionado com processos faradaicos, demonstrando assim que o surfactante não é eletroativo. Todavia, quando a solução contém FC^+ observa-se o surgimento de corrente faradaica em potenciais próximos a $0,25 \text{ V}$, a qual está relacionada com a redução do FC^+ a FC . No entanto, o voltamograma também apresentou um aumento na corrente em potenciais mais positivos, indicando que neste meio micelar o FC eletrogerado no processo

catódico permanece acumulado na interface microeletrodo/solução. Este comportamento pode ser consequência do tamanho da cadeia carbônica que compõe esse surfactante: por possuir apenas 10 carbonos, as micelas oriundas da sua agregação não criam um microambiente propício para a difusão do FC para o interior das micelas na escala de tempo em que os voltamogramas foram registrados.

Com base nesses resultados, foi possível constatar que apesar do perfil do voltamograma obtido do FC^+ em meio de $\text{C}_{10}\text{MelmCl}$ ser diferente do obtido em meio de C_{14}TABr (Figura 22), os potenciais são os mesmos. Em função desse comportamento similar, foram selecionados os mesmos potenciais apresentados na seção anterior para a realização dos experimentos com SECM no modo SG/TC.

A dependência da corrente no eletrodo coletor (microeletrodo) com o tempo, durante a geração de FC a partir de FC^+ $1,6 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{C}_{10}\text{MelmCl}$ $0,08 \text{ mol L}^{-1}$ é apresentada na Figura 29 para dois diferentes espaçamentos substrato/microeletrodo.

Figura 29: Dependência da corrente no eletrodo coletor (microeletrodo) com o tempo durante a geração de FC a partir de FC^+ $1,6 \text{ mmol L}^{-1}$ em $C_{10}\text{MelmCl}$ $0,08 \text{ mol L}^{-1}$ com início em $t = 5 \text{ s}$. Potencial aplicado ao microeletrodo $-500 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat.})}$. Espaçamento entre os eletrodos: $75 \mu\text{m}$ (linha vermelha) e $100 \mu\text{m}$ (linha azul).

Similarmente ao comportamento do surfactante $C_{14}\text{TABr}$, descrito na seção anterior, até $t = 5 \text{ s}$ não há sinal de corrente monitorada pelo microeletrodo, ou seja, não ocorre a chegada de nenhum material eletroativo à sua superfície. Após a aplicação de $-100 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat.})}$ ao substrato, em $t = 5 \text{ s}$, nota-se um aumento na corrente no eletrodo coletor, a qual está relacionada com a chegada, por difusão, da espécie eletroquimicamente gerada no substrato (FC). Também pode ser observado que com o aumento da separação entre eletrodo gerador e eletrodo coletor, o tempo de difusão da espécie eletrogerada também aumenta. Esse comportamento pode ser melhor visualizado na Figura 30, em que são apresentados dados para outros valores de separação entre eletrodo gerador e eletrodo coletor.

Figura 30: Dependência do tempo de difusão com a separação entre eletrodo gerador e eletrodo coletor. Medidas realizadas em uma solução contendo FC^+ $1,6 \text{ mmol L}^{-1}$ + $\text{C}_{10}\text{MelmCl}$ $0,08 \text{ mol L}^{-1}$.

Como pode ser visualizado na Figura 30, o gráfico da dependência do tempo de difusão com a separação entre eletrodo gerador e eletrodo coletor apresenta duas regiões lineares (círculos vermelho e azul). Na região em destaque com o círculo azul, o comportamento é coerente com as previsões teóricas, pois há um aumento no tempo de difusão com o aumento da separação entre gerador e coletor. No entanto, para pequenas separações (círculo vermelho) e considerando os erros associados às medidas, o aumento da distância entre gerador e coletor não exerce influência significativa no tempo de difusão. Esse comportamento pode estar relacionado com o menor tempo disponível para haver interação entre micela e sonda, ou seja, pode ter ocorrido a difusão de FC livre. Com o intuito de confirmar essa suposição, foi calculado o coeficiente de difusão considerando os tempos de difusão entre 0,4 e 0,5 s e o resultado foi de

aproximadamente $6,9 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, o que corresponde ao coeficiente do ferroceno livre (BOND et al., 1987; GEORGES; DESMETTRE, 1984).

Para o surfactante contendo 12 carbonos na cadeia carbônica ($\text{C}_{12}\text{MelmCl}$), o aumento da separação entre gerador e coletor acarretou em um aumento linear no tempo de difusão (Figura 31), similarmente ao comportamento obtido para o surfactante C_{14}TABr . No entanto, nota-se que para a separação de $75 \text{ }\mu\text{m}$ o tempo de difusão corresponde ao do ferroceno livre e, diferentemente do $\text{C}_{10}\text{MelmCl}$, para experimentos realizados com separações entre eletrodo gerador e eletrodo coletor acima de $80 \text{ }\mu\text{m}$, o FC eletrogerado interage com as micelas de $\text{C}_{12}\text{MelmCl}$. O voltamograma de íons ferrocínio em $\text{C}_{12}\text{MelmCl}$ foi similar ao obtido para o $\text{C}_{10}\text{MelmCl}$ e, por essa razão, o mesmo foi omitido.

Figura 31: Dependência do tempo de difusão com a separação entre eletrodo gerador e eletrodo coletor. Medidas realizadas em uma solução contendo FC^+ $0,43 \text{ mmol L}^{-1}$ + $\text{C}_{12}\text{MelmCl}$ $0,03 \text{ mol L}^{-1}$.

Também foi avaliado o efeito da concentração de surfactante sobre o coeficiente de difusão para o $C_{10}\text{MelmCl}$ e o $C_{12}\text{MelmCl}$ (Figura 32).

Figura 32: Dependência do coeficiente de difusão micelar com a concentração de $C_{10}\text{MelmCl}$ e $C_{12}\text{MelmCl}$.

Assim como discutido na seção anterior, o aumento da concentração de surfactante acarretou em uma diminuição do coeficiente de difusão devido ao aumento das interações entre as micelas. Entretanto, a diminuição não foi linear, inviabilizando a aplicação da teoria das interações lineares (Equação 20, p. 76) para determinar o coeficiente de difusão de micelas de $C_{10}\text{MelmCl}$ e $C_{12}\text{MelmCl}$ na cmc. A Figura 32 também mostra que com o aumento da cadeia carbônica dos surfactantes há diminuição do coeficiente de difusão. Esse comportamento está relacionado com o tamanho da micela, ou seja, quanto maior a cadeia carbônica maior será a micela.

Os experimentos na presença dos surfactantes $C_{14}\text{MelmCl}$ e $C_{16}\text{MelmCl}$ mostraram que esses surfactantes adsorvem fortemente na superfície do eletrodo, ocasionando fenômenos de passivação. Este fenômeno pode ser observado na Figura 33, a qual apresenta voltamogramas cíclicos obtidos em uma solução de ferricianeto de potássio antes e após a aplicação do programa de potencial utilizado para a eletrogeração da sonda em solução contendo apenas os surfactantes. Antes da aplicação do programa de potencial, os voltamogramas obtidos (linha preta) com o eletrodo gerador e com o eletrodo coletor apresentaram perfil característico do ferricianeto de potássio (BARD; FAULKNER, 2000). No entanto, após a aplicação do programa de potencial ocorreu uma mudança significativa no perfil dos voltamogramas, ocorrendo diminuição da corrente e completa distorção do voltamograma. Em função desse comportamento, as medidas para a determinação do coeficiente de difusão dos surfactantes $C_{14}\text{MelmCl}$ e $C_{16}\text{MelmCl}$ ficaram impossibilitadas.

Figura 33: Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando eletrodos de platina com raio de 3 mm (A e B) e 10 µm (C e D) em uma solução de ferricianeto de potássio 15 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹. Medidas realizadas antes (linha preta) e após (linha vermelha) aplicação do potencial utilizado nas medidas para determinação do coeficiente de difusão na presença de 0,1 mol L⁻¹ de C₁₄MelmCl (A e C) e C₁₆MelmCl (B e D). $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

4.3 Estudo da difusão de espécies através de bicamadas lipídicas

O estudo da difusão de espécies através de bicamadas lipídicas foi realizado em três etapas. Na primeira etapa (seção 4.3.1), foi avaliado o uso da SECM no monitoramento da difusão de espécies eletroativas através de modelos de membranas semipermeáveis (papel celofane). Na segunda etapa (seção 4.3.2), foram realizados experimentos para a obtenção e caracterização de bicamadas lipídicas planas (BLM, Black Lipids Membranes) e, por fim, na terceira etapa (seção 4.3.3) foram realizados experimentos envolvendo o monitoramento de espécies através das BLMs.

4.3.1 Difusão de espécies através de modelos de membranas

Para a realização dos experimentos SECM envolvendo modelos de membranas, um papel celofane ($\sigma = 40 \mu\text{m}$, COOPERCEL, São Paulo) foi adaptado horizontalmente em uma célula eletroquímica que continha dois compartimentos, sendo um posicionado abaixo do papel celofane, preenchido com uma solução contendo a espécie eletroativa em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (solução doadora), e o segundo compartimento situado sobre o papel celofane, contendo uma solução aceptora ($\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e os eletrodos utilizados para a realização das medidas eletroquímicas. A representação esquemática dos experimentos envolvendo os modelos de membrana é mostrada na Figura 34.

Figura 34: Representação esquemática do arranjo experimental utilizado no monitoramento da difusão das espécies eletroativas através do celofane utilizando SECM. Os eletrodos de referência e auxiliar foram omitidos.

Em uma primeira etapa, foram realizados experimentos com o intuito de avaliar a permeabilidade da membrana (papel celofane) a íons H^+ e $[Fe(CN)_6]^{3-}$. Este estudo foi realizado acompanhando a corrente oriunda da chegada de espécies eletroativas na superfície de um microeletrodo de Pt ($r = 12,5 \mu m$). Esse se encontrava polarizado em potencial apropriado e foi posicionado a uma distância de $10 \mu m$ em relação à superfície do papel celofane.

O posicionamento do microeletrodo foi realizado utilizando o O_2 dissolvido na solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como mediador redox. A Figura 35 apresenta o sinal medido no microeletrodo em função do tempo para os experimentos realizados com soluções de H^+ e $[Fe(CN)_6]^{3-}$ colocadas no compartimento inferior. Em ambos os casos evidenciou-se um aumento na corrente ao longo do experimento. Nota-se que para o experimento envolvendo íons H^+ (Figura 35-A), a corrente no início do experimento não estava em valor próximo a zero e isso se deve à redução do O_2 dissolvido em solução. Neste caso, observou-se um aumento expressivo

da corrente logo no início do experimento, como consequência do transporte de íons H^+ do compartimento inferior para o superior via celofane. No experimento realizado com a solução doadora de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (Figura 35-B), o aumento de corrente foi muito menos pronunciado e percebe-se claramente que o transporte pela membrana é mais lento. O comportamento distinto destas duas espécies pode estar relacionado com a diferença de tamanho do íons e com os valores dos coeficientes de difusão do H^+ e do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, respectivamente $7,8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (BARD; FAULKNER, 2000; UNWIN, 1997).

Figura 35: Dependência da corrente em função do tempo para permeação através de membrana de celofane. Experimentos realizados com um microeletrodo de Pt ($r = 12,5 \mu\text{m}$). Curvas pretas: solução aceptora e doadora: $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Curvas vermelhas: Solução aceptora: $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$; solução doadora (A) $\text{H}^+ 10 \text{ mmol L}^{-1} + \text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (B) $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} 10 \text{ mmol L}^{-1} + \text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Potencial do microeletrodo (A) $-750 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat.})}$ e (B) $-100 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat.})}$.

Também foram realizados experimentos para a obtenção de imagens com o intuito de investigar se a permeação de íons H^+ ocorria de forma homogênea ao longo da membrana. As imagens foram obtidas deslocando-se o microeletrodo polarizado a um potencial de -750 V $Ag/AgCl_{(KCl\ sat.)}$ no eixo xy e mantendo-se sua posição no eixo z a uma altura fixa de 10 μm em relação à membrana.

A Figura 36-A apresenta a imagem obtida no experimento SECM. Como pode ser visualizado na imagem, há regiões que apresentaram um maior sinal de corrente (colorações mais claras) em relação a outras regiões (coloração escura). Este comportamento indica que a permeação desta espécie através da membrana não ocorre de forma homogênea. Uma segunda imagem foi obtida nas mesmas condições experimentais, mas na ausência de íons H^+ nos compartimentos (Figura 36-B). Neste experimento controle (branco), não se observou corrente faradaica, confirmando que os resultados obtidos no experimento anterior refletem a permeação de prótons pela membrana semipermeável.

Figura 36: Imagem SECM referente à permeação através de papel celofane obtidas na presença de íons H^+ (A) e na ausência (B). Velocidade de aquisição da imagem: $20 \mu\text{m s}^{-1}$.

A permeação de íons ferricianeto através do celofane também foi estudada de maneira similar. Em função dos resultados apresentados na Figura 35, onde foi evidenciado que a permeação do ferricianeto ocorre mais lentamente que a dos íons H^+ , as imagens foram

registradas em uma mesma região do celofane em diferentes intervalos de tempo de contato da membrana com a solução doadora. Diferentemente da imagem da permeação de íons H^+ (Figura 36), as imagens não apresentaram regiões com grandes variações de corrente. Em função destes resultados, foi selecionada uma linha em comum para todas as imagens e construído um gráfico relacionando corrente, tempo e distância percorrida pelo microeletrodo (Figura 37).

Como pode ser visualizado no gráfico, não ocorreu variação significativa de corrente com a distância percorrida pelo microeletrodo, mostrando assim que nesta região a permeação ocorre de maneira uniforme (durante a varredura na região). Em contrapartida, a corrente aumenta com o tempo, corroborando os resultados apresentados na Figura 35-B.

Figura 37: Corrente monitorada por um microeletrodo de Pt ($r = 12,5 \mu m$) em função da distância percorrida sobre a superfície de papel celofane ao longo do tempo. Solução aceptora: KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; solução doadora: $[Fe(CN)_6]^{3-}$ 10 mmol L^{-1} . Potencial aplicado ao microeletrodo $-100 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(KCl \text{ sat})}$.

A difusão de íons iodeto através de papel celofane também foi estudada. Os experimentos foram realizados utilizando como solução doadora uma solução de KI 10 mmol L⁻¹ em Na₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, e uma solução receptora de Na₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹. Durante as medidas, o microeletrodo de Pt (r = 12,5 μm) foi polarizado em 0,65 V, potencial em que ocorre oxidação anódica do iodeto. A Figura 38 apresenta a dependência da corrente em função do tempo para os experimentos de difusão de íons iodeto através de membranas de celofane com o microeletrodo posicionado em diferentes distâncias da membrana.

Figura 38: Variação de corrente em função do tempo para experimentos de difusão de íons iodeto realizados em diferentes distâncias do microeletrodo em relação ao celofane. Potencial aplicado ao microeletrodo 650 mV vs. Ag/AgCl_(KCl sat).

Como pode ser observado, ocorreu uma diminuição da corrente com o aumento da separação entre microeletrodo e membrana. Essa diminuição está relacionada com a difusão da espécie eletroativa para o seio da solução aceptora. Também é possível verificar oscilações de

corrente durante a difusão, que variam de ± 1 nA a ± 4 nA, e independem da posição do microeletrodo. O esperado seria um aumento da corrente conforme os íons iodeto atravessassem a membrana, até que a concentração da solução aceptora fosse igual à concentração da solução doadora.

A fim de investigar se o resultado encontrado era decorrente do fenômeno de difusão ou de ruídos da rede elétrica, foi realizado um experimento controle, onde foi monitorada a corrente de oxidação dos íons iodeto com um microeletrodo de Pt posicionado a uma distância de 110 μm do substrato, na ausência e na presença do fenômeno de permeação. A Figura 39 apresenta a dependência da corrente com tempo.

Figura 39: Corrente em função do tempo obtida com microeletrodo de Pt ($r = 12,5 \mu\text{m}$) a uma distância de 110 μm em relação ao substrato, em soluções de mesma concentração de íons iodeto. Potencial aplicado ao microeletrodo 650 mV vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{KCl sat})}$.

Na ausência de permeação e com o microeletrodo posicionado a 110 μm de um substrato de acrílico e imerso em uma solução contendo íons iodeto, a corrente atinge rapidamente um

valor de estado estacionário característico do processo de difusão radial e é proporcional à concentração da espécie na solução (curva de cor preta, Figura 39). Quando o experimento foi realizado com permeação de íons iodeto através da membrana (curva de cor vermelha na Figura 39), foi possível observar oscilações de corrente similares às que aparecem na Figura 38. Em função dos resultados obtidos no experimento controle, foi possível concluir que as oscilações são originadas pelo fenômeno de permeação através da membrana, e não por interferências instrumentais.

Duas prováveis explicações para esse fenômeno são: (1) As flutuações de corrente observadas foram provocadas pela estrutura interna não uniforme do papel celofane; (2) ocorreu um confinamento das espécies geradas (I_2) na região entre a membrana e o microeletrodo, ocasionando assim variação no fluxo da espécie eletroativa transportada através da membrana até a superfície do microeletrodo.

4.3.2 Obtenção e caracterização de bicamadas lipídicas planas (BLM)

4.3.2.1 Fabricação da célula de medida

As células de medidas normalmente utilizadas nos estudos envolvendo BLMs possuem uma orientação vertical, na qual a BLM separa dois compartimentos contendo uma solução aquosa (GREWER et al., 2013). No entanto, a realização de experimentos com a SECM depende do uso de uma célula de medida na orientação horizontal pois, em função do sistema de posicionamento, os eletrodos são colocados perpendicularmente em relação à amostra. Para tanto, a célula de medida foi construída em acrílico com base na célula utilizada por Honigmann e

colaboradores (BARTSCH et al., 2012; HONIGMANN et al., 2010). A representação esquemática da célula de medida é apresentada na Figura 40.

Figura 40: Representação esquemática da célula de medida construída para os experimentos envolvendo as BLMs (eletrodo de referência omitido).

Foi utilizado um equipamento de ablação por laser de CO₂, o qual permite o controle do foco, da velocidade do motor de passo e da potência com que o laser incide no material utilizado para a fabricação. A célula de medida construída é composta por dois módulos contendo 3 furos interligados (Figura 41).

Figura 41: Célula eletroquímica construída em acrílico.

Como pode ser visualizado nas fotografias apresentadas na Figura 41, entre os dois módulos de acrílico pode ser inserido o suporte onde serão obtidas as BLMs (não mostrado) e uma borracha que serve para evitar vazamento das soluções. Esse conjunto é fixado utilizando quatro parafusos em uma base metálica do microscópio eletroquímico.

Foram construídas três versões da célula de medida, as quais continham canais de diferentes dimensões que interligavam os dois compartimentos. A variação do tamanho desses canais teve como objetivo diminuir o tempo necessário para as espécies adicionadas ao compartimento acceptor (β) difundirem para o compartimento doador (α) (Figura 42). Em experimentos envolvendo a bicamada, esses compartimentos são separados pela BLM e informações relacionadas com o tempo necessário para as espécies passarem de um compartimento para o outro são importantes para saber quando a espécie de interesse entra em contato com a BLM.

A primeira versão continha um microcanal, com aproximadamente 500 μm de largura, interligando os compartimentos. A segunda versão continha um canal de aproximadamente 2 mm e a terceira 5 mm. A avaliação dessas células foi realizada com base no tempo de permeação de íons ferricianeto do compartimento α para o compartimento β na ausência de convecção. A chegada do ferricianeto foi acompanhada visualmente, pela coloração amarela da solução, e pelo monitoramento de corrente resultante da redução dessa espécie eletroativa. Esse experimento foi realizado posicionando um microeletrodo de platina ($r = 6 \mu\text{m}$) próximo a uma folha de polietileno contendo um orifício de aproximadamente 1 mm de diâmetro (Figura 42).

Figura 42: Representação esquemática do experimento realizado para a caracterização das células de medidas construídas para os experimentos envolvendo as BLMs.

Após o posicionamento, os compartimentos α e β foram preenchidos com 8 mL de uma solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e o eletrodo de platina foi polarizado em $-0,1\text{V vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl Sat.})}$. A variação de corrente em função do tempo para a célula de medida contendo um canal de 5 mm é apresentada na Figura 43.

Figura 43: Variação da corrente em função do tempo para a célula de medida contendo um canal de 5 mm antes e depois da adição de ferricianeto (indicado pela seta). Potencial aplicado ao microeletrodo -100 mV vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{KCl sat})}$.

Como pode ser observado na Figura 43, após a adição de 100 μL de uma solução de ferricianeto de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ no compartimento α , ocorreu um aumento seguido de uma diminuição repentina na corrente monitorada no microeletrodo. Esse comportamento está relacionado com a convecção decorrente da inserção do volume da solução de ferricianeto com uma micropipeta. Também é possível ver que em aproximadamente 200 s a corrente começou a aumentar com o passar do tempo. Esse aumento está relacionado com a chegada de íon ferricianeto na superfície do microeletrodo (compartimento β). O mesmo procedimento foi realizado com as outras células (não mostrado), mas a célula contendo 5 mm (terceira versão) foi selecionada por apresentar o menor tempo para que ocorresse a difusão do íon ferricianeto do compartimento α para o β .

4.3.2.2 Obtenção dos suportes de BLMs

Os suportes utilizados para a fabricação das BLMs foram obtidos com folhas de polietileno com 50 μm de espessura. Nessas folhas, foram realizados buracos com diferentes dimensões utilizando o equipamento de ablação por laser de CO_2 . A Figura 44 mostra fotografia dos buracos obtidos utilizando diferentes potências do laser de CO_2 e velocidade do motor de passo.

Figura 44: Fotografias dos microfuros obtidos em folhas de poliestireno com 50 μm de espessura com equipamento de ablação por laser de CO_2 .

Em consequência do aquecimento local, provocado pela incidência do laser, os diâmetros dos furos obtidos nos suportes de polietileno foram maiores do que os selecionados no programa do equipamento e também ocorreu um acúmulo de material na borda, conforme se observa na Figura 44. Pela análise dessa figura, também pode ser visto que não houve grandes variações nas dimensões dos furos com a variação da potência do laser e da velocidade do motor de passo, mas

a alteração dessas variáveis acarretou a deformação da circunferência, principalmente quando foi utilizada a potência de 30%. Os valores aproximados dos diâmetros dos buracos obtidos foram 350, 450, 650 e 900 μm .

Apesar da difícil observação visual, os buracos obtidos utilizando 20% de potência e 30% da velocidade do motor de passo apresentaram uma borda mais homogênea e sem muitas protuberâncias. Em função disso, esses parâmetros foram utilizados para a obtenção dos microfuros utilizados na preparação das BLMs.

4.3.2.3 Obtenção e caracterização das BLMs

A formação das BLMs foi realizada utilizando o método de Miller, de acordo com o qual uma solução de um lipídio em solvente orgânico é “pincelada” no suporte imerso em uma solução aquosa (MUELLER et al., 1963). Assim como apresentado na seção anterior, o suporte contém um buraco onde a bicamada lipídica é formada. No entanto, não foi utilizado um pincel para a realização desse procedimento e sim um capilar de vidro com uma bolha de ar, em cuja superfície existe o solvente e o lipídio.

Rotineiramente, a confirmação de que as BLMs foram obtidas é realizada visualmente e/ou pela medida de alguma característica elétrica da bicamada. Na caracterização visual é utilizado um microscópio óptico para a observação do local onde foi formada a BLM. Com esse experimento é possível verificar o aparecimento de regiões escuras por causa da interferência destrutiva provocada pela membrana. Outra evidência da formação da BLM é a aparência das bordas onde está localizada a interface entre a BLM e o suporte, que ficam mais claras. A diferença de coloração evidenciada nessa região, também conhecida como “*torus*” ou *Plateau*-

Gibbs, ocorre como consequência da maior quantidade de solvente e nessa condição a BLM não é formada. (WHITE, 1972; WILBURN; WRIGHT; CLIFFEL, 2006).

No entanto, esse procedimento é um indicativo de que a BLM foi obtida e não traz informação sobre falhas na BLM, por exemplo, poros, que podem ser decorrentes de má formação. As medidas elétricas, por exemplo, resistência elétrica, suprem essa lacuna, pois uma BLM não modificada possui uma resistência muito alta e a presença de falhas na membrana alteram esse parâmetro (RAJAPAKSHA; WANG; LU, 2013).

Foi realizada inicialmente a caracterização visual das BLMs utilizando um microscópio óptico. Esses experimentos foram realizados em bicamadas formadas em suportes contendo buracos de diferentes diâmetros. Esses procedimentos tiveram o intuito de avaliar a viabilidade de obter BLMs com diferentes dimensões. A Figura 45 apresenta as imagens obtidas após 3 min da formação das BLMs.

Figura 45: Micrografias obtidas na ausência e na presença das BLMs em microfuros feitos com ablação por laser de CO_2

Como pode ser observado na Figura 45, nos microfuros com tamanhos maiores (650 e 900 μm) pode ser facilmente visualizada uma região mais clara, a qual pode estar relacionada

com o *torus*, que é a parcela rica em solvente das BLMs. Em contrapartida, para as dimensões menores (350 e 450 μm) a observação dessa região fica dificultada e uma possível explicação tem relação com a pequena capacidade de magnificação do microscópio óptico utilizado. Também não foi possível a observação de regiões escuras na bicamada e isso pode ser resultado da maneira com que a iluminação do microscópio óptico utilizado nos experimentos é incidida na amostra (microscópio de reflexão).

Como a caracterização visual é apenas um indicativo da presença da BLM, foram realizados experimentos para estimar a condutividade entre soluções contida em dois compartimentos separados pela bicamada. Os experimentos foram realizados utilizando um condutivímetro e dois fios de platina como eletrodos, sendo um posicionado no compartimento α e outro no compartimento β . De maneira similar, as membranas foram formadas em suportes com diferentes dimensões imersos em uma solução de KCl 0,1 mol L⁻¹. As medidas de condutividade foram realizadas após 20 minutos e os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Valores de condutividade elétrica obtidos para BLMs formadas em suportes contendo diferentes dimensões.

Diâmetro Microfuro (μm)	Condutividade (μS)	
	Ausência da BLM	Presença da BLM
350	322	47.8
450	490	75.2
650	678	90.2

Como pode ser visualizado na Tabela 4, na ausência das BLMs ocorreu um aumento na condutividade à medida que dados foram obtidos com buracos de maior tamanho. Na presença das BLMs, ocorre uma diminuição da condutividade quando se faz a comparação com dados obtidos na ausência das BLMs. Também nesse caso, há aumento da condutividade com o

aumento do diâmetro do buraco do suporte. Esse aumento pode estar relacionado com as flutuações que ocorrem na membrana, as quais são intensificadas com o aumento da dimensão (MAYER et al., 2003). Foram realizados dois experimentos controle nos quais *i.* os compartimentos foram separados por um suporte sem buraco e *ii.* não houve separação dos compartimentos com suporte. Os valores de condutividade obtidos foram 39 μS e 2,5 mS, respectivamente, sendo esses valores extremos em relação às situações em que se trabalhou com suportes contendo furos. As BLMs formadas no suporte contendo buraco de 900 μm de diâmetro foram descartadas devido à baixa estabilidade, o que impossibilitaria estudo posterior pela técnica SECM.

Com o intuito de obter medidas relacionadas com a resistência das BLMs, foi realizado um experimento envolvendo impedância eletroquímica. Esses experimentos utilizaram a mesma configuração dos experimentos de condutividade, em que fios de platinas foram posicionados em compartimentos diferentes e as medidas foram realizadas em uma solução de KCl 0,1 mol L⁻¹. Foi utilizado o suporte contendo um furo de 450 μm , pois as BLMs formadas nesse suporte possuem dimensões e estabilidade propícias para a realização de experimentos iniciais envolvendo SECM. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 46.

Figura 46: Representações de Nyquist para os espectros de impedância eletroquímica obtidos com A) somente o suporte contendo um furo de 450 μm e B) na presença da BLM. (■) dados experimentais; (-) dados simulados.

Como pode ser observado na Figura 46-A, no espectro de impedância eletroquímica na ausência da BLM não existe semicírculo relacionado com a resistência de transferência de carga. No entanto, na presença da BLM (Figura 46-B) é possível visualizar um semicírculo referente a esse processo, devido à presença da bicamada. Os dados experimentais foram corroborados com os dados teóricos com base no circuito de Randles apresentado na Figura 47 e, conseqüentemente, foi possível estimar os valores da resistência elétrica e da capacitância da BLM. Os valores obtidos foram 11,1 $\mu\text{F cm}^{-2}$ para capacitância e $1,2 \times 10^7 \Omega \text{ cm}^{-2}$ para a resistência elétrica.

Figura 47: Circuito elétrico equivalente para o espectro de impedância eletroquímica obtido na presença da BLM.

A estabilidade das BLMs foi avaliada monitorando a condutividade entre dois compartimentos separados pela bicamada, em função do tempo. Como pode ser visto na Figura 48, no momento em que foi formada a BLM a condutividade decaiu rapidamente. Este comportamento é consequência da presença da bicamada separando os dois compartimentos. Nota-se que com o passar do tempo a condutividade sofreu pequenas variações, as quais podem ter sido provocadas por um rearranjo dos lipídios componentes da bicamada e pelo movimento do solvente para as bordas do suporte plástico. Após 2h20min, foi realizado o rompimento mecânico da BLM, ocasionando aumento repentino da condutividade. Esse experimento foi repetido e resultados similares foram obtidos, mostrando assim que as membranas são estáveis no intervalo de tempo avaliado e que as medidas condutométricas podem ser utilizadas facilmente no monitoramento da formação da membrana.

Figura 48: Estabilidade das BLMs formadas em suportes contendo orifício de 350 μm . Monitoramento da condutividade em função do tempo.

4.3.3 Monitoramento de espécies através das BLMs.

4.3.3.1 Efeito da presença do condutivímetro nas medidas voltamétricas

Foi avaliada a eventual influência da presença do equipamento de medidas condutométricas utilizado para o monitoramento da presença das BLMs na aquisição dos dados voltamétricos. Para tanto, foram registrados voltamogramas em uma solução de ferricianeto de potássio 10 mmol L^{-1} utilizando um microeletrodo de Pt ($r = 5 \mu\text{m}$) posicionado longe do suporte das BLMs. A Figura 49 apresenta os resultados obtidos em duas condições: na primeira, os voltamogramas foram obtidos na ausência da BLM (Figura 49 – A) com o condutivímetro desligado (curva vermelha) e ligado (curva preta). Na segunda condição (Figura 49 – B), a célula de medida continha a BLM separando os compartimentos aceptor, local onde o microeletrodo foi

posicionado, e o doador, e também foram registrados voltamogramas com o condutivímetro desligado (curva vermelha) e ligado (curva preta).

Figura 49: Influência da presença do condutivímetro nas medidas voltamétricas: Voltamogramas obtidos em solução de ferricianeto de potássio 10 mmol L^{-1} utilizando um microeletrodo de Pt ($r = 5 \mu\text{m}$). $\nu = 50 \text{ mVs}^{-1}$. Ausência (A) e na presença (B) de uma BLM.

Como pode ser visualizado na Figura 49, o equipamento de medidas condutométricas não afeta a resposta do microeletrodo, mas quando esse está ligado na ausência da BLM (Figura 49 – A) o voltamograma foi ruidoso, ao contrário do que ocorre na presença da BLM, onde nenhum ruído nessa escala de corrente foi notado (Figura 49 – B). Esse comportamento está relacionado com as características isolantes das bicamadas lipídicas, de tal forma que a corrente de baixa intensidade aplicada pelo condutivímetro não interfere nas medidas voltamétricas, desde que o instrumento possa operar com baterias.

4.3.3.2 *Curvas de aproximação: Posicionamento do microeletrodo*

O posicionamento do microeletrodo próximo à membrana foi realizado utilizando a SECM com base em curvas de aproximação. As curvas de aproximação, quando utilizado um mediador redox apropriado, trazem informações sobre a distância entre o microeletrodo e a superfície em estudo e ainda algumas informações sobre as características da superfície (BARD; MIRKIN, 2012; WITTSTOCK et al., 2007). Os mediadores avaliados nesse trabalho foram o ferrocianeto de potássio, oxigênio molecular e o ferroceno metanol.

Em uma etapa inicial, utilizando o ferrocianeto de potássio como mediador redox, o microeletrodo foi movimentado em direção à BLM até seu rompimento. Este procedimento foi realizado polarizando um microeletrodo de Pt ($r = 8 \mu\text{m}$) em -100 mV , movendo-o em direção ao suporte onde a bicamada estava formada e monitorando a corrente em função da distância percorrida pelo microeletrodo (Figura 50). Selecionou-se o potencial de -100 mV , pois para esse mediador trata-se de valor no qual a corrente atinge valor limite em processo eletródico governado por difusão radial.

Figura 50: Corrente em função da distância entre um microeletrodo de Pt ($r = 8 \mu\text{m}$ e $RG = 15$) e uma BLM. Experimento realizado com a célula de medidas construída com BLM contendo solução de ferricianeto de potássio 10 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ nos dois compartimentos. Velocidade de aproximação: $2,5 \mu\text{m s}^{-1}$. Potencial do microeletrodo $-100 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl Sat.})}$.

Como pode ser observado na Figura 50, ocorreu uma diminuição na corrente durante a aproximação do microeletrodo à BLM. Este comportamento é associado ao fenômeno denominado difusão com acesso restrito, o qual ocorre quando a superfície em estudo tem características isolantes (KWAK; BARD, 1989). Próximo à distância de $-90 \mu\text{m}$ ocorreu um aumento repentino na corrente e em seguida ela retornou a valores próximos ao inicial (distância 0). Esse aumento ocorreu devido à convecção causada pela ruptura da BLM e como em ambos os compartimentos havia ferricianeto na mesma concentração, a corrente retornou para valores próximos aos iniciais. O resultado apresentado na Figura 50 está em concordância com informações reportadas na literatura sobre a aproximação de um microeletrodo em BLM

(TSIONSKY et al., 1999b). O acompanhamento da presença da BLM e posterior ruptura durante a aproximação do microeletrodo também foi realizado por medidas de condutividade e observou-se o mesmo comportamento obtido anteriormente (Figura 48), em que no início do experimento o valor de condutividade era baixo e aumentou expressivamente após a ruptura da BLM.

Como foi observado na Figura 50, o posicionamento do microeletrodo é uma etapa fundamental para a realização dos experimentos, visto que um erro nessa etapa pode levar ao rompimento da BLM. Com o objetivo de evitar essa situação, antes de todos os experimentos foram obtidas curvas de aproximação para dimensionar a distância entre o microeletrodo e a BLM. Esse procedimento foi realizado comparando curvas experimentais com curvas teóricas e concluiu-se que um valor de corrente seguro seria aquele correspondente a um decréscimo da corrente entre 80-85% em relação ao seu valor inicial. Nesta situação, por exemplo, um microeletrodo de raio igual a 10 μm e com RG igual a 10 deveria ser posicionado a uma distância da superfície em estudo equivalente ao seu raio. A Figura 51 apresenta uma curva de aproximação teórica obtida com os dados utilizados no exemplo anterior e a Figura 52 apresenta as curvas de aproximação na BLM com dados experimentais e teóricos obtidos com ferricianeto de potássio.

Figura 51: Curva de aproximação teórica obtida para um substrato isolante e um microeletrodo com $r = 10 \mu\text{m}$ e $RG = 10$.

Figura 52: Curvas de aproximação experimental (▪) e teórica (-) obtidas para a BLM em ferricianeto de potássio 10 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com microeletrodo de Pt ($r = 10 \mu\text{m}$ e $RG = 10$). Velocidade de aproximação: $2,5 \mu\text{m s}^{-1}$. Potencial do microeletrodo $-100 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl Sat.})}$.

Outro mediador redox avaliado foi o oxigênio molecular. Para tanto, primeiramente foi obtido um voltamograma em uma solução de tampão HEPES 10 mmol L^{-1} contendo NaCl $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ saturada com oxigênio, utilizando um microeletrodo de Pt ($r = 10 \text{ }\mu\text{m}$). Como pode ser observado na Figura 53, em potencial próximo a -650 mV o voltamograma apresenta um pequeno patamar de corrente relacionado com a redução do oxigênio presente na solução.

Figura 53: Voltamogramas obtidos em solução de tampão HEPES 10 mmol L^{-1} contendo NaCl $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ na ausência (a) e saturada com oxigênio (b) utilizando um microeletrodo de Pt ($r = 8 \text{ }\mu\text{m}$). $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

De maneira similar àquela em que se obteve a curva de aproximação com ferricianeto de potássio, um microeletrodo de Pt ($r = 8 \text{ }\mu\text{m}$) foi polarizado em solução tampão HEPES 10 mmol L^{-1} saturada com oxigênio e contendo NaCl $0,15 \text{ mol L}^{-1}$. Nesse experimento, o microeletrodo foi polarizado em -800 mV e movido a uma velocidade constante em direção à BLM. A curva obtida

(Figura 54) é característica do processo de *negative feedback*, pois se observa diminuição da corrente à medida que o microeletrodo se aproxima da superfície. O deslocamento do microeletrodo foi interrompido para não ocorrer a ruptura da bicamada, fato esse que pode ser observado na Figura 54. Esses resultados demonstram a possibilidade de uso do oxigênio como mediador redox no posicionamento do microeletrodo. Apesar das dificuldades de se trabalhar com oxigênio, o fato de não ser necessário adicionar uma sonda eletroativa à solução é vantajosa, pois evitam-se possíveis problemas decorrentes de interação dessa substância com a membrana ou com outras espécies químicas existentes no meio.

Figura 54: Curvas de aproximação experimental (▪) e teórica (-) obtidas para a BLM em solução de tampão HEPES 10 mmol L⁻¹ saturada com oxigênio e contendo NaCl 0,15 mol L⁻¹ com microeletrodo de Pt ($r = 10 \mu\text{m}$ e $RG = 10$). Velocidade de aproximação: $2,5 \mu\text{m s}^{-1}$. Potencial do microeletrodo -800 mV vs. Ag/AgCl_(KCl Sat.).

Com o objetivo de avaliar eventual interação entre os mediadores utilizados e a BLM (Figuras 52 e 54), foram obtidas curvas de aproximação para *wafer* de silício. Esse substrato, além de ser bastante plano, é um isolante, contendo assim características parecidas às das BLMs. A Figura 55 apresenta as curvas obtidas utilizando ferricianeto de potássio e oxigênio. Não há diferenças expressivas entre as curvas obtidas com a BLM e com o *wafer* de silício, mostrando assim que os mediadores não interagem com a bicamada. O desvio da curva teórica na curva obtida com oxigênio pode estar relacionado com a má fixação do microeletrodo no sistema de posicionamento (o microeletrodo não estava exatamente perpendicular ao substrato). Dessa forma, não foi possível uma aproximação mais efetiva, o que difere dos resultados obtidos ao se utilizar o ferricianeto como mediador redox.

A)

Figura 55: Curvas de aproximação obtidas para uma superfície de *wafer* de silício utilizando ferricianeto de potássio 5 mmol L⁻¹ (A) e solução de tampão HEPES 10 mmol L⁻¹ saturada com oxigênio e contendo NaCl 0,15 mol L⁻¹ (B). Dados obtidos com microeletrodo de Pt ($r = 10 \mu\text{m}$ e $RG = 10$). Velocidade de aproximação: $2,5 \mu\text{m s}^{-1}$.

4.3.3.3 Monitoramento da difusão de substâncias através das BLMs

As BLMs utilizadas nesse trabalho foram formadas utilizando lecitina de soja (lipídio). Uma característica da lecitina é que esta é constituída de uma mistura de lipídios, sendo fosfolipídios os componentes principais. Em sua composição também é possível encontrar, mas em uma menor quantidade, glicolipídios, esfingolipídios, lipídios neutros, entre outros (LEHNINGER; NELSON; COX, 2005). Assim como as membranas biológicas, a lecitina também possui como componente majoritário a fosfatidilcolina, a qual possui em sua cabeça polar uma carga positiva e uma negativa, o que confere uma característica neutra para as bicamadas formadas com esse lipídio (SCHOLFIELD, 1981; VOET; VOET, 2006).

Levando em consideração a eletroneutralidade das bicamadas estudadas, em uma primeira etapa foi avaliada a permeação de ferriciateto de potássio através das BLMs. Para tanto, assim como explicado na seção anterior, o microeletrodo foi posicionado próximo à superfície da BLM utilizando oxigênio molecular como mediador redox (Figura 56). Posteriormente, foi aplicado ao microeletrodo um potencial suficiente para promover a oxidação do ferricianeto.

Figura 56: Microeletrodo posicionado próxima à superfície da BLM.

A Figura 57 apresenta a variação de corrente com o tempo na ausência e na presença de ferricianeto no compartimento doador.

Figura 57: Variação de corrente com o tempo obtida em experimento no qual os dois compartimentos da célula de medida continham tampão HEPES 10 mmol L^{-1} + NaCl $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ antes (linha preta) e após a adição de ferricianeto 10 mmol L^{-1} ao compartimento doador da célula de medida (linha vermelha) (A) e após o rompimento mecânico da BLM (B). Microeletrodo mantido no compartimento acceptor a uma separação de $30 \mu\text{m}$ da BLM. Potencial do microeletrodo: $-100 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl Sat.})}$.

Como pode ser visualizado na Figura 57, os resultados dos experimentos realizados na ausência e na presença de ferricianeto no compartimento doador não indicaram variação significativa na corrente medida no microeletrodo durante o intervalo de tempo avaliado (10 minutos). Esse resultado pode estar relacionado com a característica hidrofílica do ferricianeto, o que dificulta sua permeação pela BLM (KOLEY; BARD, 2010; TSIONSKY et al., 1999a). Deste modo, a bicamada atuou como uma barreira, não possibilitando a passagem desta substância para o compartimento onde o microeletrodo estava posicionado. Com intuito de avaliar o funcionamento do microeletrodo, foi provocado o rompimento mecânico da BLM (Figura 57-B). Como pode ser observado, em aproximadamente 500 s, logo após o rompimento da bicamada, ocorreu um aumento significativo da corrente monitorada, pois o ferricianeto que estava presente no compartimento doador difundiu para o compartimento acceptor. Esses resultados comprovam que o microeletrodo estava funcionando durante o experimento e que a ausência de corrente faradaica na Figura 57-A foi provocada pela ausência de ferricianeto no compartimento onde o microeletrodo estava posicionado.

Outra espécie selecionada para os experimentos envolvendo o transporte de substâncias através das BLMs foi o paracetamol. Primeiramente, foi avaliada a resposta eletroquímica desse composto com microeletrodo de Pt. A Figura 58 apresenta voltamograma cíclico obtido em uma solução tampão de HEPES 10 mmol L⁻¹ em NaCl 0,15 mol L⁻¹ (pH = 7,4).

Figura 58: Voltamograma cíclico obtido em solução de paracetamol 1 mmol L^{-1} em tampão de HEPES 10 mmol L^{-1} + NaCl $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,4). Microeletrodo de Pt ($r = 7 \text{ }\mu\text{m}$). $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Como pode ser visualizado na Figura 58, em potenciais mais positivos ocorreu aumento de corrente, a qual está relacionada com a oxidação do paracetamol. Com base nesse resultado, selecionou-se o potencial de 800 mV, correspondente à região de corrente limite para a realização do monitoramento do transporte dessa substância através da BLM (Figura 59).

Figura 59: Variação de corrente com o tempo obtida em experimento no qual os dois compartimentos da célula de medida continham tampão HEPES 10 mmol L^{-1} + NaCl $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ antes (linha preta) e após a adição de paracetamol 1 mmol L^{-1} ao compartimento doador da célula de medida (linha vermelha). Microeletrodo mantido no compartimento receptor a uma separação de $50 \text{ }\mu\text{m}$ da BLM. Potencial do microeletrodo: $800 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl Sat.})}$.

De maneira similar ao experimento envolvendo ferricianeto, não ocorreu alteração significativa na corrente monitorada na presença de paracetamol. Esse comportamento também pode estar relacionado com a baixa permeação desse composto em bicamadas lipídicas (GUTKNECHT, 1992). Com o objetivo de avaliar a possibilidade de acumulação de paracetamol na interface da BLM com a solução receptora, o eletrodo foi polarizado e movimentado até tocar a bicamada (Figura 60).

Figura 60: Corrente em função da distância entre um microeletrodo de Pt ($r = 7 \mu\text{m}$ e $\text{RG} = 8$) e uma BLM. Experimento realizado com a célula de medida construída com BLM contendo solução de paracetamol 1 mmol L^{-1} em tampão HEPES 10 mmol L^{-1} + NaCl $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,4$) no compartimento doador e somente solução tampão no compartimento receptor. Velocidade de aproximação: $1 \mu\text{m s}^{-1}$. Potencial do microeletrodo: $800 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl Sat.})}$.

Como pode ser observado na Figura 60, dois fenômenos relevantes ocorreram durante a aproximação do microeletrodo em direção à superfície da BLM. Um deles tem relação com a diminuição da corrente monitorada (em destaque, em $160 \mu\text{m}$) e o outro com o aumento da corrente ($310 \mu\text{m}$). Uma possível explicação para o primeiro fenômeno consiste no contato do microeletrodo com a BLM (fase orgânica), resultando em decréscimo da corrente em $160 \mu\text{m}$. Nota-se que entre 160 e $310 \mu\text{m}$ a corrente manteve-se constante, indicando que possivelmente a BLM foi movimentada juntamente com o microeletrodo, e que somente em $310 \mu\text{m}$ este atravessou a bicamada. Nesse momento, ocorreu expressivo aumento da corrente devido à

oxidação anódica do paracetamol do compartimento doador no microeletrodo. É importante destacar que ao longo desse procedimento a presença da BLM foi monitorada medindo-se a resistência com um condutivímetro e os dados obtidos confirmaram a integridade da bicamada durante todo o experimento. Além disso, foi realizado outro experimento onde o microeletrodo inicialmente estava posicionado no compartimento contendo paracetamol e foi movimentado em direção ao compartimento aceitor, atravessando a membrana. Neste caso, observou-se comportamento similar ao mostrado na Figura 60. A permeação de outras espécies (H^+ , hidroquinona e azul de metileno) também foi avaliada, mas os resultados foram prejudicados pela baixa estabilidade de resposta e envenenamento dos microeletrodos durante a realização das medidas.

5. CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos ao longo desse trabalho, as seguintes conclusões podem ser apresentadas:

- A metodologia utilizada para a construção de microeletrodos para aplicação em SECM foi satisfatória. Os resultados obtidos mostraram a importância das três etapas de caracterização (visual, voltamétrica e com a SECM). Também foi possível demonstrar que é possível realizar o afinamento das microfibras utilizando a puxadora de pipetas de filamento.
- O uso da microscopia eletroquímica no modo substrato-gerador/microeletrodo-coletor se mostrou uma ferramenta atrativa para o estudo de sistemas micelares. A metodologia desenvolvida para a determinação de coeficientes de difusão de micelas se mostrou satisfatória e possibilitou a obtenção do número de agregação, volume da micela e coeficiente de difusão na cmc para o surfactante $C_{14}TABr$. No entanto, não foi possível aplicar as expressões matemáticas utilizadas para o surfactante $C_{14}TABr$ de modo satisfatório para os surfactantes $C_xMelmCl$ ($x=10,12,14$ e 16).
- Os resultados apresentados nos experimentos envolvendo as BLMs indicaram que elas possuem grande estabilidade, viabilizando estudos de transporte de espécies químicas por esse tipo de membrana utilizando a SECM. As curvas de aproximação permitem o posicionamento do microeletrodo com grande precisão e trazem informações sobre a interação entre o mediador eletroquímico utilizado e as bicamadas. No entanto, alguns experimentos ainda devem ser realizados para um maior entendimento dos sistemas estudados.

6. ESTUDOS FUTUROS

6.1 Construção de nanoeletrodos

A resolução da SECM é limitada pela dimensão da ponta de prova (microeletrodo). Em função disso, é interessante usar estratégias para obter microeletrodos cada vez menores e chegar a dimensões na escala nanométrica. Para obter aumento na resolução dos experimentos envolvendo a SECM, nosso laboratório recentemente adquiriu um novo equipamento para a construção de microeletrodos. O modelo do puxador de pipeta adquirido foi um P-2000 da Sutter Instrument Co.[®]. Esse equipamento utiliza um laser de CO₂ o que possibilita o aquecimento de capilares com grande precisão. Em função dessa característica, pretende-se utilizar esse instrumento para realizar o afinamento das microfibras de Pt inseridas em capilares de quartzo e assim obter nanoeletrodos (DANIS et al., 2014a; KATEMANN; SCHUHMANN, 2002; ZOSKI, 2002a).

6.2 Estudo de transporte de materiais através de bicamadas lipídicas

O azul de metileno e seus derivados, além de serem transportados através de membranas de maneira não mediada, são substâncias de grande interesse para a aplicação em terapia fotodinâmica (BACELLAR et al., 2014). Metins *et al.* propuseram a formação de poros em vesículas gigantes (membranas sintética) quando essas foram colocadas em solução contendo azul de metileno e irradiadas com radiação de determinado comprimento de onda (MERTINS et al., 2014). Indícios da formação desses poros incluem observações visuais, pois há diferença de coloração antes e após a irradiação. Uma alternativa para realizar esse tipo de estudo consiste na

utilização da microscopia eletroquímica de varredura (SECM). Além disso, pretende-se utilizar outros tipos de lipídios e também colesterol na formação das BLMs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMEMIYA, S. et al. Studies of charge transfer at liquid . **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 483, n. 1, p. 7–17, 2000.
- AMEMIYA, S. et al. Generalized theory for nanoscale voltammetric measurements of heterogeneous electron-transfer kinetics at macroscopic substrates by scanning electrochemical microscopy. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 15, p. 5928–35, 2011.
- AMEMIYA, S.; BARD, A. J. Scanning electrochemical microscopy. 40. Voltammetric ion-selective micropipet electrodes for probing ion transfer at bilayer lipid membranes. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 20, p. 4940–4948, 2000.
- AMEMIYA, S.; WANG, Y.; MIRKIN, M. V. **Electrochemistry**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2013. v. 12
- AMPHLETT, J. L.; DENUAULT, G. Scanning Electrochemical Microscopy (SECM): An investigation of the effects of tip geometry on amperometric tip response. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 49, p. 9946–9951, 1998.
- BACELLAR, I. O. L. et al. Membrane damage efficiency of phenothiazinium photosensitizers. **Photochemistry and Photobiology**, v. 90, n. 4, p. 801–813, 2014.
- BALTES, N. et al. Imaging concentration profiles of redox-active species with nanometric amperometric probes: effect of natural convection on transport at microdisk electrodes. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 43, n. 11, p. 1431–5, 2004.
- BARD, A. J. et al. Scanning Electrochemical Microscopy. Introduction and Principles. **Analytical Chemistry**, v. 61, n. 24, p. 132–138, 1989.
- BARD, A. J. et al. Scanning electrochemical microscopy: A new technique for the characterization and modification of surfaces. **Accounts of Chemical Research**, v. 23, n. 11, p. 357–363, 1990.
- BARD, A. J. et al. The electrode/electrolyte interface - A status report. **Journal of Physical Chemistry**, v. 97, n. 28, p. 7147-7173, 1993.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. [s.l.] Wiley, 2000.
- BARD, A. J.; LI, X.; ZHAN, W. Chemically imaging living cells by scanning electrochemical microscopy. **Biosensors & bioelectronics**, v. 22, n. 4, p. 461–72, 2006.
- BARD, A. J.; MIRKIN, M. V. **Scanning Electrochemical Microscopy, Second Edition**. [s.l.] Taylor & Francis, 2012.
- BARTSCH, P. et al. Horizontal bilayer for electrical and optical recordings. **Materials**, v. 5, n. 12, p. 2705–2730, 2012.
- BERGNER, S.; VATSYAYAN, P.; MATYSIK, F.-M. Recent advances in high resolution scanning electrochemical microscopy of living cells--a review. **Analytica chimica acta**, v. 775, p. 1–13, 2013.

BLANAZS, A.; ARMES, S. P.; RYAN, A. J. Self-Assembled Block Copolymer Aggregates: From Micelles to Vesicles and their Biological Applications. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 30, n. 4-5, p. 267–77, 2009.

BOND, A. M. et al. Assessment of conditions under which the oxidation of ferrocene can be used as a standard voltammetric reference process in aqueous media. **Analytical Chemistry**, v. 50, n. 24, p. 2853–2860, 1987.

BOTTOMLEY, L. A. et al. Scanning Probe Microscopy. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 12, p. 185–230, 1998.

BŘEZINA, M. et al. Adsorption and kinetics of oxidation of ascorbic acid at platinum electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 13–17, 1972.

CANNAN, S. et al. Scanning electrochemical microscopy (SECM) studies of catalytic EC' processes: theory and experiment for feedback, generation/collection and imaging measurements. **Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP**, v. 13, n. 12, p. 5403–12, 2011.

CANNES, C.; KANOUEFI, F.; BARD, A. J. Cyclic voltammetry and scanning electrochemical microscopy of ferrocenemethanol at monolayer and bilayer-modified gold electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 547, n. 1, p. 83–91, 2003.

CHARLTON, I. D.; DOHERTY, A. P. Voltammetric Measurement of Intermicellar Interaction Parameters; Correlation with Predicted Interaction Energies. **Langmuir**, v. 15, n. 16, p. 5251–5256, 1999.

CHARLTON, I. D.; DOHERTY, A. P. Electrolyte-induced structural evolution of triton X-100 micelles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 34, p. 8327–8332, 2000.

CIOBANU, M. et al. 1 - Fundamentals. In: ZOSKI, C. G. (Ed.). **Handbook of Electrochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 3 – II.

CORNUT, R. et al. Accurate and simplified consideration of the probe geometrical defaults in scanning electrochemical microscopy: theoretical and experimental investigations. **Analytical chemistry**, v. 83, n. 24, p. 9669–75, 2011.

CORNUT, R.; LEFROU, C. New analytical approximations for negative feedback currents with a microdisk SECM tip. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 604, n. 2, p. 91–100, jun. 2007.

CSÓKA, B.; NAGY, G. Determination of diffusion coefficient in gel and in aqueous solutions using scanning electrochemical microscopy. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 61, n. 1-2, p. 57–67, 2004.

CUI, X. et al. Mechanism of surfactant micelle formation. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 24, n. 19, p. 10771–5, 2008.

DANIELE, S.; DENUAULT, G. **Developments in Electrochemistry**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014. v. 9781118694

DANIS, L. et al. Development of Nano-Disc electrodes for Application as Shear Force Sensitive Electrochemical Probes. **Electrochimica Acta**, v. 136, p. 121–129, 2014.

DANIS, L. et al. Fabrication of carbon, gold, platinum, silver, and mercury ultramicroelectrodes with controlled geometry. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 5, p. 2565–9, 2015.

- DICKINSON, E. Dispersions of interacting colloidal particles. **Annual Reports Section "C" (Physical Chemistry)**, v. 80, p. 3–37, 1983.
- DING, Z.; QUINN, B. M.; BARD, A. J. Kinetics of Heterogeneous Electron Transfer at Liquid/Liquid Interfaces As Studied by SECM. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 27, p. 6367–6374, 2001.
- EDWARDS, M. A. et al. Scanning electrochemical microscopy: principles and applications to biophysical systems. **Physiological measurement**, v. 27, n. 12, p. R63–108, 2006.
- ENGSTROM, R. C. et al. Measurements within the diffusion layer using a microelectrode probe. **Analytical Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 844–848, 1986.
- ENGSTROM, R. C. et al. Spatiotemporal description of the diffusion layer with a microelectrode probe. **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 15, p. 2005–2010, 1987.
- ETIENNE, M.; MOULIN, J.-P.; GOURHAND, S. Accurate control of the electrode shape for high resolution shearforce regulated SECM. **Electrochimica Acta**, v. 110, p. 16–21, 2013.
- EVERETT, D. H. Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units, Appendix II: Definitions, Terminology and Symbols in Colloid and Surface Chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 577–638, 1972.
- FERNÁNDEZ, J. L.; BARD, A. J. Scanning electrochemical microscopy 50. Kinetic study of electrode reactions by the tip generation-substrate collection mode. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 8, p. 2281–9, 2004.
- FERREIRA, T. L. et al. Use of microdevices to determine the diffusion coefficient of electrochemically generated species: application to binary solvent mixtures and micellar solutions. **The journal of Physical Chemistry. B**, v. 111, n. 43, p. 12478–84, 1 nov. 2007.
- FERREIRA, T. L. et al. Application of microelectrode voltammetry to study the properties of surfactant solutions: alkyltrimethylammonium bromides. **The Journal of Physical Chemistry. B**, v. 114, n. 2, p. 857–62, 2010.
- FORSTER, R. J.; KEYES, T. E. 6.1 - Behavior of ultramicroelectrodes. In: ZOSKI, C. G. (Ed.). . **Handbook of Electrochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 155–171.
- GALGANO, P. D.; EL SEOUD, O. A. Micellar properties of surface active ionic liquids: a comparison of 1-hexadecyl-3-methylimidazolium chloride with structurally related cationic surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 345, n. 1, p. 1–11, 2010.
- GALGANO, P. D.; EL SEOUD, O. A. Surface active ionic liquids: study of the micellar properties of 1-(1-alkyl)-3-methylimidazolium chlorides and comparison with structurally related surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 361, n. 1, p. 186–94, 2011.
- GAMBOA, J. C. M. et al. Activated Copper Cathodes as Sensors for Nitrite Analysis. **Electroanalysis**, v. 22, n. 22, p. 2627–2632, 31 nov. 2010.
- GEORGES, J.; DESMETTRE, S. Electrochemistry of ferrocene in anionic, cationic and nonionic micellar solutions. Effet of the micelle solubilization of the half-wave potentials. **Electrochimica Acta**, v. 29, n. 4, p. 521–525, 1984.
- GIMEL, J. C.; BROWN, W. A light scattering investigation of the sodium dodecyl sulfate-lysozyme system. **Journal of Chemical Physics**, v. 104, n. 20, p. 8112–8117, 1996.

- GREWER, C. et al. Electrophysiological characterization of membrane transport proteins, **Annual Review of Biophysics**, v. 42, n. 1, p. 95-129, 2013.
- GUTKNECHT, J. Aspirin, acetaminophen and proton transport through phospholipid bilayers and mitochondrial membranes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 1-2, p. 3-8, 1992.
- HANSSON, P. et al. Determination of micellar aggregation numbers in dilute surfactant systems with the fluorescence quenching method. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 15, p. 3496-3506, 2000.
- HIEMENZ, P. C.; RAJAGOPALAN, R. **Principles of Colloid and Surface Chemistry, Third Edition, Revised and Expanded**. [s.l.] Taylor & Francis, 1997.
- HONIGMANN, A. et al. Characterization of horizontal lipid bilayers as a model system to study lipid phase separation. **Biophysical Journal**, v. 98, n. 12, p. 2886-2894, 2010.
- HORROCKS, B. R. et al. Scanning electrochemical microscopy. 19. Ion-selective potentiometric microscopy. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 9, p. 1213-1224, 1993.
- JOHNSON, L.; WALSH, D. A. Tip generation-substrate collection-tip collection mode scanning electrochemical microscopy of oxygen reduction electrocatalysts. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 682, p. 45-52, 2012.
- KATEMANN, B. B.; SCHUHMANN, W. Fabrication and characterization of needle-type Pt-disk nanoelectrodes. **Electroanalysis**, v. 14, n. 1, p. 22-28, 2002.
- KIM, J. et al. Stabilizing nanometer scale tip-to-substrate gaps in scanning electrochemical microscopy using an isothermal chamber for thermal drift suppression. **Analytical chemistry**, v. 84, n. 8, p. 3489-92, 17 abr. 2012.
- KIM, J. et al. Nanoscale mechanism of molecular transport through the nuclear pore complex as studied by scanning electrochemical microscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, p. 2321-2329, 2013.
- KISS, A.; NAGY, G. Deconvolution of potentiometric SECM images recorded with high scan rate. **Electrochimica Acta**, v. 163, p. 303-309, 2015.
- KOLEY, D.; BARD, A. J. Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 39, p. 16783-7, 2010.
- KRANZ, C. Recent advancements in nanoelectrodes and nanopipettes used in combined scanning electrochemical microscopy techniques. **The Analyst**, v. 139, n. 2, p. 336-52, 2014.
- KUNZ, W. Specific ion effects in colloidal and biological systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, n. 1-2, p. 34-39, 2010.
- KWAK, J.; BARD, A. J. Scanning electrochemical microscopy. Theory of the feedback mode. **Analytical Chemistry**, v. 61, n. 11, p. 1221-1227, 1989.
- LEFROU, C. A unified new analytical approximation for positive feedback currents with a microdisk SECM tip. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 592, n. 1, p. 103-112, 2006.
- LEFROU, C.; CORNUT, R. Analytical expressions for quantitative scanning electrochemical microscopy (SECM). **Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry**, v. 11, n. 3, p. 547-56, 2010.

- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. [s.l.] W. H. Freeman, 2005.
- LEONHARDT, K. et al. Scanning electrochemical microscopy: Diffusion controlled approach curves for conical AFM-SECM tips. **Electrochemistry Communications**, v. 27, p. 29–33, 2013.
- LEVINE, I. N. **Physical Chemistry**. [s.l.] McGraw-Hill, 2008.
- LIANOS, P.; ZANA, R. Fluorescence probe studies of the effect of concentration on the state of aggregation of surfactants in aqueous solution. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 84, n. 1, p. 100–107, 1981.
- LIMA, A. S. et al. An Electrochemical Sensor Based on Nanostructured Hollandite-type Manganese Oxide for Detection of Potassium Ions, **Sensors**, v. 9, n. 9, p. 6613–6625, 2009.
- LIMA, A. S.; MELONI, G. N.; BERTOTTI, M. Determination of Paracetamol in Presence of Ascorbic Acid in Pharmaceutical Products by Scanning Electrochemical Microscopy. **Electroanalysis**, v. 25, n. 6, p. 1395–1399, 2013.
- LOVELOCK, K. R. J. et al. Effect of viscosity on steady-state voltammetry and scanning electrochemical microscopy in room temperature ionic liquids. **The Journal of Physical Chemistry. B**, v. 114, n. 13, p. 4442–50, 2010.
- LOVELOCK, K. R. J. et al. On the diffusion of ferrocenemethanol in room-temperature ionic liquids: an electrochemical study. **Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP**, v. 13, n. 21, p. 10155–64, 2011.
- LUO, H. et al. Sensing application in the precursor region of localized corrosion by scanning electrochemical microscopy. **RSC Adv.**, v. 4, n. 100, p. 56582–56595, 2014.
- MANDAL, A. B.; NAIR, B. U. Cyclic voltammetric technique for the determination of the critical micelle concentration of surfactants, self-diffusion coefficient of micelles, and partition coefficient of an electrochemical probe. **Journal of Physical Chemistry**, v. 95, n. 22, p. 9008–9013, 1991.
- MARTIN, R. D.; UNWIN, P. R. Scanning electrochemical microscopy: Theory and experiment for the positive feedback mode with unequal diffusion coefficients of the redox mediator couple. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 439, n. 1, p. 123–136, 1997.
- MARTIN, R. D.; UNWIN, P. R. Theory and Experiment for the Substrate Generation/Tip Collection Mode of the Scanning Electrochemical Microscope: Application as an Approach for Measuring the Diffusion Coefficient Ratio of a Redox Couple. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 2, p. 276–284, 1998.
- MATHAI, J. C. et al. No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 39, p. 16633–16638, 2009.
- MAUZEROLL, J.; LESUER, R. J. 6.3.3 - Laser-pulled ultramicroelectrodes. In: ZOSKI, C. G. (Ed.). **Handbook of Electrochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 199–211.
- MAYER, M. et al. Microfabricated Teflon membranes for low-noise recordings of ion channels in planar lipid bilayers. **Biophysical Journal**, v. 85, n. 4, p. 2684–2695, 2003.
- MELLISH, K. J. et al. In vitro photodynamic activity of a series of methylene blue analogues. **Photochemistry and Photobiology**, v. 75, n. 4, p. 392–397, 2002.

- MERTINS, O. et al. Physical damage on giant vesicles membrane as a result of methylene blue photoirradiation. **Biophysical Journal**, v. 106, n. 1, p. 162–71, 2014.
- MINGUZZI, A. et al. Rapid Characterization of Oxygen Evolving Electrocatalyst Spot Arrays by the Substrate Generation/Tip Collection Mode of Scanning Electrochemical Microscopy with Decreased O₂ Diffusion Layer Overlap. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 6, p. 150119195159009, 2015.
- MIRKIN, M. V.; ARCA, M.; BARD, A. J. Scanning electrochemical microscopy. 22. Examination of thin solid films of AgBr: Ion diffusion in the film and heterogeneous kinetics at the film/solution interface. **Journal of Physical Chemistry**, v. 97, n. 41, p. 10790–10795, 1993.
- MIRKIN, M. V.; FAN, F.-R. F.; BARD, A. J. Scanning electrochemical microscopy part 13. Evaluation of the tip shapes of nanometer size microelectrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 328, n. 1-2, p. 47–62, 1992.
- MISSNER, A.; POHL, P. 110 years of the Meyer-Overton rule: Predicting membrane permeability of gases and other small compounds. **ChemPhysChem**, v. 10, n. 9-10, p. 1405–1414, 2009.
- MOORE, W. J. **PHYSICAL CHEMISTRY**. Universities Press, 1999.
- MOSBACH, M. et al. Determination of Diffusion Coefficients of Electroactive Species in Time-of-Flight Experiments Using a Microdispenser and Microelectrodes. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 11, p. 2468–2475, 2001.
- MUELLER, P. et al. Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution [1]. **Journal of Physical Chemistry**, v. 67, n. 2, p. 534–535, 1963.
- NAGY, L.; GYETVAI, G.; NAGY, G. Determination of the Diffusion Coefficient of Monosaccharides with Scanning Electrochemical Microscopy (SECM). **Electroanalysis**, v. 21, n. 3-5, p. 542–549, 2009.
- NEBEL, M. et al. Visualization of oxygen consumption of single living cells by scanning electrochemical microscopy: The influence of the faradaic tip reaction. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 52, p. 6335–6338, 2013.
- NESMĚRÁK, K.; NĚMCOVÁ, I. Determination of Critical Micelle Concentration by Electrochemical Means. **Analytical Letters**, v. 39, n. 6, p. 1023–1040, 2006.
- NIORADZE, N. et al. Origins of nanoscale damage to glass-sealed platinum electrodes with submicrometer and nanometer size. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 6198–6202, 2013.
- NIORADZE, N.; KIM, J.; AMEMIYA, S. Quasi-steady-state voltammetry of rapid electron transfer reactions at the macroscopic substrate of the scanning electrochemical microscope. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 3, p. 828–35, 2011.
- PAIXÃO, T. R. L. C. et al. Fabrication of a new generator–collector electrochemical micro-device: Characterization and applications. **Electrochemistry Communications**, v. 8, n. 1, p. 9–14, 2006.
- PAIXÃO, T. R. L. C.; BERTOTTI, M. Métodos para fabricação de microeletrodos visando a detecção em microambientes. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1306–1314, 2009.
- PEDROTTI, J. J.; ANGNES, L.; GUTZ, I. G. R. Miniaturized Reference Electrodes with Microporous Polymer Junctions. **Electroanalysis**, v. 8, n. 7, p. 673–675, 1996.

- PUST, S. E.; MAIER, W.; WITTSTOCK, G. Investigation of Localized Catalytic and Electrocatalytic Processes and Corrosion Reactions with Scanning Electrochemical Microscopy (SECM). **Zeitschrift für Physikalische Chemie**, v. 222, n. 10, p. 1463–1517, 2008.
- RAJAPAKSHA, S. P.; WANG, X.; LU, H. P. Suspended lipid bilayer for optical and electrical measurements of single ion channel proteins. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 19, p. 8951–8955, 2013.
- REIS, R. M. et al. Electrochimica Acta The use of copper and cobalt phthalocyanines as electrocatalysts for the oxygen reduction reaction in acid medium. **Electrochimica Acta**, v. 139, p. 1–6, 2014.
- RITZERT, N. L. et al. Kinetics of interfacial electron transfer at single-layer graphene electrodes in aqueous and nonaqueous solutions. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 29, n. 5, p. 1683–94, 2013.
- SAIER, M. H. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 64, n. 2, p. 354–411, 2000.
- SALLES, M. O. et al. Ex Situ Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) Investigation of Bismuth- and Bismuth/Lead Alloy Film-Modified Gold Electrodes in Alkaline Medium. **Electroanalysis**, v. 23, n. 3, p. n/a–n/a, 2010.
- SCHOLFIELD, C. R. Composition of soybean lecithin. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 58, n. 10, p. 889–892, 1981.
- SERRAPEDE, M. et al. Scanning electrochemical microscopy: using the potentiometric mode of SECM to study the mixed potential arising from two independent redox processes. **Analytical chemistry**, v. 85, n. 17, p. 8341–6, 2013.
- SHEN, M. et al. Quantitative imaging of ion transport through single nanopores by high-resolution scanning electrochemical microscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, p. 9856–9859, 2012.
- SIMONS, K.; IKONEN, E. Functional rafts in cell membranes. **Nature**, v. 387, n. 6633, p. 569–572, 1997.
- SIMONS, K.; TOOMRE, D. Lipid rafts and signal transduction. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 1, n. 1, p. 31–39, 2000.
- SIMONS, K.; VAZ, W. L. C. Model systems, lipid rafts, and cell membranes, **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 33, p. 269–295, 2004.
- SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 720–731, 1972.
- SRIVASTAVA, A.; EISENTHAL, K. B. Kinetics of molecular transport across a liposome bilayer. **Chemical Physics Letters**, v. 292, n. 3, p. 345–351, 1998.
- SUN, P.; MIRKIN, M. V. Scanning electrochemical microscopy with slightly recessed nanotips. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 15, p. 5809–5816, 2007.
- SZUNERITS, S.; THOUIN, L. 10 - Microelectrode Arrays. In: ZOSKI, C. G. (Ed.). **Handbook of Electrochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 391 – XI.

- THAKAR, R. et al. Multifunctional carbon nanoelectrodes fabricated by focused ion beam milling. **The Analyst**, v. 138, n. 20, p. 5973–82, 2013.
- THOMAS, S. et al. Possibilities and Limitations of Scanning Electrochemical Microscopy of Mg and Mg Alloys. **Corrosion**, v. 71, n. 2, p. 171–183, 2015.
- TIEN, H. T.; OTTOVA, A. L. The lipid bilayer concept and its experimental realization: From soap bubbles, kitchen sink, to bilayer lipid membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 189, n. 1, p. 83–117, 2001.
- TSIONSKY, M. et al. Scanning electrochemical microscopy. 38. Application of SECM to the study of charge transfer through bilayer lipid membranes. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 19, p. 4300–4305, 1999a.
- UNWIN, P. R. Determination of the diffusion coefficient of hydrogen in aqueous solution using single and double potential step chronoamperometry at a disk ultramicroelectrode. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 12, p. 2063–2069, 1997.
- VALIM, R. B. et al. Electrogeneration of hydrogen peroxide in gas diffusion electrodes modified with tert-butyl-anthraquinone on carbon black support. **Carbon**, v. 61, p. 236–244, 2013.
- VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 2, p. 112–124, 2008.
- VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica - 3.ed.:** . [s.l.] Artmed Editora, 2006.
- VOLKERT, C. A.; MINOR, A. M. Focused Ion Beam Microscopy and Micromachining. **MRS Bulletin**, v. 32, n. 05, p. 389–399, 2007.
- WANG, Y. et al. Electron transfer/ion transfer mode of scanning electrochemical microscopy (SECM): a new tool for imaging and kinetic studies. **Chemical Science**, v. 4, n. 9, p. 3606, 2013.
- WANG, Y.; LIMON-PETERSEN, J. G.; COMPTON, R. G. Measurement of the diffusion coefficients of $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ and $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ in aqueous solution using microelectrode double potential step chronoamperometry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 652, n. 1-2, p. 13–17, 2011.
- WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 58, n. 1, p. 1–12, 1990.
- WENG, Y.-C.; HSIEH, C.-T. Scanning electrochemical microscopy characterization of bimetallic Pt–M (M=Pd, Ru, Ir) catalysts for hydrogen oxidation. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 5, p. 1932–1940, 2011.
- WERNER, H. At least 60 years of ferrocene: the discovery and rediscovery of the sandwich complexes. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 51, n. 25, p. 6052–8, 18 2012.
- WHITE, S. H. Analysis of the torus surrounding planar lipid bilayer membranes. **Biophysical Journal**, v. 12, n. 4, p. 432–445, 1972.
- WILBURN, J. P.; WRIGHT, D. W.; CLIFFEL, D. E. Imaging of voltage-gated alamethicin pores in a reconstituted bilayer lipid membrane via scanning electrochemical microscopy. **Analyst**, v. 131, n. 2, p. 311–316, 2006.
- WINTERHALTER, M. Black lipid membranes. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 5, n. 3-4, p. 250–255, 2000.

WIPF, D. O.; BARD, A. J. Scanning electrochemical microscopy. VIII. Effect of heterogeneous electron-transfer rate at the substrate on the tip feedback current. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 138, n. 2, p. 469–474, 1991.

WITTSTOCK, G. et al. Scanning electrochemical microscopy for direct imaging of reaction rates. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 46, p. 1584–1617, 2007.

ZHAN, D. et al. Characterization of Ag^+ toxicity on living fibroblast cells by the ferrocenemethanol and oxygen response with the scanning electrochemical microscope. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 688, p. 61–68, jan. 2013.

ZHOU, F.; UNWIN, P. R.; BARD, A. J. Scanning electrochemical microscopy. 16. Study of second-order homogeneous chemical reactions via the feedback and generation/collection modes. **Journal of Physical Chemistry**, v. 96, n. 12, p. 4917–4924, 1992.

ZOCHER, F. et al. Local partition coefficients govern solute permeability of cholesterol-containing membranes. **Biophysical Journal**, v. 105, n. 12, p. 2760–2770, 2013.

ZOSKI, C. G. Ultramicroelectrodes: Design, fabrication, and characterization. **Electroanalysis**, v. 14, n. 15-16, p. 1041–1051, 2002.

Apêndice 1: *Aplicação Analítica da SECM: Determinação de paracetamol na presença de ácido ascórbico*

Métodos eletroanalíticos para a quantificação de paracetamol (PC) podem ser desenvolvidos a partir da oxidação eletroquímica desse analito sobre diversos materiais eletródicos, tais como: platina, carbono vítreo, diamante dopado com boro, entre outros. Entretanto, a análise de PC na presença de ácido ascórbico (AA) fica dificultada, pois os potenciais de oxidação de ambas as espécies são muito próximos. Uma alternativa para a determinação de PC na presença de AA envolve a utilização de célula eletroquímica de camada delgada dotada de dois eletrodos de trabalho (PAIXÃO et al., 2006), onde o AA pode ser totalmente oxidado em um dos eletrodos, removendo a espécie interferente, enquanto o sinal de corrente para o PC pode ser registrado no segundo eletrodo. A mesma abordagem pode ser usada com a microscopia eletroquímica no modo substrato – gerador / microeletrodo – coletor.

Neste contexto foram realizados experimentos nos quais ao eletrodo gerador (substrato) foi aplicado um potencial suficiente para oxidar o ácido ascórbico (interferente) e ao eletrodo coletor (microeletrodo) foi aplicado um potencial para oxidar o paracetamol (analito). A Figura 61 apresenta a dependência da corrente monitorada com o potencial aplicado ao substrato. As medidas foram realizadas com um microeletrodo de platina ($r = 10\ \mu\text{m}$) posicionado a $20\ \mu\text{m}$ da superfície de um substrato de platina.

A)

B)

Figura 61: Dependência de corrente monitorada no microeletrodo com o potencial aplicado ao substrato. Medidas realizadas em solução contendo ácido ascórbico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (A) e paracetamol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (B) em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Potencial aplicado ao microeletrodo $800 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat})}$. Separação entre microeletrodo/substrato de $20 \text{ }\mu\text{m}$.

Como pode ser visualizado na Figura 61, a alteração do potencial do substrato ocasiona mudanças significativas na corrente monitorada pelo microeletrodo quando a solução contém ácido ascórbico (Figura 57 – A). Esse comportamento está relacionado com a chegada da espécie eletroativa à superfície do microeletrodo, a qual é diminuída, pois parte está sofrendo uma transformação eletroquímica no substrato. Nota-se que no potencial de 0,5 V a corrente monitorada pelo microeletrodo é praticamente zero, o que indica que nenhuma espécie está difundindo até sua superfície. No entanto, quando a solução contém somente paracetamol é possível observar corrente significativa ao se aplicar 0,6 V ao substrato. Somente em potenciais aplicados ao substrato mais positivos do que 0,6 V o paracetamol começa a ser consumido, com consequente diminuição da quantidade que atinge o microeletrodo. Em função desse comportamento, o potencial de 0,5 V foi selecionado para realizar a “remoção” do AA presente entre o microeletrodo e o substrato.

A Figura 62 apresenta voltamogramas cíclicos obtidos com um microeletrodo posicionado a 20 μm de distância do substrato. As medidas foram realizadas em duas condições: uma com o substrato em circuito aberto e a outra aplicando-se 0,5 V.

Figura 62: Voltamogramas obtidos com um microeletrodo de platina ($r = 12,5 \mu\text{m}$) em uma solução contendo PC 10 mmol L^{-1} (A) e AA 10 mmol L^{-1} (B) em tampão acetato 0.1 mol L^{-1} . Substrato não polarizado (a) e polarizado em $0,5 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl})}$ (b). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Separação entre microeletrodo/substrato de $20 \mu\text{m}$.

Nota-se que quando os experimentos foram realizados sem aplicar potencial ao substrato (circuito aberto), foi possível visualizar o sinal de oxidação relacionado com as espécies eletroativas presentes na solução. No entanto, quando foi aplicado 0,5 V ao substrato ocorreu uma pequena alteração na corrente relacionada com a oxidação do PC (Figura 62 – A), indicando que, provavelmente, uma pequena parcela foi consumida pelo substrato. Quando a solução continha apenas AA, nenhum processo relacionado com a oxidação dessa espécie no microeletrodo foi observado ao se polarizar o substrato (Figura 62 – B), ou seja, o AA existente entre o microeletrodo e o substrato foi totalmente consumido.

A Figura 63 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos em uma solução contendo mistura de AA e PC. Dois processos eletródicos são observados quando o substrato não está polarizado, sendo um deles em aproximadamente 0,2 V, referente à oxidação do AA, e o outro em 0,8 V, relacionado com a oxidação do PC. Em contrapartida, quando foi aplicado 0,5 V ao substrato o voltamograma apresentou apenas um processo, o qual está relacionado com a oxidação do PC. O processo referente à oxidação do AA desapareceu, pois, de maneira similar ao experimento anterior, o AA foi totalmente consumido no substrato.

Figura 63: Voltamogramas obtidos com um microeletrodo de platina ($r = 12,5 \mu\text{m}$) em uma solução contendo PC 10 mmol L^{-1} + AA 10 mmol L^{-1} em tampão acetato 0.1 mol L^{-1} . Substrato não polarizado (a) e polarizado (b) em $0,5 \text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl})}$. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Separação entre microeletrodo/substrato de $20 \mu\text{m}$.

A alteração da separação entre microeletrodo e substrato influencia o tempo requerido para oxidar todo AA, pois quanto maior a distância entre os eletrodos maior será a quantidade dessa substância no volume contido entre os eletrodos (LIMA; MELONI; BERTOTTI, 2013). Para que essa condição seja válida, o microeletrodo deve necessariamente estar posicionado dentro da camada de difusão formada na interface do substrato. Com o intuito de avaliar o efeito da separação entre microeletrodo e substrato, foi realizada a detecção do AA com o microeletrodo posicionado em diferentes distâncias do substrato (Figura 64).

Figura 64: Efeito da separação entre microeletrodo e substrato no monitoramento do AA. Medidas realizadas em circuito aberto (■) e aplicando 0,5 V (●) ao substrato. Tempo de eletrólise = 40 s. Potencial aplicado ao microeletrodo 800 mV vs. Ag/AgCl_(KCl sat).

Os experimentos foram realizados em duas condições, sendo uma em circuito aberto e a outra aplicando-se 0,5 V ao substrato. Em circuito aberto, a diminuição da separação entre microeletrodo e substrato causou diminuição da corrente no microeletrodo. Esse fenômeno é similar ao observado na difusão com acesso restrito, em que a difusão da espécie eletroativa para a superfície do microeletrodo fica dificultada com a diminuição da separação entre microeletrodo e substrato (BARD; MIRKIN, 2012). Quando os experimentos foram realizados polarizando o substrato, o perfil obtido foi diferente. Nesta condição, a corrente monitorada foi sempre menor do que no caso anterior devido ao consumo de AA no substrato. A alteração da distância entre os eletrodos não teve influência considerável, sugerindo que o AA foi quase que completamente consumido pelo substrato nessa região.

Assim como nos experimentos envolvendo a determinação do coeficiente de difusão, a perturbação provocada pelo substrato gerador demanda um tempo para que possa ser notada no microeletrodo coletor. Nesse experimento realizado com AA e PC também ocorre o mesmo fenômeno, ou seja, após a aplicação do potencial ao substrato o início da supressão do sinal referente à oxidação do AA no microeletrodo não ocorre simultaneamente. Com base na informação sobre o tempo requerido para se observar a queda na corrente no microeletrodo após o início do consumo do AA no substrato, o coeficiente de difusão do AA pode ser determinado com base na Equação 17. A Figura 65 apresenta a dependência do tempo de difusão em função da distância entre microeletrodo e substrato. O coeficiente de difusão encontrado foi de $(6.28 \pm 0.03) \times 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ e teve boa concordância com o reportado na literatura, igual a $6.6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ (BŘEZINA et al., 1972).

Figura 65: Dependência do tempo de supressão do sinal no microeletrodo com a separação entre microeletrodo e substrato. Experimentos realizados em solução contendo ácido ascórbico 1 mmol L^{-1} em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Potencial aplicado ao microeletrodo $800 \text{ mV vs. Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat})}$.

Com base nesses resultados, foi realizada a determinação de paracetamol em uma formulação farmacêutica que continha ácido ascobico. Nesse experimento foi selecionada a distância de separação de 20 μm entre microeletrodo e substrato e aplicou-se um potencial de 0,5 V ao substrato para completa remoção do AA. A quantidade de PC encontrada foi de 450 mg por comprimido ($n = 3$), valor concordante com aquele reportado pelo fabricante (500 mg por comprimido) (LIMA; MELONI; BERTOTTI, 2013).

Apêndice 2: *Construção e caracterização de micropipetas para aplicações na microscopia eletroquímica.*

No livro editado pelo Prof. Allen J. Bard, a SECM é definida como “*the measurement of current through a microelectrode when it is held or moved in a solution in the vicinity of a substrate*” (BARD; MIRKIN, 2012). Entretanto, nos últimos anos alguns grupos de pesquisa vêm substituindo o uso de microeletrodos metálicos por micro ou nanopipetas preenchidas com solventes orgânicos (KIM et al., 2013; KRANZ, 2014; SHEN et al., 2012). Por serem facilmente obtidas na escala submicrométrica, as nanopipetas se tornam uma alternativa interessante para aumentar a resolução da SECM (AMEMIYA; WANG; MIRKIN, 2013). Neste contexto, nesta seção são apresentados os resultados obtidos na construção e caracterização de micropipetas para aplicações na microscopia eletroquímica obtidos durante o doutorado sanduíche realizado na University of Pittsburgh e em alguns experimentos feitos no IQ-USP.

O comportamento eletroquímico das pipetas está diretamente relacionado com a dimensão da ponta e com o processo de silanização a que o vidro é submetido (AMEMIYA; MIRKIN, 2013). Em função dessas características, primeiramente foram avaliados alguns procedimentos para a obtenção de pipetas com a ponta na escala sub-micrométrica. As micropipetas foram construídas esticando capilares de vidro de borosilicato (I.D. = 0,58 mm e O.D. = 1 mm) com um puxador de pipetas a laser modelo P-2000 (Sutter Instrument – USA). Esse puxador de pipetas permite o controle da temperatura do feixe de laser incidido no capilar (Heat), a largura do feixe (Filament), a velocidade de estiramento antes de puxar o capilar (Velocity), o tempo no qual o feixe de laser é desligado (Delay) e a força com que o capilar é puxado (Pull).

A Figura 66 apresenta micrografias de ponta de pipetas obtidas com três procedimentos distintos. Foram alterados no programa de estiramento a temperatura, o número de linhas do programa e a velocidade.

Figura 66: Micrografias da ponta de pipetas obtidas utilizando três programas de estiramento diferentes. Magnificação de 50x.

Como pode ser observado na figura acima, micropipetas obtidas utilizando o programa de estiramento A e C tiveram o mesmo diâmetro, mas diferentes comprimentos. Diferentemente, a micropipeta obtida utilizando o programa B possuía um diâmetro muito pequeno e uma geometria diferente (não cônica) das obtidas utilizando os programas A e C. Pipetas com

comprimentos menores tendem a ser mais resistentes e em função dessa característica, o programa de estiramento C foi selecionado para a obtenção das micropipetas.

A silanização das micropipetas foi realizada utilizando vapor de clorotrimetilsilano com auxílio de um sistema de pressão reduzida (KIM et al., 2012; WANG et al., 2013). Neste procedimento, as micropipetas ficam expostas ao vapor do silano por 40 min e tem-se como objetivo deixar o vidro hidrofóbico, evitando assim que água entre no interior da micropipeta (AMEMIYA; MIRKIN, 2013). Após a silanização, as micropipetas foram preenchidas com diclorometano contendo um eletrólito orgânico, ETH 500 10 mmol L⁻¹, e o contato elétrico foi realizado imergindo um fio de prata nessa solução.

Assim como os microeletrodos metálicos, as micropipetas também foram caracterizadas por voltametria e por SECM. No entanto, diferentemente dos eletrodos metálicos, onde a resposta eletroquímica está relacionada com a transferência de elétrons, a resposta das micropipetas depende da transferência de íons da fase aquosa para a fase orgânica (BARD; FAULKNER, 2000). A Figura 67 apresenta voltamogramas de transferência de íons (*ion transference voltammetry*) obtidos com uma micropipeta em solução contendo KCl 0,1 mol L⁻¹ na ausência (linha vermelha) e na presença de tetrabutilamônio (TBA) 1 mmol L⁻¹ (linha preta).

Figura 67: Voltamogramas de transferência de íons obtidos em KCl 0,1 mol L⁻¹ na ausência (linha vermelha) e na presença de TBA 1 mmol L⁻¹ (linha preta). $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Como pode ser visualizado na Figura 67, na ausência de TBA os voltamogramas apresentaram um sinal de corrente somente em potenciais entre 300 e 250 mV, o qual está relacionado com a transferência de íons cloreto na interface líquido/líquido. No entanto, na presença de TBA ocorreu um aumento de corrente como consequência da transferência desse íon da fase aquosa para a fase orgânica. O perfil sigmoidal do voltamograma obtido se assemelha ao de um microeletrodo, em que obtém-se corrente constante e independente do tempo. Sendo o comportamento eletroquímico de uma micropipeta semelhante ao de um microeletrodo, a Equação 14 ($I_L = \beta 4nFDCr$) pode ser utilizada para determinar o raio da micropipeta. O raio da micropipeta foi estimado utilizando essa relação, e o valor encontrado foi de 290 nm. Para esse cálculo, o RG das micropipetas foi considerado como se a relação entre O.D. e I.D. do capilar fosse mantida após o estiramento, logo $1,0 \text{ mm} / 0,58 = 1,7$. Além disso, imagens com

microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas para estimar o diâmetro da ponta das micropipetas esticadas (Figura 68). Os valores encontrados foram de aproximadamente 300 nm de raio, em concordância com o valor calculado utilizando a voltametria de transferência de íons.

Figura 68: Imagem da micropipeta fabricada obtida por microscopia eletrônica (MEV)

As micropipetas também foram caracterizadas utilizando a SECM. Para tanto, foram obtidas curvas de aproximação utilizando wafer de silício como substrato. A Figura 69 apresenta as curvas de aproximação obtidas para duas diferentes micropipetas e seus respectivos voltamogramas de transferência de íons.

Figura 69: Curvas de aproximação (A) e voltamogramas de transferência de íons (B) obtidos em solução contendo TBA 1 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ obtidos com duas diferentes micropipetas. $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Velocidade aproximação 150 nm s^{-1} . Potencial do microeletrodo - $50 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$.

Como pode ser observado, as curvas de aproximação tiveram boa correlação com a curva teórica para difusão com acesso restrito (Figura 69-A). Assim como os experimentos envolvendo microeletrodos metálicos, a corrente diminuiu à medida que a separação entre micropipeta e substrato diminuiu. Com base nesses resultados, o raio das micropipetas pôde ser determinado e os valores encontrados foram 256 nm e 237 nm e RG igual a $1,5$ e $1,2$, respectivamente. Além

disso, também foi calculado o ponto onde a micropipeta tocou a superfície do *wafer* de silício, o qual pode ser evidenciado pela alteração do perfil da curva de aproximação, e os valores encontrados foram 15 nm e 12 nm. O raio das micropipetas também foi calculado utilizando voltamogramas de transferência de íons (Figura 69-B) e os resultados obtidos foram similares aos obtidos com a curva de aproximação.

De maneira geral, esses resultados demonstram a aplicabilidade do uso do fenômeno de transferência de íons entre duas fases imiscíveis na fabricação de sondas para aplicação em SECM. Como pode observado, com essa metodologia é possível obter micropipetas com pontas na escala sub-micrométrica, o que aumenta a resolução lateral da microscopia eletroquímica e permite o posicionamento do eletrodo muito próximo à superfície em estudo.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Alex da Silva Lima

Local e data de nascimento: Osasco, 17 de abril de 1984

EDUCAÇÃO

➤ Ensino Fundamental e Médio

E.E. Prof. Ernesto Thenn de Barros, Osasco, 2001.

➤ Licenciatura plena em Química

Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, 2008.

➤ Mestre em Ciências (Química)

Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- Doutorado Sanduíche, University of Pittsburg, EUA, 2013.

- Nanomateriais e Nanotecnologia, Instituto de Química – Universidade de São Paulo, 2008.

- Metal-Based Drugs, Universidade Federal de São Carlos, 2007.

- Separation Science on Pharmaceutical R&D, Universidade Federal de São Carlos, 2007.

OCUPAÇÃO

Bolsista de Iniciação Científica, CNPq, de 01/09/2006 a 31/07/2008.

Bolsista de Mestrado, CNPq, de 01/04/2009 a 31/07/2009.

Bolsista de Mestrado, FAPESP, de 01/08/2009 a 31/03/2011.

Bolsista de Doutorado, FAPESP, de 01/06/2011 a 31/03/2015.

Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior, FAPESP, de 01/10/2014 a 31/01/2014.

PUBLICAÇÕES

❖ ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

REIS, RAFAEL M. ; VALIM, RICARDO B. ; ROCHA, ROBSON S. ; LIMA, A. S. ; CASTRO, POLLYANA S. ; BERTOTTI, MAURO ; LANZA, MARCOS R.V. . The use of copper and cobalt phthalocyanines as electrocatalysts for the oxygen reduction reaction in acid medium. *Electrochimica Acta*, v. 139, p. 1-6, 2014.

VALIM, R. B. ; REIS, R. M. ; CASTRO, P. S. ; LIMA, A. S. ; ROCHA, R. S. ; BERTOTTI, M. ; LANZA, M. . Electrogenation of hydrogen peroxide in gas diffusion electrodes modified with tert-butyl-anthraquinone on carbon black support. *Carbon* (New York), v. 61, p. 236-244, 2013.

LIMA, A. S. ; MELONI, GABRIEL N. ; BERTOTTI, M. ; Bertotti, M. . Determination of Paracetamol in Presence of Ascorbic Acid in Pharmaceutical Products by Scanning Electrochemical Microscopy. *Electroanalysis* (New York, N.Y.), v. 25, p. 1395–1399, 2013.

LIMA, ALEX S. ; SALLES, MAIARA O. ; FERREIRA, TIAGO L. ; PAIXÃO, THIAGO R.L.C.; BERTOTTI, M. . Scanning electrochemical microscopy investigation of nitrate reduction at activated copper cathodes in acidic medium. *Electrochimica Acta*, v. 78, p. 446-451, 2012.

SALLES, M. O. ; BATTISTEL, D. ; LIMA, A. S. ; BERTOTTI, M. ; DANIELE, S. . Ex-situ Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) investigation of bismuth- and bismuth/lead alloy film-modified gold electrodes in alkaline medium. *Electroanalysis* (New York), 2011.

CASTRO, P. S. ; LIMA, A. S. ; FERREIRA, T. L.; BERTOTTI, M. . Scanning Electrochemical Microscopy as a tool for the characterization of dental erosion. *International Journal of Electrochemistry*, 2011.

SOUZA, A. P. R. ; LIMA, A. S. ; SALLES, M. O. ; NASCIMENTO, A. N. ; BERTOTTI, M. . The use of a gold disc microelectrode for the determination of copper in human sweat. *Talanta* (Oxford), v. 83, p. 167-170, 2010.

MATOS, I. O. ; FERREIRA, T. L. ; PAIXAO, T. R. L. C. ; LIMA, A. S. ; BERTOTTI, M. ; ALVES, W. A. . Approaches for multicopper oxidases in the design of electrochemical sensors for analytical applications. *Electrochimica Acta*, v. 55, p. 5223-5229, 2010.

GAMBOA, J. C. M. ; PEÑA, R. C. ; PAIXÃO, T. R. L. C. ; LIMA, A. S. ; BERTOTTI, M. . Activated Copper Cathodes as Sensors for Nitrite Analysis. *Electroanalysis* (New York), v. 22, p. 2627-2632, 2010.

MARTINEZ, M. T. ; LIMA, A. S. ; BOCCHI, Nerilso ; TEIXEIRA, M. F. S. . Voltammetric performance and application of a sensor for sodium ions constructed with layered birnessite-type manganese oxide. *Talanta* (Oxford), v. 80, p. 519-525, 2009.

LIMA, A. S. ; BOCCHI, N. ; GOMES, H. M. ; TEIXEIRA, M. F. S. . An Electrochemical Sensor Based on Nanostructured Hollandite-type Manganese Oxide for Detection of Potassium Ions. *Sensors* (Basel), v. 9, p. 6613-6625, 2009.

❖ ARTIGOS EM FASE DE REDAÇÃO

SANTOS, C. S.; LIMA, A. S.; BATTISTEL, D.; DANIELE, D.; BERTOTTI, M. Fabrication of a dual-mode SECM tip for monitoring local pH changes during the nitrate reduction at copper cathodes. Artigo a ser submetido para a revista *Electrochimica Acta*.

❖ TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO

REIS, R. M. ; ROCHA, R. S. ; CASTRO, P. S. ; LIMA, A. S. ; BERTOTTI, M. ; LANZA, M. . SECM investigation of the ORR in a cobalt phthalocyanine supported on Printex 6L carbon. International Symposium on Electrocatalysis: New Concepts and Approaches, 2012, Alagoas - PE.

LIMA, A. S. ; SALLES, M. O. ; FERREIRA, T. L. ; BERTOTTI, M. . Difusão de espécies eletroativas através de celofane: Um estudo empregando microscopia eletroquímica de varredura

(SECM). XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2011, Bento Gonçalves - RS

LIMA, A. S. ; SALLES, M. O. ; FERREIRA, T. L. ; PAIXAO, T. R. L. C. ; BERTOTTI, M. .
Uso da SECM no estudo da redução catódica de nitrato em meio de cloreto de cobre eletroquimicamente ativado. In: XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2011, Bento Gonçalves – RS.

TEIXEIRA, M. F. S. ; LIMA, A. S. ; SILVA, E. R. ; SILVA, M. R. ; ANGELO, A. C. D.,
Avaliação de Nanopartículas Metálicas Suportadas em Carbono como Modificadores na Construção de Sensores Eletroquímicos. XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2009, Fortaleza - CE.

MARTINEZ, M. T. ; LIMA, A. S. ; PALACIO, G. ; TEIXEIRA, M. F. S. . Desenvolvimento de um Sensor Eletroquímico para Íons Sódio Elaborado com Óxido de Manganês Tipo Hausmannita. XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2009, Fortaleza - CE.

TEIXEIRA, M. F. S. ; LIMA, A. S. ; SERAPHIM, P. M. ; BOCCHI, N., Development of an Amperometric sensor for Potassium Ions. BIOSTEC 2008 - International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies, 2008, Funchal – Portugal . Proceedings of the BIOSTEC 2008 - Section Biodevices, 2008. p. 198-201

LIMA, A. S. ; TEIXEIRA, M. F. S. ; MARTINEZ, M. T., Utilização de Sensor Construído com Óxido de Manganês(IV) Tipo Hollandita para Detecção de Íons Potássio. XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2007, Presidente Prudente - SP.

❖ RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO

SANTOS, C. S. ; LIMA, A. S. ; BERTOTTI, M. . Desenvolvimento de Sensor Potenciométrico e Amperométrico para Aplicação em Microscopia Eletroquímica de Varredura. 21º Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica (SIBAE), 2014, La Serena - Chile

LIMA, A. S. ; GALGANO, P. D. ; MELONI, G. N. ; EL SEOUD, O. A. ; BERTOTTI, M. . Uso da Microscopia Eletroquímica (SECM) na Determinação de Coeficiente de Difusão de Micelas de CxMelmCl ($x = 10$ e 12). Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2013, Campos do Jordão – SP.

SANTOS, C. S. ; LIMA, A. S. ; SILVA, V. F. G. ; BERTOTTI, M. . Construção de microeletrodo sensor de pH para aplicação em Microscopia Eletroquímica de Varredura. XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2013, Campos do Jordão – SP.

MELONI, G. N. ; LIMA, A. S. ; BERTOTTI, M. . A study on the use of SECM for electrochemical depletion of ascorbate and selective determination of paracetamol in pharmaceutical formulations. In: PITTICON CONFERENCE & EXPO, 2013, Philadelphia – USA.

SANTOS, C. S. ; LIMA, A. S. ; BERTOTTI, M. . Desenvolvimento de sensor para o monitoramento de pH em microambientes. 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2012, Águas de Lindóia -SP.

MIGOTTO, A. M. A. ; LIMA, A. S. ; FERREIRA, T. L. ; BERTOTTI, M. . Uso da SECM na determinação de coeficientes de difusão em soluções glicerol/água. 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2012, Águas de Lindóia – SP.

BAPTISTA, A. P. ; LIMA, A. S. ; SALLES, M. O. ; BERTOTTI, M. . Avaliação da permeação de íons iodeto através de celofane utilizando SECM. 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2012, Águas de Lindóia – SP.

LIMA, A. S. ; FERREIRA, T. L. ; SEOUD, O. A. E. ; BERTOTTI, M. . The use of Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) in the determination of the diffusion coefficient of C14TABr micelles. 63rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2012, Praga – República Tcheca.

REIS, R. M. ; ROCHA, R. S. ; CASTRO, P. S. ; LIMA, A. S. ; BERTOTTI, M. ; LANZA, M. . SECM investigation of the ORR in a cobalt phthalocyanine supported on Printex 6L carbon. In: International Symposium on Electrocatalysis: New Concepts and Approaches, 2012, Maragogi – AL.

LIMA, A. S.; SALLES, M. O.; CASTRO, P. S.; PAIXÃO, T. R. L. C.; FERREIRA, T. L.; BERTOTTI, M. . SECM Characterization of CU(I) Formation During the Dissolution of Copper in Acidic Medium. Pittsburgh Conference, 2011, Atlanta – EUA.

LIMA, A. S. ; MATOS, I. O. ; ALVES, W. A. ; PAIXAO, T. R. L. C. ; FERREIRA, T. L. ; BERTOTTI, M. . Uso da Microscopia Eletroquímica de Varredura (SECM) no Estudo da Atividade Eletroquímica de Sistema Biomimético. 33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia - SP.

SOUZA, A. P. R. ; LIMA, A. S. ; SALLES, M. O. ; BERTOTTI, M. . Uso de Microeletrodos de Au na Determinação de Cobre em Gostas de Suor por "Stripping". 33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia - SP.

CASTRO, P. S. ; LIMA, A. S. ; NISHIDA, A. C. ; FRANCCI, C. E. ; BERTOTTI, M. . Uso da Microscopia Eletroquímica de Varredura (SECM) no Monitoramento do Consumo de Íons H⁺ em Dentes. 33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia - SP.

LIMA, A. S. ; SALLES, M. O. ; FERREIRA, T. L. ; PAIXAO, T. R. L. C. ; BERTOTTI, M. . Utilização da Microscopia Eletroquímica (SECM) no Estudo da Deposição de Bismuto em Superfícies de Ouro. 15^o Encontro Nacional de Química Analítica / 3^o Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009, Salvador - BA.

LIMA, A. S. ; MARTINEZ, M. T. ; BOCCHI, N. ; TEIXEIRA, M. F. S., Construção de um Sensor Amperométrico para Detecção de Íons Potássio. 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia - SP.

MARTINEZ, M. T. ; LIMA, A. S. ; BOCCHI, N. ; TEIXEIRA, M. F. S., Avaliação do Desempenho de um Sensor para Íons Sódio Construído com Óxido de Manganês(IV) tipo Birnessita. 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia – SP

CARDOSO, C. X. ; TEIXEIRA, M. F. S. ; MARTINS, T. A. ; LIMA, A. S., Electrochemical Sensor of Composite Graphite/PVDF. 16th International Conference on Defects in Insulating Material, 2008, Aracaju - SE.

MARTINEZ, M. T. ; LIMA, A. S. ; CARDOSO, C. X. ; TEIXEIRA, M. F. S., Voltammetric Study of the Composite Electrode Elaborated with PVDF, Graphite Powder and Hausmannite-type Manganese Oxide. VII Encontro da SBPMat, 2008, Guarujá - SP.

LIMA, A. S. ; MARTINEZ, M. T. ; CARDOSO, C. X. ; TEIXEIRA, M. F. S., Chonoamperometric method to estimate the active area of the PVDF-Graphite composite electrode. VII Encontro da SBPMat, 2008, Guarujá SP

LIMA, A. S. ; MARTINEZ, M. T. ; BOCCHI, N. ; TEIXEIRA, M. F. S., Avaliação Eletroquímica de um Eletrodo com Óxido de Manganês(IV) Tipo Hollandita. 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia – SP

MARTINEZ, M. T. ; LIMA, A. S. ; BERGAMINI, M. F. ; BOCCHI, N. ; TEIXEIRA, M. F. S.,
Estudo Eletroanalítico de Um Eletrodo Modificado com Óxido de Manganês(IV) Tipo Birnessita.
30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia – SP.

MARTINEZ, M. T. ; TEIXEIRA, M. F. S. ; LIMA, A. S., Analise Voltamétrica do Mecanismo
de Resposta de um Sensor Construído com Óxido de Manganês(IV) Tipo Birnessita para Íons
Sódio. XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2007, Presidente Prudente – SP.

CARDOSO, C. X. ; MARTINS, T. A. ; LIMA, A. S. ; TEIXEIRA, M. F. S., Study
Electrochemical of Composite Graphite/PVDF. 6th Brazilian MRS Meeting, 2007, Natal. VI
Encontro SBPMat, 2007.

FREITAS, B. H. ; LIMA, A. S. ; BOCCHI, N. ; TEIXEIRA, M. F. S., Estudo da resposta
potenciométrica do óxido $\text{Li}_{1.05}\text{Al}_{10.02}\text{Mn}_{1.98}\text{O}_4$ no desenvolvimento de um sensor para íons lítio.
XV Encontro de Química da Região Sul, 2007, Ponta Grossa – PR.

GOLINELLI, D. L. C. ; PALACIO, G. ; LIMA, A. S. ; BOCCHI, N. ; TEIXEIRA, M. F. S.,
Avaliação Eletroquímica de um Eletrodo Modificado com Óxido de Manganês(IV) para Peróxido
de Hidrogênio. XV Encontro de Química da Região Sul, 2007, Ponta Grossa - PR.

MARTINS, T. A. ; LIMA, A. S. ; CARDOSO, C. X. ; TEIXEIRA, M. F. S., Comportamento
eletroquímico do compósito de PVDF/Grafite utilizado como eletrodo em voltametria cíclica.
XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2007, Presidente Prudente – SP

LIMA, A. S. ; LANFREDI, S. ; NOBRE, M. A. L., Caracterização Estrutural do Niobato de Potássio e Estrôncio com Estrutura Tipo Tetragonal Tungstênio Bronze (TTB). XVII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2005, Presidente Prudente – SP.