## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA Programa de Pós-Graduação em Química

## LUÍS MARCOS CERDEIRA FERREIRA

# Caracterização e Aplicação Analítica de Eletrodos Modificados com Sistemas Porfirínicos Supramoleculares

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme Resolução CoPGr 5890 O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG: 16/12/2015

## LUÍS MARCOS CERDEIRA FERREIRA

# Caracterização e Aplicação Analítica de Eletrodos Modificados com Sistemas Porfirínicos Supramoleculares

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

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Angnes

São Paulo 2016 Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Ferreira, Luís Marcos Cerdeira
 F383c Caracterização e aplicação analítica de eletrodos modificados com sistemas porfirínicos supramoleculares / Luís Marcos Cerdeira
 Ferreira. -- São Paulo, 2015.
 166p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental. Orientador: Angnes, Lúcio

1. Química eletroanalítica 2. Química supramolecular : Química inorgânica I. T. II. Angnes, Lúcio, orientador.

543.0871 CDD

Dedico esta tese aos meus pais, Expedito e Calmesina, e aos meus irmãos, Francisco e Júlio, por acreditarem e sempre me apoiarem nas minhas escolhas.

#### AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Lúcio Angnes pela orientação, ensinamento, amizade e liberdade concedida para conduzir a pesquisa.

Aos professores Dr. Koiti Araki e Dr. Henrique E. Toma, pela grande contribuição e pela liberdade de usufruir da infraestrutura do Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia (LQSN).

À professora Dra. Ana Maria C. Ferreira pela grande ajuda com as medidas de ressonância paramagnética eletrônica.

Ao professor Dr. Ivano G. R. Gutz pela contribuição intelectual e críticas sempre muito bem fundamentadas.

Ao professor e amigo Dr. Paulo R. Martins pela contribuição com o trabalho e o conhecimento hidróxido de níquel.

Aos professores Dr. Kegan Kerman pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório na Universidade de Toronto, e Dr. Ronald Kluger pela contribuição no trabalho sobre hemoglobinas modificadas.

Aos professores Dr. Claudimir L. do Lago e Jivaldo R. Matos pelos ensinamentos extraclasse e momentos de descontração.

Ao professor Dr. Gianluca Azzellini, pelas aulas inspiradoras sobre porfirinas.

Aos colegas Mauro S. F. Santos, pela grande contribuição na confecção de células espectroeletroquímicas, e Daniel Grasseschi pelas medidas em espectroscopia Raman e reflectância UV-Vis.

À amiga e colega Dra. Fabiana Felix, pela parceria nos trabalhos em conjunto e pela paciência.

Aos colegas de diferentes gerações do Grupo de Pesquisa em Química Analítica Instrumental, GPQAI (o eterno Laboratório de Automação e Instrumentação Analítica, LAIA), Renata, Vinicius, Thiago (Babe), Iranaldo, Guilherme (Splinter), Eric (Pop), Guilherme (Minoru), Johnny, André, Kellinton, Suely, João, Fernando, Alexandre, Thiago, Vagner, Michele e Pâmela.

Aos técnicos Simone e Daniel, por tornarem a rotina do laboratório menos difícil.

Aos meus amigos Júnior, Tarcisio, Ricardo, Flávio, Fabio, Diego, Marcelo, Pollyana e Alice, por serem tão presentes, seja por perto ou de longe.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida e ao programa PDSE/CAPES pela concessão da bolsa de estudos no exterior

Muito obrigado.

"A Ciência opera na fronteira entre conhecimento e ignorância. Não temos medos de admitir o que não sabemos. Não há vergonha nisso. A única vergonha é fingir que temos todas as respostas." -Neil deGrasse Tyseon

*"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê."* 

-Arthur Schopenhauer

#### RESUMO

Ferreira, L.M.C. Caracterização e Aplicação Analítica de Eletrodos Modificados com Sistemas Porfirínicos Supramoleculares. 2015. 166p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Estudos com eletrodos modificados foram conduzidos utilizando dois sistemas porfirínicos supramoleculares diferentes. O primeiro foi baseado na modificação de eletrodo de carbono vítreo com uma porfirina de níquel tetrarrutenada,  $[Ni^{II}TPyP{Ru^{II}(bipy)_2Cl}_4]^{4+}$ . A modificação do eletrodo foi realizada por meio de sucessivos ciclos voltamétricos em meio alcalino (pH 13), gerando um eletrodo com característica similar a eletrodos modificados com α-Ni(OH)<sub>2</sub>. A caracterização química do filme formado foi realizada através das técnicas de voltametria cíclica, ressonância paramagnética eletrônica, espectroscopia eletrônica por reflectância e espectroscopia Raman com ensaio espectro-eletroquímico. Os resultados sugerem a formação de um polímero de coordenação, [µ-O<sub>2</sub>-Ni<sup>II</sup>TPyP{Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl}<sub>4</sub>]<sub>n</sub>, composto por subunidades porfirínicas ligadas entre si por pontes µ-peroxo axialmente coordenadas aos átomos de níquel (Ni-O-O-Ni). O crescimento do filme apresentou dependência da alcalinidade do meio pela formação do precursor octaédrico [Ni(OH)<sub>2</sub>TRPyP]<sup>2+</sup> em solução, pela coordenação de OH<sup>-</sup> nas posições axiais do átomo de níquel. O processo de eletropolimerização indicou a participação de radical hidroxil, gerado por oxidação eletrocatalítica da água nos sítios periféricos da porfirina contendo o complexo de rutênio. O mesmo eletrodo foi aplicado como sensor eletroquímico para análise amperométrica de ácido fólico em comprimidos farmacêuticos. O sensor foi associado a um sistema de Batch Injection Analysis (BIA) alcançando considerável rapidez e baixo limite de detecção. Para as análises das amostras também foi proposto um método para a remoção da lactose, que agia como interferente. O segundo estudo envolveu a modificação de eletrodos de carbono vítreo com diferentes hemoglobinas, naturais (HbA<sub>0</sub>, HbA<sub>2</sub> e HbS) e sintéticas (Hb-PEG5K<sub>2</sub>, αα-Hb-PEG5K<sub>2</sub> e BT-PEG5K<sub>4</sub>), para a avaliação da eficiência na redução eletrocatalítica de nitrito mediada por Fe<sup>I</sup>-heme. Os filmes foram produzidos pela mistura de soluções das hemoglobinas com brometo de didodecildimetiltrimetilamônio (DDAB), aplicados nas superfícies com consecutiva evaporação, formando filmes estáveis. Os valores de potencial redox para os processos do grupo heme e a sua associação com a disponibilidade do grupo na proteína foram avaliados por voltametria cíclica. Os valores das constantes de velocidade, k, para redução de nitrito foram obtidos por cronoamperometria em -1,1 V (vs Ag/AgCl<sub>(KCL 3M)</sub>) que foram utilizados para estudo comparativo entre as espécies sintéticas para eventual aplicação clínica.

Palavras-chave: Eletrodos modificados, sistemas supramoleculares, porfirinas tetrarrutenadas, hemoglobina, eletrocatálise, sensores eletroquímicos.

#### ABSTRACT

Ferreira, L.M.C. Characterization and Analytical Application of Electrodes Modified with Supramolecular Pophyrin Sytems. 2015. 166p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Studies with modified electrodes were conducted using two different supramolecular porphyrin systems. The first one was based on the modification of glassy carbon electrode with a tetraruthenated nickel porphyrin,  $[Ni^{II}TPyP{Ru^{II}(bipy)_2Cl}_4]^{4+}$ . The electrode modification was carried out through successive voltammetric cycles in alkaline media (pH 13), generating an electrode with feature similar to  $\alpha$ -Ni(OH)<sub>2</sub> modified electrodes. The chemical characterization of this film was performed by cyclic voltammetry, electronic paramagnetic resonance, reflectance electronic spectroscopy and Raman spectroscopy with spectroelectrochemistry assay. The results suggested the formation of a coordination polymer,  $[\mu-O_2-Ni^{II}TPyP{Ru^{II}(bipy)_2Cl}_4]_n$ , composed by porphyrin subunits linked by  $\mu$ -peroxo bridges axially coordinated to nickel atoms (Ni-O-O-Ni). The film growth showed dependence of the alkaline media by the formation of octahedral precursor [Ni(OH)<sub>2</sub>TRPyP]<sup>2+</sup> in solution by way of axial coordination of OH<sup>-</sup> to the nickel atoms. The electropolymerization process showed to have a contribution from hydroxyl radicals, generated by electrocatalytic oxidation of water on the peripheral sites containing the ruthenium complexes. The same electrode was applied as an electrochemical sensor for amperometric analysis of folic acid in pharmaceutical tablets. The sensor was associated to a Bath Injection Analysis (BIA) system, achieving good sampling frequency and low detection limit. For the samples analysis, it was also proposed a method for lactose removal. The second study comprises the modification of glassy carbon electrodes with different hemoglobin species, of natural occurrence (HbA<sub>0</sub>, HbA<sub>2</sub> e HbS) and synthetics (Hb-PEG5K<sub>2</sub>, αα-Hb-PEG5K<sub>2</sub> e BT-PEG5K<sub>4</sub>) for evaluation of efficiency on electrocatalytic reduction of nitrite mediated by Fe<sup>I</sup>-heme. The films were produced by mixing solutions of the hemoglobins with didecyldimethylammonium bromide (DDAB), applied on the surfaces with following solvent evaporation, forming stable films. The redox potential values for the heme group processes and the heme availability in the protein were evaluated by cyclic voltammetry. The reaction rate constants, k, for nitrite reduction were obtained by chronoamperometry at -1,1 V, which were used for comparative study between the synthetic species for further clinical applications.

Keywords: modified electrodes, supramolecular systems, tetraruthenated porphyrins, hemoglobin, electrocatalysis, electrochemical sensors.

#### LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS QUÍMICAS

 $[Ni^{II}TPyP{Ru^{II}(bipy)_2Cl}_4]^{4+}: cátion \mu-meso-tetra(4-piridil)porfirinatoniquel(II)-tetrakis[bis(piridina)-(cloro)rutênio(II). Porfirina tetrarrutenada de níquel$ 

[Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl(PyP)]<sup>4+</sup>: Porfirina tetrarrutenada de níquel (ênfase no complexo [Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup> periférico)

[Ni(OH)<sub>2</sub>TRPyP]<sup>2+</sup>: Porfirina tetrarrutenada de níquel axialmente coordenada com íons hidroxila

 $[\mu$ -O<sub>2</sub>-Ni<sup>II</sup>TPyP{Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl}<sub>4</sub>]<sub>n</sub>: Porfirina tetrarrutenada de níquel polimerizada axialmente por pontes  $\mu$ -peroxo

[Ru(bipy)<sub>3</sub>]<sup>3+</sup>: Cátion tris(2,2'-bipiridina)rutênio(III)

[ZnTPPS]<sup>4-</sup>: 5, 10, 15, 20-tetrakis(4-sulfonatofenil)porfirinatozinco(II)

H<sub>2</sub>TMPyP: tetrakis(N-metil-4'piridil) porfirina base livre

ZnTMPyP: tetrakis(N-metil-4'piridil)porfirinato zinco(II)

AF: Ácido Fólico

BIA: Análise por Injeção em Batelada (do inglês: Batch Injection Analysis)

bipy: Bipiridina

CAF: Cloranfenicol

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DMPO: 5,5 dimetil-1-pirrolina-N-óxido

ECE (mecanismo): Eletroquímico-Químico-Eletroquímico (do inglês: *Electrochemical-Chemical-Electrochemical*)

ECCE (mecanismo): Eletroquímico-Químico-Químico-Eletroquímico (do inglês: *Electrochemical-Chemical-Electrochemical*)

ECS: Eletrodo de calomelano saturado

EIS: Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (do inglês: *Electrochemical Impedance Spectroscopy*)

ELSA: Automontagem eletrostática camada-por-camada (do inglês: *Electrostatic Layer-by-Layer Self-Assembly*)

EPR: Ressonância Paramagnética Eletrônica (do inglês: *Electron Paramagnetic Resonance*)

EQCM: Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (do inglês: *Electrochemical Quartz Crystal Microbalance*)

FIA: Análise por Injeção em Fluxo (do inglês: Flow Injection Analysis)

Hb: Hemoglobina

HBOC: Carreadores de Oxigênio Baseados em Hemoglobina (do inglês: *Hemoglobin-Based Oxygen Carriers*)

HOMO: Mais Alto Orbital Molecular Ocupado (do inglês: Highest Occupied Molecular Orbital)

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês: *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LUMO: Mais Baixo Orbital Molecular Não Ocupado (do inglês: Lowest Unoccupied Molecular Orbital)

SERS: Espelhamento Raman Amplificado por Superfícies (do inglês: Surface-Enhanced Raman Scattering)

PM: Peso molecular



5, 10, 15, 20-tetrakis(4-sulfonatofenil)porfirinatozinco(II), [ZnTPPS]<sup>4-</sup>



$$\label{eq:meso-tetra} \begin{split} \mu\text{-meso-tetra}(4\text{-piridil}) porfirination iquel(II) \text{-etrakis}[bis(piridina) \text{-}(cloro) rutênio(II), \\ [Ni^{II}TPyP\{Ru^{II}(bipy)_2Cl\}_4]^{4+} \end{split}$$



[Ni(OH)<sub>2</sub>TRPyP]<sup>2+</sup>



tris(2,2'-bipiridina)rutênio(III),  $[Ru(bipy)_3]^{3+}$ 



tetrakis(N-metil-4'piridil) porfirina, [H<sub>2</sub>TMPyP]<sup>4+</sup>



tetrakis(N-metil-4'piridil)porfirinato zinco(II), [ZnTMPyP]<sup>4+</sup>

### SUMÁRIO

CAPÍTULO I: Sistemas Porfirínicos Supramoleculares	23
1. Metaloporfirinas e Sistemas Supramoleculares	24
CAPÍTULO II: Fundamentos Teóricos	33
1. Introdução	34
2. Eletrodos Quimicamente Modificados, Eletrocatálise e Mediadores Redox: Mode para Transferência de carga	los 34
3. Estruturas de Porfirinas e Espectroscopia Eletrônica de Absorção	42
4. Espectroscopia Raman	46
5. Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)	49
CAPÍTULO III: Caracterização do Filme Eletroquimicamente Gerado a Partir de Por Tetrarrutenada de Níquel em Meio Alcalino	firina 53
1. Introdução	54
1.1. Considerações iniciais	54
1.2. Eletroquímica envolvendo Ni(OH) <sub>2</sub>	57
1.3. Filmes eletródicos derivados de Complexos Macrocíclicos N <sub>4</sub> de Níquel: Asp históricos	ectos
2. Objetivos	67
3. Parte Experimental	67
3.1. Reagentes e Soluções	67
3.2. Instrumentação	68
3.2.1 Voltametria Cíclica	
3.2.2 Espectroscopia Eletrônica por Reflectância	69
3.2.3 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)	70
3.2.4 Espectroscopia Raman e Espectroeletroquímica	71
3.3. Procedimentos	72
3.3.1 Preparo e modificação dos eletrodos	72
4. Resultados e Discussões	73
4.1. Observações Preliminares	73
4.2. Espectroscopia Eletrônica e Comportamento em Meio alcalino	75
4.3 Aspectos Eletroquímicos do Crescimento do Filme Porfirínico	78
a) Aspectos Corois	70
<ul> <li>b) Etapas iniciais do crescimento do filme: Papel dos sítios</li> <li>D) Il di entre constructione de la construction de la construction</li></ul>	70
$[Ku^{-}(bipy)_{2}Cl(PyP)]$	81
c) Processos envolvendo os sitios centrais Ni-portirina e dependência dos processos	
4.4. Espectroscopia Raman e Espectroeletroquímica	91
1 1 1 1	

5. Conclusões	
CAPÍTULO IV Aplicação Analítica de Filmes Eletropolimerizados Tetrarrutenada de Níquel em Meio Alcalino: Determinação Amperométrica de	de Porfirina Ácido Fólico 101
1. Introdução	
2. Parte Experimental	
3. Determinação Amperométrica de Ácido Fólico em Amostras Farmacêuti	.cas108
4. Objetivos	
5. Resultados e Discussões	
5.1. Voltametria Cíclica	
5.2. Pré-tratamento de amostras farmacêuticas contendo ácido fólico	
5.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	116
5.4. Batch Injection Analysis	116
6. Conclusões	
CAPÍTULO V: Estudo da Atividade Nitrito-Redutase de Carreadores de Oxige em Hemoglobina (HBOCs) Envolvendo Redução Eletrocatalítica Mediada por H	ênio Baseados Ieme-Fe <sup>I</sup> 124
1. Introdução	
1.1. Hemoglobina	
1.2. Transporte de oxigênio e mecanismo cooperativo	
1.3. Hemoglobina e a vasoatividade	
1.4. Carreadores de Oxigênio Baseados em Hemoglobina (HBOCs)	
2. Objetivos	
3. Parte experimental	
3.1. Reagentes e Soluções	
3.2. Procedimentos	
3.2.1. Preparo e modificação de eletrodos	
3.2.2. Instrumentação e medidas eletroquímicas	
4. Resultados e Discussões	
4.1. Voltametria cíclica	
4.2. Cronoamperometria	
5. Conclusões	
Considerações Finais e Perspectivas Futuras	147
ANEXO A	

#### LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anel porfirínico base-livre com indicação das posições onde ocorrem inserção de substituintes e reação geral de coordenação de porfirinas com íons metálicos M<sup>n+</sup>. Onde M é o metal e n é sua respectiva carga......24

*Figura 2: Estruturas do grupo heme e de algumas hemeproteínas de importância biológica. Figura retirada e adaptada das referências [1-4].*....25

Figura 4: Eletropolimerização do substituinte N-metil-3-piridiletinil inserido na posição meso de uma zinco-porfirina. Figura adaptada da referência [18]. ......30

Figura 5: Arranjo unidimensional formado por e metaloporfirinas ligadas pelo ligante em ponte "L", no qual M é o metal central e n é o seu número de oxidação......31

Figura 6: Representação da alteração do momento dipolo de um polímero de coordenação porfirínico em resposta a um campo elétrico externo. Figura retirada da referência [25]....32

Figura 12: Efeito da coordenação de metais no anel porfirínico. Os espectros mostram a variação das bandas Soret e Q para H<sub>2</sub>TMPyP e ZnTMPyP, Figura adaptada da referência [39]......45

Figura 14: Representação dos espalhamentos Rayleigh, Raman Stokes e anti-Stokes, com excitação em 1064 nm. Figura adaptada da referência [45]......49

Figura 17: estrutura do cátion  $\mu$ -meso-tetra(4-piridil)porfirinatoniquel(II)tetrakis[bis(piridina)-(cloro)rutênio(II), [Ni<sup>II</sup>TPyP{Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl}<sub>4</sub>]<sup>4+</sup>.....54

Figura 19: Diagrama de Bode ilustrando as mudanças estruturais durante os processos de oxirredução envolvendo Ni(OH)<sub>2</sub> e NiOOH em suas diferentes formas polimórficas......58

Figura 20: (a) Voltamogramas cíclicos e (b) respectivas curvas eletrogravimétricas registrados para filmes de hidróxido de níquel nas formas  $\alpha$  e  $\beta$  em KOH 1 mol·L<sup>-1</sup>, velocidade de varredura de 10 mV·s<sup>-1</sup>. Figura retirada da referência [54]......59

*Figura 21: Estruturas básicas dos complexos macrocíclicos de níquel(II) precursores de filmes eletródicos em meio alcalino.*.....61

Figura 24: Esquema representativo da célula eletroquímica adaptada em cubeta de quartzo para as medidas de reflectância em eletrodo de Pt modificado com filme porfirínico......70

Figura 25: Esquema representativo da célula eletroquímica em fluxo para coleta do produto formado na superfície de eletrodo de carbono vítreo modificado com fime de  $[Ni^{II}TPyP{Ru^{II}(bipy)_2Cl}_4]^{4+}/[ZnTPPS]^{4-}$  para subsequente medida por EPR......71

Figura 26: (a) Esquema detalhado de montagem da célula espectroeletroquímica para os experimentos de caracterização; (b) Célula espectroeletroquímica em funcionamento. .......72

Figura 27: Frascos contendo  $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot L^{-1}$  do complexo porfirínico  $[Ni^{II}TPyP\{Ru^{II}(bipy)_2Cl\}_4]^{4+}$  em 1,0 mL de diferentes meios: (a) água, (b) solução aquosa de NaOH 0,1 mol  $\cdot L^{-1}$  e (c) metanol......74

Figura 31: Primeiros voltamogramas cíclicos registrados durante o processo de modificação eletródica de 1,0 x  $10^{-4}$  mol·L<sup>-1</sup> [Ni<sup>II</sup>TPyP{Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl}<sub>4</sub>]<sup>4+</sup> em NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> a 0,1 V·s<sup>-1</sup>, de 0 a 0,9 V: Branco (—); 1.° ciclo (—), 2.° ciclo (—) e 3.° ciclo (—)......80

Figura 34: O espectro de EPR da solução a partir da célula eletroquímica em fluxo para detecção de radicais hidroxil, com eletrodo de carbono vítreo modificado [Ni<sup>II</sup>TPyP{Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl}<sub>4</sub>]<sup>4+</sup>/[ZnTPPS]<sup>4-</sup> polarizado em 0,9 V, que mostra os sinais característicos do aduto DMPO/'OH......85

*Figura 35: Possível mecanismo eletrocatalítico para a geração de radicais hidroxil mediadas por*  $[Ru(bipy)_2Cl(PyP)]^{2+}$ *em meio de NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup>.*  $R = py-\{Ru(bipy)_2Cl\}^+_{4-}$ *......*87

 *Figura 38: Espectros Raman normalizados para*  $[Ni^{II}TPyP\{Ru^{II}(bipy)_2Cl\}_4]^{4+}$  *na forma sólida* (—) *e*  $[Ni^{II}(OH)_2TRPyP]^{2+}$  *presente em solução alcalina de NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> (*—), *obtidos com excitação em (a) 488 e (b) 532 nm......92* 

Figura 39: (a) Espectros Raman teóricos para espécie  $[NiP(O_2)]^{-1}$  e espectros Raman experimentais para a espécie  $[\mu-O_2-NiTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}^+_4]_n$  na superfície de carbono vítreo após (b) 50 e (c) 5 ciclos voltamétricos entre 0 e 0,9 V em NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup>......96

Figura 40: Série espectroeletroquímica Raman para  $[\mu-O_2-NiTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}^+_4]_n$ depositado em eletrodo de carbono vítreo em NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> em diferentes faixas de número de onda (de 1650 a 1450 cm<sup>-1</sup>(topo); 1450 a 900 cm<sup>-1</sup> (meio) e 900 a 50 cm<sup>-1</sup>(abaixo)......97

Figura 43: Linhas de fluxo em eletrodo hidrodinâmico de configuração Wall-Jet. Figura retirada da referência [118]......104

Figura 44: Dependência da corrente faradaica  $(I_F)$  e da corrente capacitiva  $(I_C)$  em função do tempo de aplicação de um pulso de potencial em uma solução em estado estacionário (A) e em sistemas em fluxo com vazões baixas (B) e mais elevadas (C) [122]......107

Figura 47: voltamogramas cíclicos registrados para a oxidação de ácido fólico em eletrodo de carbono vítreo (a) não modificado e (b) modificado com  $[(Ni^{II}TRPyP)-\mu-O_2]_n$  em eletrólito NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> antes (—) e após (—) a adição de solução padrão de AF. v: 0,05 V·s<sup>-1</sup>;  $[AF]_a=1,0 x10^{-3} mol·L^{-1}; [AF]_b=2,0 x 10^{-4} mol·L^{-1}......112$ 

Figura 57: Mecanismo de vasorregulação através do transporte NO e suas interações com a hemoglobina
Figura 58: Reação de reticulação de Hb com DBSF133
Figura 59: Reação de PEGlação de Hb e αα-Hb para a formação de Hb-PEG5K <sub>2</sub> e αα-Hb- PEG5K <sub>2</sub>
Figura 60: Reações de reticulação inter tetrâmeros e PEGlação de Hb para a formação de BT-Hb-PEG5K4134
Figura 61: Voltamogramas cíclicos para eletrodos modificados com filmes de Hbs com DDAB em tampão fosfato pH 7 contendo NaBr 50 x $10^{-3}$ mol·L <sup>-1</sup> a velocidade de varredura de 0.1 V·s <sup>-1</sup> : (a) HbA <sub>0</sub> . (b) HbA <sub>2</sub> . (c) HbS. (d) aa-Hb-PEG5K <sub>2</sub> . (e) BT-Hb-PEG5K <sub>4</sub> e (f) Hb-

 $0,1 \ V \cdot s^{-1}$ : (a)  $HbA_0$ , (b)  $HbA_2$ , (c) HbS, (d)  $\alpha\alpha - Hb - PEG5K_2$ , (e)  $BT - Hb - PEG5K_4$  e (f)  $Hb - PEG5K_2$ .

Figura 62: Voltamogramas cíclicos para eletrodos modificados com filmes de Hbs com DDAB na presença de NaNO<sub>2</sub> em concentrações crescentes  $(1,0 \times 10^{-3} \text{ a } 10 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot L^{-1})$  em tampão fosfato pH 7 contendo NaBr 50 x  $10^{-3} \text{ mol} \cdot L^{-1}$ ; velocidade de varredura de 0,1 V·s<sup>-1</sup>: (a) HbA<sub>0</sub>, (b) HbA<sub>2</sub>, (c) HbS, (d)  $\alpha\alpha$ -Hb-PEG5K<sub>2</sub>, (e) BT-Hb-PEG5K<sub>4</sub> e (f) Hb-PEG5K<sub>2</sub>....140

**CAPÍTULO I:** Sistemas Porfirínicos Supramoleculares

#### 1. Metaloporfirinas e Sistemas Supramoleculares

O termo "porfirina" se origina da palavra grega "porphyra" que significa "púrpura" e compreende uma classe de compostos macrocíclicos que possuem uma estrutura composta por quatro anéis pirrólicos ligados por uma ponte metina, de forma que os átomos de nitrogênio são direcionados para o centro, possuindo um sistema eletrônico altamente conjugado, dotado de aromaticidade originada pelo sistema  $\pi$  com 18 elétrons. Além disso, a presença de insaturações no anel porfirínico favorece a adição de substituintes em sua estrutura, nas posições  $\alpha$ ,  $\beta$  e *meso*, indicadas na Figura 1.

Porfirinas e seus macrociclos análogos apresentam um papel muito importante no metabolismo de organismos vivos atuando como sítios ativos de proteínas, cujas funções compreendem transporte e armazenamento de oxigênio, o transporte de elétrons e conversão de energia. Uma característica importante é a facilidade com que as porfirinas formam quelatos com íons de metais de transição, como mostrado na Figura 1 formando complexos porfirínicos de elevada estabilidade.



Figura 1: Anel porfirínico base-livre com indicação das posições onde ocorrem inserção de substituintes e reação geral de coordenação de porfirinas com íons metálicos  $M^{n+}$ . Onde M é o metal e n é sua respectiva carga.

Tomemos como exemplo o complexo porfirínico heme, composto pela protoporfirina IX coordenada ao cátion Fe<sup>2+</sup>, como mostrado na Figura 2. Ele está presente como grupo prostético de proteínas desde organismos unicelulares até organismos mais complexos, como os dos mamíferos, desempenhando papeis essenciais em etapas importantes de processos bioquímicos fundamentais para a manutenção da vida, como a respiração: a partir do momento que inalamos o ar e acontece a troca de gases nos alvéolos pulmonares com a corrente sanguínea, o oxigênio é captado pelo sangue através da hemoglobina presente nas células vermelhas (eritrócitos).



Figura 2: Estruturas do grupo heme e de algumas hemeproteínas de importância biológica. Figura retirada e adaptada das referências [1-4].

A hemoglobina é uma proteína que possui quatro sítios contendo o grupo heme (hemeproteína), responsável por se ligar direta e reversivelmente com o oxigênio, transportando-o pela corrente sanguínea até os outros órgãos. A liberação de  $O_2$  para os tecidos acontece através do efeito Bohr [5, 6], através do qual o grupo heme é afetado pela sinalização promovida pela elevação da concentração de  $CO_2$ , que reage com grupos histidina da cadeia proteica, formando grupos carbamato, liberando prótons, diminuindo o pH nas vizinhanças do grupo heme, desvinculando o  $O_2$  da proteína.

No caso de mamíferos aquáticos, que passam a maior parte do seu tempo submersos, além de transportar oxigênio, precisa estocá-lo nos músculos. Essa função é exercida pela mioglobina, que também é proteína que contém o grupo heme. Embora possua similaridades em suas estruturas, mioglobina e hemoglobina possuem funções diferentes em relação ao mesmo substrato. Uma vez que a interação entre hemoglobina e  $O_2$  é muito mais complexa (como será visto no Capítulo V), a ligação entre eles através do grupo heme é mais lábil, favorecendo o processo de transporte.

Quando a célula precisa de fato utilizar o oxigênio nas mitocôndrias, existe a atuação de outra hemeproteína, a citocromo c, um componente essencial da cadeia transportadora de elétrons do processo de respiração celular, que promove a formação da molécula ATP. Nesse processo, o grupo heme não se liga ao oxigênio, mas sim atua como um aceptor e doador de elétrons. Outras hemeproteínas importantes que desempenham papéis importantes no organismo são o citocromo P450 e a catalase, que participam como catalisadores de reações de oxidação de diferentes substratos, pela transferência eletrônica com o íon ferro.

Todos os exemplos de processos bioquímicos citados dependem intimamente da interação de substratos com o grupo heme, entretanto, o que define que tipo de função ele irá desempenhar é a cadeia proteica, que são distintas em cada macromolécula. A interação entre estas duas subunidades, estruturalmente independentes, promovendo o surgimento de uma

função específica, operando de forma inteligente, é somente um dos casos contemplados pela chamada Química Supramolecular, que é o termo que compreende o estudo de interações, ligações e arranjo moleculares, resultando em sistemas moleculares dotados de complexidade, de modo a gerar propriedades únicas, não encontradas quando um dos componentes está sozinho.

A associação desses componentes pode envolver interações de diferentes naturezas, como ligação de hidrogênio, forças de Van der Walls, interações  $\pi$ - $\pi$ , forças eletrostáticas, coordenação metal-ligante, ou outros mecanismos de associação reversíveis, que promovam labilidade e certo grau de acoplamento eletrônico. Nesse sentido, a Química Supramolecular compreende não somente o entendimento dessas associações, mas também a obtenção de novos sistemas supramoleculares com o objetivo de alcançar propriedades melhoradas e altamente específicas, como automontagem, reconhecimento molecular, transformação, transporte e sinalização. Muitos deles inspirados em sistemas moleculares encontrados na natureza. Um belo exemplo disso são os diversos compostos sintéticos baseados em metaloporfirnas, que vem sendo desenvolvidos a fim de gerar dispositivos moleculares capazes de realizar processos como catálise ou eletrocatálise com elevadas eficiência e seletividade. Uma vez que grande parte dos complexos porfirínicos possui estrutura plana e relativamente rígida, eles podem ser utilizados como blocos construtores em estruturas mais complexas [7].

Sistemas supramoleculares, utilizando arranjos de porfirinas como material de recobrimento de eletrodos, podem ser obtidos por associação por empilhamento  $\pi$ - $\pi$  e arranjos eletrostáticos de porfirinas, como métodos automontagem eletrostática (ELSA) [8]. Um bom exemplo desse caso é a obtenção de filmes de porfirinas substituídas com grupo catiônicos e aniônicos, como o arranjo formado pela porfirina tetrassulfonada de Zn, ZnTPPS, que possui quatro grupos benzil-sulfonato em sua estrutura, e a porfirina tetrarrutenada de cobalto,

CoTRPyP, que possui quatro complexos periféricos de rutênio com bipiridina,  $[Ru(bipy)_2Cl]^+$ , ligados ao anel porfirínico pela coordenação de um grupo piridina como substituintes na posição *meso*. Esse tipo de filme pode ser facilmente construído a partir da imersão de eletrodos em soluções contendo os compostos porfirinícos, de forma alternada [9, 10].

O arranjo eletrostático das suas porfirinas é mostrado na Figura 3a. Esse tipo de abordagem forma filmes estáveis e suas múltiplas camadas podem promover a condução de carga por diferentes processos, como mostrado da Figura 3c: percolação de carga [11] entre os metais centrais e/ou entre os complexos periféricos de rutênio; entre eletrodo e o rutênio via sistema  $\pi$  da porfirina; ou somente pela condução eletrônica do sistema  $\pi$ .

Esse exemplo ilustra a variedade de mecanismos de condução de carga que um sistema supramolecular metaloporfirínico pode estabelecer de forma simultânea. O sistema  $\pi$  anel porfirínico permite uma eficiente condução de carga. O transporte de carga através dos íons metálicos ocorre normalmente por processo de percolação de carga, que é um mecanismo de condução redox, processo que é dependente do potencial aplicado, que será discutido mais profundamente no Capítulo II.

Devido à eficiência na transferência de carga e propriedades eletrocatalíticas, arranjos similares baseados em arranjos eletrostáticos vêm sendo utilizados no desenvolvimento de sensores eletroquímicos, sendo extensivamente utilizadas em aplicações analíticas de diferentes analitos, como sulfito [12], nitrito [12, 13], NADH e dopamina [14], oxigênio [15] e fármacos [2].



Figura 3: (a) Representação estrutural das porfirinas CoTRPyP e ZnTRPyP e respectivo par iônico; (b) voltamogramas registrados para esse filme para redução de  $O_2$  e (c) Mecanismos de transferência de carga dentro do filme eletrostático formado: I) do complexo periférico para o eletrodo via sistema  $\pi$ , II) percolação via metal central, III) percolação via complexos periféricos e IV) condução via sistema  $\pi$  da porfirina. Figura adaptada das referências [7] e [9].

Ainda no contexto do desenvolvimento de eletrodos modificados, metaloporfirinas podem ser utilizadas como componente monomérico de formas poliméricas [16, 17], pela inserção proposital de substituintes constituídos de grupo funcionais polimerizáveis. Uma estratégia bastante utilizada é a eletropolimerização, como ilustrado na Figura 4, que mostra o processo de eletropolimerização exemplo de uma zinco-porfirina modificada com dois grupos N-metil-3-piridiletinil nas posições *meso*. O processo de eletropolimerização nesse caso se da

pela imersão do eletrodo contendo solução da espécie monomérica e aplicação de sucessivos ciclos voltamétricos de 0,4 a -1,6 V.



Figura 4: Eletropolimerização do substituinte N-metil-3-piridiletinil inserido na posição meso de uma zinco-porfirina. Figura adaptada da referência [18].

A transferência nesse caso fica em função do tipo de acoplamento eletrônico entre os ligantes, mais do que os centros metálicos, dependendo da disposição do arranjo polimérico e do seu empacotamento, favorecendo ou não a condução de carga pelo sistema  $\pi$  do anel e dos substituintes, os quais também podem apresentar um centro metálico com ligantes polimerizáveis, aumentando os sítios de transferência de carga, facilitando seu transporte dentro do filme [19, 20]. A polimerização com aumento de conjugação  $\pi$  tende a diminuir a energia entre os níveis eletrônicos HOMO e LUMO, favorecendo a formação de uma banda de condução em toda a cadeia polimérica.

Outra classe interessante de material porfirínico, ou análogo, com características condutoras são os seus polímeros de coordenação, que podem ser formados pela coordenação

axial do metal central pelo ligante de outra subunidade porfirínica vizinha, ou de maneira mais interessante, entre os centros metálicos unidos por outro ligante atuando como uma, conectando eletronicamente as subunidades porfirínicas em um arranjo unidimensional ao longo do eixo de empilhamento, como mostrado na Figura 5. Esse tipo de polímero de coordenação é capaz de atuar como excelentes transferidores de carga, podendo ser utilizados como materiais para recobrimento de eletrodos utilizados em sensores e dispositivos de conversão de energia.



Figura 5: Arranjo unidimensional formado por e metaloporfirinas ligadas pelo ligante em ponte "L", no qual M é o metal central e n é o seu número de oxidação.

A condução de carga nesse material depende, além da contribuição do sistema  $\pi$ , da interação dos orbitais d- $\pi$  do metal com os orbitais  $\pi^*$  do ligante em ponte L, como CN, pirazina e 4,4'-bipiridina [21, 22]. Se o ligante tem característica de doador  $\pi$ , a comunicação entre os metais adjacentes ocorre de maneira eficiente. A banda de condução é formada majoritariamente pelo sistema  $\pi$  dos ligantes, entretanto a interação entre metal e ligante axial pode conferir uma contribuição extra, diminuindo energia entre os níveis HOMO e LUMO. Esse tipo de material pode ser obtido facilmente via síntese química ou processos de eletropolimerização [22, 23].

No caso de porfirinas não planares, e com ligantes em ponte, os polímeros resultantes podem adquirir propriedades ferroelétricas, como esquematizado na Figura 6, que mostra um polímero de coordenação porfirínico com distorção "*bowl-shaped*" (forma de taça), no qual o

metal central é forçado a sair do plano da porfirina por influência do ligante axial, dessa forma, um momento dipolo se origina da separação de cargas entre as subunidades porfirínicas de forma espontânea. A consequência desse processo é o aumento do momento dipolo macroscópico do material, ou seja, a soma dos momentos dipolos induzidos de subunidades monoméricas [24].



Figura 6: Representação da alteração do momento dipolo de um polímero de coordenação porfirínico em resposta a um campo elétrico externo. Figura retirada da referência [25].

Todos esses exemplos ressaltam as potencialidades de sistemas porfirínicos baseados em arranjos supramoleculares na obtenção de novos dispositivos eletroquímicos com novas propriedades, ou com propriedades aprimoradas. O estudo das interações presentes nesses materiais e a sua elucidação estrutural tornam-se importantes para o conhecimento da sua aplicabilidade. No caso específico de eletrodos modificados para aplicação analítica como sensores, sensibilidade e seletividade são características que visam ser melhoradas e são provenientes das propriedades redox desses materiais, que devem ser exploradas no intuito de aperfeiçoamento de sistemas analíticos. **CAPÍTULO II: Fundamentos Teóricos** 

#### 1. Introdução

Nesse capítulo serão apresentados os aspectos teóricos das técnicas utilizadas para a aquisição de informações estruturais e de mecanismos dos sistemas porfirínicos estudados. Primeiramente serão abordados os aspectos eletroquímicos envolvendo mediadores redox em eletrodos quimicamente modificados para aplicação em processos eletrocatalíticos, uma vez que o fenômeno de eletrocatálise está presente em todos os ensaios experimentais presentes nessa tese. Também serão abordados alguns aspectos importantes relacionados à espectroscopia eletrônica de metaloporfirinas, bem como os fundamentos teóricos das técnicas de espectroscopia Raman e ressonância paramagnética eletrônica.

### 2. Eletrodos Quimicamente Modificados, Eletrocatálise e Mediadores Redox: Modelos para Transferência de carga

O surgimento dos chamados eletrodos modificados está relacionado com necessidade de se controlar determinadas propriedades das superfícies, em ordem de melhorar a eficiência de sensores e processos baseados em eletrossíntese ou conversão e armazenamento de energia [26]. Segundo a terminologia adotada pela IUPAC [27], a definição de eletrodo quimicamente modificado é:

> [...] um eletrodo feito de material condutor ou semicondutor que é recoberto com um filme monomolecular, multimolecular, iônico, ou polimérico de um modificador químico adequadamente selecionado, que por meio de reações faradaicas (transferência de carga) ou de diferenças de potencial interfacial (sem transferência de carga líquida), exibe propriedades químicas, eletroquímicas, e/ou ópticas do filme.

Eletrodos modificados podem ser obtidos pela incorporação de materiais específicos, condutores ou não, na superfície eletródica, a fim de conferir as propriedades desejadas. A incorporação desse material pode ser feita de diversas maneiras, dependendo no método de recobrimento da superfície, sendo que os métodos de modificação mais comuns são baseados em processos de quimissorção [28], ligação covalente [29, 30], recobrimento com filme polimérico [31] ou formação de eletrodos compósitos [32].

No caso se sensores eletroquímicos voltamétricos e amperométricos, as características almejadas, como elevadas seletividade e sensibilidade, podem ser adquiridas com eletrodos modificados que utilizam materiais que promovam a eletrocatálise, um processo que pode ser definido como a habilidade de uma substância em acelerar a velocidade de dado processo de oxidação ou redução de outra espécie, aumentado a corrente registrada e consequentemente a sensibilidade, ou favorecer termodinamicamente essa reação de forma a diminuir o sobrepotencial, η, necessário para que ela ocorra, o que tem impacto direto na seletividade.

Num processo eletrocatalítico, a transferência de carga entre o eletrodo e o substrato não é direta, ela é intermediada por um catalisador, também chamado de mediador redox, que é normalmente uma espécie que sofre transformação eletroquimicamente reversível, reagindo quimicamente com o substrato e sendo regenerado continuamente pelo eletrodo num dado potencial, gerando um ciclo eletrocatalítico.

Considerando o par redox reversível O/R como mediador em um eletrodo modificado com um filme fino, formado por uma monocamada fortemente adsorvida na superfície do eletrodo, segundo a Reação 1, abaixo.

$$O + ne^{-} \rightleftharpoons R$$
 (Reação 1)

A resposta voltamétrica de corrente,  $i_0$  é diretamente proporcional à velocidade de varredura, é dada pela Equação 1 abaixo

$$i_0 = \frac{(F^2/RT)\nu l\Gamma^0 exp(-\xi)}{[1 + exp(-\xi)]^2}$$
(Eq. 1)

Onde  $\xi = -\left(\frac{F}{RT}\right) (E - E_{OR}^{0}); E_{OR}^{0}$  é o potencial padrão da redução de O em R, v é velocidade de varredura *F* é a constante de Faraday, *T* é a temperatura, *R* é a constante dos gases,  $\Gamma^{0}$  é o recobrimento superficial correspondente a uma monocamada contendo o mediador redox e *l* é o número de monocamadas. O perfil do voltamograma para essa condição é formado por um conjunto de picos catódico e anódico simétricos, com potencial de pico E<sub>p</sub> coincidindo com E<sup>0</sup>, como mostrado na Figura 7, onde *Q* é a carga transferida, dada pela área sob a curva.



Figura 7: (a) Perfil voltamétrico para filme fino ou monocamada, de comportamento ideal, de um mediador adsorvido irreversivelmente. Figura adaptada da referência [7].

A curva voltamétrica pode sofrer distorções de simetria de picos devido a dois fatores. O primeiro está relacionado com processo de transferência de carga na interface eletrodo/filme que, caso seja suficientemente lenta, será necessária a aplicação de sobrepotencial para efetuar essa transferência, causando as distorções no voltamograma cíclico [33].

O segundo fator está relacionado ao transporte no interior do filme como fator limitante. Esta situação é encontrada normalmente para filmes espessos. Para um filme contendo sítios que promovam mediação de processos redox, como polímero de coordenação porfirínico na superfície de um eletrodo, que se comporta como um polímero redox [26]. Em comportamento não ideal, assume-se que o transporte de carga ao longo desse filme seja um processo de difusão linear semi-infinita [34]. Uma vez que os sítios redox são praticamente fixos no filme, eles não são capazes de difundir de maneira convencional, apesar de possuírem relativa mobilidade dentro do filme. O modelo que descreve a propagação de carga dentro do filme é baseado no mecanismo de percolação de carga, pela transferência eletrônica mútua entre sítios redox adjacentes [7], como mostrado na Figura 8, pelo qual a forma oxidada do mediador atua como um receptor de elétrons da forma reduzida (doador). Esse tipo de modelo obedece à Lei de Fick, onde o coeficiente de difusão de carga dentro do filme. Esse tipo de transporte é acompanhado da difusão de um contraíon associado ao eletrólito, de forma a promover a eletroneutralidade dentro da matriz do filme [27, 35].


Figura 8: Esquema representativo do percurso da transferência de carga envolvendo eletrocatalise heterogênea da redução de A em B. O par R/O é o mediador redox.  $k_{p,A}$  é o coeficiente de partição A entre filme e solução.  $D_{A,f}$  é o coeficiente de difusão de A dentro do filme,  $D_{ct}$  é o coeficiente de difusão de transporte de carga e  $k_{AB}$  é o coeficiente de transferência de carga homogênea entre mediador e substrato dentro do filme.

Nesse caso, o voltamograma apresenta uma "cauda" difusional, e os potenciais de pico anódico,  $E_{p,a}$  e catódico,  $E_{p,c}$ , não coincidindo com  $E_{1/2}$ , como mostrado na Figura 9 e a resposta de corrente,  $i_0$ , é prevista pela equação de Randles-Sevcik e varia com  $v^{1/2}$  [34].

$$i_0 = 2,69 \cdot 10^{-5} n^{3/2} SD_{ct}^{1/2} C_{OR} v^{1/2}$$
 (Eq. 2)

Onde *n* é o número de elétrons, *S* é a área da superfície do eletrodo,  $D_{ct}$  é o coeficiente de difusão de transferência de carga e  $C_{OR}$  é a concentração de espécies eletroativas dentro do filme.

Em experimentos envolvendo voltametria cíclica, o perfil de concentração de espécies eletroativas no interior do filme é dada por  $(D_{ct} RT/F\nu)/d^2$ , onde d é a espessura do filme. No caso de eletrodos suficientemente finos, no qual todos os sítios eletroativos estão em equilíbrio com o potencial de eletrodo,  $(D_{ct} RT/F\nu)/d^2 \gg 1$ , e o perfil voltamétrico se assemelham ao mostrado na Figura 7. Para  $(D_{ct} RT/F\nu)/d^2 \ll 1$ , o voltamograma apresentará o perfil quasi-difusional apresentado na Figura 9, podendo na maioria das situações experimentais apresentar condições intermediárias.



Figura 9: Perfil voltamétrico para eletrodo modificado com filme redox sob condição de difusão semiinfinita de transferência de carga. Figura adaptada da referência [34].

Em relação à transferência de carga entre o filme e o substrato, o tratamento matemático para a corrente em experimentos de voltametria cíclica utilizando processos eletrocatalíticos difere um pouco do tratamento apresentado na equação de Randles-Sevcik, uma vez que esta apenas considera a transferência de carga simples e direta entre eletrodo e substrato. Para o modelo teórico que rege a corrente para voltametria cíclica, consideremos a Reação 1 como etapa eletroquímica e assumamos que a reação eletrocatalítica é de redução de A em B, catalisada pelo estado reduzido do mediador, R. A etapa química do processo são dadas pelas reações a seguir.

$$A + R \rightarrow B + O$$
  $k_1$  (Reação 2)

Onde  $k_1$  é a constante de velocidade de reação de conversão de A em B

Assumindo que a transferência de carga entre o eletrodo e o mediador redox é rápida o suficiente e obedece a lei de Nernst durante a varredura e que a concentração do substrato A é constante ao longo do filme contendo o mediador redox, a corrente total é dada como a soma da contribuição da corrente devido ao mediador redox na superfície do eletrodo na ausência do substrato,  $i_0$ , e da corrente catalítica,  $i_c$ , devido à presença do substrato [33, 36].

$$i = i_0 + i_C \tag{Eq. 3}$$

A corrente  $i_0$  é a mesma dada pela Eq. 1 ou Eq.2 dependendo o tipo de filme, e a corrente catalítica,  $i_c$  é dada pela Equação 4:

$$\frac{i_{C}}{FSC_{A}^{0}D_{A}^{1/2}(F\nu/RT)^{1/2}} = \frac{k_{1}l\Gamma^{0}}{D_{A}^{1/2}(F\nu/RT)^{1/2}} \frac{1}{1 + exp(-\xi)} \left[ 1 - \frac{1}{\pi^{1/2}} \int_{-\infty}^{\xi} \frac{i_{C}}{FSC_{A}^{0}D_{A}^{1/2}(F\nu/RT)^{1/2}} \frac{d\eta}{(\xi - \eta)^{1/2}} \right]$$
(Eq. 4)

Onde  $C_A^0$  é a concentração inicial da espécie A e  $D_A$  é seu o coeficiente de difusão.

Dadas duas condições opostas a equação acima pode ser simplificada:

i) Para valores de v suficientemente elevados e  $k_1$ , l,  $\Gamma^0$  suficientemente pequenos, a equação que define uma onda sigmoidal, possuindo potencial de meia onda  $E_{1/2}$ coincidindo com  $E_{AB}^0$ , pode ser simplificada para:

$$i_{C} = \frac{k_{1} l \Gamma^{0} FSC_{A}^{0}}{1 + exp(-\xi)}$$
(Eq. 5)

ii) Já em situações onde v apresenta valores pequenos e  $k_1$ , l,  $\Gamma^0$  elevados, a equação simplificada descreve o máximo corrente como uma onda em formato de pico.

$$i_{\mathcal{C}} = 0,496 FSC_A^0 D_A^{1/2} (F\nu/RT)^{1/2}$$
 (Eq. 6)

que é muito similar à equação de Randles-Sevicik para processos irreversíveis monoeletrônicos.

O potencial de pico,  $E_P$  é dado por:

$$E_P = E_{OR}^0 - 0.78 \left(\frac{RT}{F}\right) + \left(\frac{RT}{F}\right) ln \left[k_1 l \,\Gamma^0 C_A^0 D_A^{1/2} (F\nu/RT)^{1/2}\right]$$
(Eq. 7)

A equação acima indica que o potencial de pico da onda eletrocatalítica está nas redondezas do potencial padrão do mediador redox.

Analogamente ao tratamento dado à voltametria cíclica, na análise cronoamperométrica de um processo eletrocatalítico, o comportamento da corrente em função do tempo não é regido pela equação de Cottrell. Dessa forma, consideremos novamente as reações 1 e 2. Assumindo que, dado o potencial aplicado, o substrato A é inativo na superfície do eletrodo na ausência do mediador e que a concentração de O na superfície do eletrodo, sob a mesma condição, é igual a zero, a corrente em função do tempo é dada pela seguinte equação:

$$i_{C} = nFSD_{O}^{1/2}C_{O}^{0}\left\{ (k_{1}C_{A}^{0})^{1/2}erf\left[ (k_{1}C_{A}^{0})^{1/2} \right] + \frac{exp(k_{1}C_{A}^{0}t)}{(\pi t)^{1/2}} \right\}$$
(Eq. 8)

Onde *erf* é a função erro Gaussiana que descreve o gradiente de concentração do substrato A nas vizinhanças do eletrodo, na forma de sigmoide [37].

O tratamento pode ser simplificado aplicando a equação de Cottrell para a espécie O.

$$i_l = \frac{nFSD_O^{1/2}C_O^0}{(\pi t)^{1/2}}$$
(Eq. 9)

Dividindo a equação 8 pela 9, temos

$$\frac{i_{C}}{i_{l}} = \gamma^{1/2} \left[ \pi^{1/2} erf(\gamma^{1/2}) + \frac{exp(-\gamma)}{\gamma^{1/2}} \right]$$
(Eq. 10)

Onde  $\gamma = k_1 C_A^0 t$ 

$$\frac{i_C}{i_l} = \pi^{1/2} \gamma^{1/2} = (\pi k_1 C_A^0 t)^{1/2}$$
(Eq. 11)

Que é a equação utilizada para a determinação da constante de velocidade  $k_1$  da reação química de conversão do substrato.

# 3. Estruturas de Porfirinas e Espectroscopia Eletrônica de Absorção

O anel tetrapirrólico da porfirina confere a ela uma elevada aromaticidade e consequentemente um perfil bem característico dos espectros de absorção eletrônica em decorrência das transições  $\pi \rightarrow \pi^*$ , caracterizado pela absorção em duas regiões de

comprimento de onda: A banda Soret, de elevada absortividade molar ( $\varepsilon$  da ordem de 10<sup>5</sup> mol·L<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>), que ocorre geralmente nas regiões entre 380 e 420 nm; e as bandas Q, que ocorrem na faixa de 500 a 800 nm ( $\varepsilon$  da ordem de 10<sup>4</sup> mol·L<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>).

Esse conjunto de bandas é resultado das transições eletrônicas dos orbitais moleculares HOMO,  $a_{1u} e a_{2u} (\pi)$ , para dois orbitais LUMO degenerados,  $e_g (\pi^*)$ . Essas transições são bem descritas pelo modelo de quatro orbitais de fronteira de Gouterman [38], representado na Figura 10. Esse modelo considera que as transições  $a_{1u} \rightarrow e_g e a_{2u} \rightarrow e_g$ possuem energias similares e são degeneradas.



Figura 10: Representação dos orbitais moleculares HOMO  $(a_{1u} e a_{2u}) e LUMO (e_g)$  para sistemas pofirínicos de acordo com o modelo de quatro orbitais de Gouterman. As cores azul e vermelho representam os sinais das funções de onda.

Para uma porfirina coordenada a um íon metálico, de simetria  $D_{4h}$ , as bandas Q são atribuídas às transições do estado  $a_{1u}$  para diferentes níveis vibracionais, 0 e 1, do estado eletrônico excitado  $e_g$  como mostrado na região à esquerda da Figura 11. No caso de uma porfirina base livre, a presença dos dois prótons origina em simetria é menor da molécula,  $D_{2h}$ , e possui os orbitais HOMOs  $a_{1u}$  e  $b_{1u}$  (sendo a energia do orbital  $b_{1u}$  superior à do  $a_{1u}$ ), e orbitais LUMOs  $b_{2g}$  e  $b_{3g}$  (sendo o primeiro o de menor energia). Como resultado dessa perda de simetria, originam-se quatro bandas Q por causa do desdobramento dos orbitais  $e_g$  nos orbitais  $b_{2g}$  e  $b_{3g}$ , possuindo os níveis vibracionais 1 e 0 cada um, como mostrado no diagrama da Figura 11.



Figura 11: Diagramas de energia para as transições eletrônicas referentes ao anel porfirínico com diferentes simetrias:  $D_2h$  (base livre) e  $D_4h$  (coordenada).

A coordenação de porfirinas com íons metálicos pode ser facilmente identificada no espectro eletrônico, em decorrência da mudança de simetria do macrociclo de  $D_2h$  para  $D_4h$ , alterando a disposição dos orbitais moleculares e o número de bandas Q. O deslocamento da

banda Soret também é uma característica da coordenação de metais no anel porfirínico. Esse deslocamento é oriundo das interações dos orbitais d $\pi$  do metal com o orbital  $\pi^*$  da porfirina. Metais com configuração de camada aberta, d<sup>m</sup> (m = 6-9), causam um deslocamento para menores comprimentos de onda, ou para o azul (deslocamento hipsocrômico), pela interação de orbitais d preenchidos que aumentam a energia do orbital  $\pi^*$ . Já metais de camada fechada, ou seja, com configuração d<sup>0</sup> e d<sup>10</sup>, como o Zn<sup>2+</sup> por exemplo, afetam pouco a energia entre os orbitais do sistema  $\pi$  da porfirina, entretanto podem causar perturbações, aumentando a energia do orbital  $a_{2u}$ , promovendo um deslocamento para maiores comprimentos de onda, em direção ao vermelho (deslocamento batocrômico). A Figura 12 mostra os espectros eletrônicos com deslocamento batocrômico da banda Soret ocasionado pela coordenação de Zn<sup>2+</sup> à tetrakis(N-metil-4'piridil) porfirina (TMPyP). Também é possível observar a redução do número de bandas Q relativa à mudança de simetria da porfirina [39].



Figura 12: Efeito da coordenação de metais no anel porfirínico. Os espectros mostram a variação das bandas Soret e Q para  $H_2TMPyP$  (—) e ZnTMPyP (—), Figura adaptada da referência [39].

A presença de um sistema pi aromático deixa a porfirina susceptível a interações intermoleculares do tipo  $\pi$ - $\pi$ , formando agregados cofaciais, de forma que há também interação entre os orbitais, diminuindo a energia das transições  $\pi \rightarrow \pi^*$ , causando também um deslocamento batocrômico [40, 41].

# 4. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica utilizada para caracterização de uma grande variedade de espécies químicas. Ela é baseada no efeito Raman, que descreve o fenômeno de espalhamento inelástico de radiação eletromagnética pela matéria. Basicamente, uma radiação monocromática laser incide em uma amostra de interesse, ocorre interação do feixe com a amostra e o espalhamento de radiação em todas as direções. A maioria da radiação espalhada possui a mesma energia que o feixe inicial (espalhamento elástico), e uma pequena fração (0,001%) é espalhada inelasticamente devido à interação com a amostra, caracterizando o espalhamento Raman. Desse tipo de espalhamento são obtidas informações vibracionais e rotacionais da molécula [42].

A natureza da interação que leva ao espalhamento Raman está relacionada com a interação do campo elétrico incidente, E, com a nuvem eletrônica de moléculas na amostra analisada. A presença desse campo elétrico tem capacidade de distorcer a nuvem eletrônica distribuída em torno de uma ligação na molécula, induzindo a formação de um momento dipolo,  $\mu$ , que é decomposto em dois componentes: um que oscila na mesma frequência do campo elétrico e outro componente que oscila de acordo com as energias vibracionais da molécula. A facilidade com que o campo elétrico incidente tem de deformar a nuvem eletrônica é definida como polarizabilidade,  $\alpha$ , que define a relação entre momento dipolo elétrico induzido na molécula e o campo elétrico [43].

$$\mu = \alpha E \tag{Eq. 12}$$

A excitação em decorrência da radiação incidente promove o elétron a um estado de energia que é basicamente a soma de sua energia inicial e a energia fornecida durante a excitação. Como esse novo estado de energia depende essencialmente da energia do laser e não é necessariamente um estado de energia possível, esse estado é chamado de estado virtual de energia [44]. Como a molécula não pode permanecer num estado virtual de energia, ela imediatamente decai a níveis menos energéticos e consequentemente, emitindo um fóton com energia correspondente a esse decaimento.

Conforme mostrado na Figura 13, se o fóton emitido possui mesma energia que o fóton incidente,  $hv_0$ , significa que a molécula retornou ao seu nível de energia inicial,  $E_g$ , caracterizando o espalhamento elástico (espalhamento Rayleigh).



Figura 13: Representação esquemática das transições vibracionais referentes aos espalhamentos: elástico (Rayleigh) e inelástico (Stokes e anti-Stokes).

Se o fóton colide com a molécula, passando de um estado fundamental para o virtual e, após o decaimento, retorna para um estado de energia vibracional maior que o inicial  $E_m$ , o fóton espalhado terá energia menor que a radiação incidente ( $E = hv_0 - hv_m$ ), caracterizando o espalhamento Raman Stokes. Entretanto, no caso de uma molécula que já se encontra em um estado vibracional excitado, devido à energia térmica e, após a excitação, retorna ao estado fundamental, o fóton espalhado possui energia maior que a radiação incidente ( $E = hv_0 + hv_m$ ), definindo o espalhamento Raman anti-Stokes.

Os espectros Raman são apresentados como a relação entre intensidade versus uma grandeza relacionada à energia (usualmente número de onda,  $\tilde{v}$ , em cm<sup>-1</sup>), como mostrado na Figura 14 e podem ser registrados em uma grande faixa de energia (4000 a 10 cm<sup>-1</sup>). Geralmente, os espalhamentos Raman são registrados apenas ao lado de baixa energia, ou seja, pelos espalhamentos Stokes, entretanto, no caso de amostras que proporcionem interferência por fluorescência, por exemplo, o registro dos espelhamentos anti-Stokes é preferencialmente utilizado.



Figura 14: Representação dos espalhamentos Rayleigh, Raman Stokes e anti-Stokes, com excitação em 1064 nm. Figura adaptada da referência [45].

A versatilidade da espectroscopia Raman permite a análise de amostras em vários estados físicos, tanto em solução quanto na forma sólida ou de vapores, partículas microscópicas ou filmes alocados em superfícies, o que faz dessa técnica uma excelente ferramenta para caracterização de eletrodos modificados.

## 5. Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

A espectroscopia de ressonância magnética eletrônica é uma técnica que permite a detecção de espécies paramagnéticas de forma qualitativa e quantitativa, complexos de metais de transição, estados tripleto de moléculas com estados fundamentais singlete, radicais livres,

ou outras espécies intermediárias de reações, possibilitando a obtenção de informações sobre mecanismos de reações.

A técnica é baseada na absorção de energia de micro-ondas (1-100 GHz) por uma espécie química em um dado campo magnético externo oscilante aplicado. Quando um composto contendo um elétron desemparelhado é colocado sob a influência de um campo magnético B, o spin desse elétron pode se alinhar de duas formas diferentes (Efeito Zeeman), criando dois estados de spin (ms =  $\pm 1/2$ ). O alinhamento pode ser ao longo da direção do campo magnético, que corresponde ao estado de menor energia (ms = -1/2) ou aposto à direção do campo (ms =  $\pm 1/2$ ), correspondendo ao estado de energia mais elevado, conforme ilustrado no diagrama da Figura 15. Quando a diferença de energia entre os dois níveis eletrônicos,  $\Delta E$  se iguala a energia da radiação de micro-ondas incidente, hv (condição de ressonância), ocorre absorção de energia, que é dada por:

$$\Delta E = h\nu = g_e \cdot \beta \cdot B \tag{Eq. 13}$$

Onde *h* é a constante de Plank (6,626 x  $10^{-34}$  J·s), *v* é a frequência da radiação incidente,  $g_e$  é fator de desdobramento espectroscópico do elétron, geralmente possui o valor de 2,0023, entretanto, esse valor muda de acordo com as condições experimentais, o valor efetivo é dado por  $g_e = hv/\beta B$  e  $\beta$  é magneton de Bohr (9,274 x  $10^{-24}$  J·T<sup>-1</sup>) [46].



Figura 15: (a) Diagrama esquemático ilustrando a transição de ressonância magnética na frequência v e campo B para elétron L=0, S=1/2. (b) Desdobramento hiperfino para spin nuclear I igual a 1.

Por causa da interação do momento magnético eletrônico com o momento magnético dos núcleos da molécula analisada, origina-se o desdobramento hiperfino. Como consequência, sinal relativo à absorção no espectro também sofre desdobramento em linhas espectrais adicionais (linhas hiperfinas). O número de linhas originadas da interação com um núcleo depende do spin nuclear, I, que pode possuir valores inteiros ou semi-inteiros. Para um núcleo com spin I, se origina 2I + 1 linhas hiperfinas, por exemplo, para um núcleo com spin igual a 1, tem-se três projeções de spin: -1, 0 e 1, como ilustrado Figura 15b. A energia referente às linhas é dada por:

$$\Delta E = h\nu = g_e \cdot \beta \cdot B \pm \frac{1}{2}A m_I \tag{Eq. 14}$$

Onde *A* é constante hiperfina, dada em unidades de número de onda (cm<sup>-1</sup>) ou e unidades de campo magnético A/gB (G) e  $m_I$  são os possíveis valores de *I*.

A constante hiperfinas é um dos parâmetros fundamentais no reconhecimento de espécies químicas através da análise dos espectros EPR, uma vez que cada espécie paramagnética possui seu próprio conjunto de linhas hiperfinas e respectivos valores de A.

No caso de espécies com tempos de vida muito curtos, normalmente intermediários de reações químicas, como espécies radicalares, a análise por EPR se torna dificultada devido ao tempo de realização do experimento. Dessa forma, algumas abordagens são utilizadas para diminuir os tempos de decaimento dessas espécies. A mais conveniente e simples são as reações "*spin trap*" que são baseadas na reação da espécie de interesse com outro reagente, de forma a gerar um aduto radicalar mais estável. Assim, a análise é baseada qualitativamente no desdobramento hiperfino desse aduto. Um exemplo clássico é o método de detecção de radicais hidroxil por reação com 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO), mostrada na Figura 16, de forma que o aduto formado possui tempo de vida de pouco mais de 2 horas e constante hiperfina de 15,01 G [47-49].



Figura 16: Formação do aduto DMPO/•OH

CAPÍTULO III: Caracterização do Filme Eletroquimicamente Gerado a Partir de Porfirina Tetrarrutenada de Níquel em Meio Alcalino

#### 1. Introdução

## 1.1. Considerações iniciais

A motivação do estudo abordado nessa tese é inspirada nos primeiros estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa envolvendo a formação de um filme eletroquimicamente ativo [50], gerado a partir do tratamento eletroquímico de eletrodo de carbono vítreo com a porfirina  $\mu$ -meso-tetra(4-piridil)porfirinatoniquel(II)-tetrakis[bis(piridina)-(cloro)rutênio(II), ou simplesmente [Ni<sup>II</sup>TPyP{Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl}<sub>4</sub>]<sup>4+</sup>, cuja estrutura é apresentada novamente na Figura 17 a seguir.



Figura 17: estrutura do cátion  $\mu$ -meso-tetra(4-piridil)porfirinatoniquel(II)-tetrakis[bis(piridina)-(cloro)rutênio(II), [Ni<sup>II</sup>TPyP{Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl}<sub>4</sub>]<sup>4+</sup>

O filme porfirínico foi gerado a partir do tratamento eletroquímico por ciclagem voltamétrica utilizando eletrodo de carbono vítreo imerso em solução do composto em meio alcalino (pH = 13), de 0 a 0,9 V, como mostra o voltamograma cíclico da Figura 18a, apresentando picos de oxidação e de redução bem característicos durante o processo de crescimento do filme respectivamente, sendo a corrente de pico diretamente proporcional à velocidade de varredura v. Além disso, o eletrodo modificado com esse filme foi aplicado com sucesso na quantificação voltamétrica e amperométrica de carboidratos através de sua oxidação eletrocatalítica mediada pelo par Ni<sup>III</sup>/Ni<sup>II</sup> (Figura 18b).



Figura 18: (a) Voltamogramas cíclicos registrados para um eletrodo de carbono vítreo em NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> +  $[Ni^{II}TPyP{Ru^{II}(bipy)_2Cl}_4]^{4+}$  5,0 x 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup>, durante o processo de eletropolimerização do complexo porfirínico, de 0 a 0,9 V (vs Ag/AgCl(KCl<sub>sat</sub>)) à velocidade de varredura de 0,1 V·s<sup>-1</sup>; 40 ciclos. (b) Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo modificado em solução de NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> na presença de frutose (0 a 6,9 x 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup>) velocidade de 0,01 V·s<sup>-1</sup>. Figura adaptada da referência [50].

Apesar do bom desempenho como sensor eletroquímico, poucos estudos foram conduzidos no que diz respeito à caracterização química do material depositado na superfície do eletrodo. Ainda assim, algumas observações levaram a questionamentos em relação à sua composição química. Ou seja, o filme derivado porfirínico foi considerado como sendo de natureza polimérica, embora apresentasse em seus voltamogramas, similaridades com eletrodos de α-Ni(OH)<sub>2</sub>, não sendo descartada a hipótese da formação do composto iônico através da degradação do complexo. Em contrapartida, foi constatada por voltametria cíclica, a co-deposição do ligante macrocíclico porfirínico pela presença dos sinais característicos do par redox Ru<sup>III</sup>/Ru<sup>II</sup> presente nos complexo periféricos, com oxidação em 0,79 V e redução em 0,70 V, aproximadamente. Além disso, a necessidade de se estender a varredura a potenciais acima 0,82 V para a formação do filme também gera dúvidas, uma vez que foi atribuída, embora sem comprovação, à formação de espécies radicalares decorrente de processos envolvendo os sítios de rutênio. Tal fato nos remeteu a buscar informações sobre qual é o papel desses sítios para a formação do filme derivado dessa porfirina supramolecular em particular.

Devido a esses questionamentos, significativa parcela dessa tese foi dedicada a buscar melhor entendimento sobre a composição química desse material e do seu mecanismo de formação. Neste capítulo, serão abordadas as diferenças entre os resultados encontrados em estudos da literatura para sistemas similares, que dão suporte tanto para a formação de compostos poliméricos quanto para a formação de hidróxido de níquel. Para uma análise mais detalhada, também será abordada a eletroquímica de sistemas contendo Ni(OH)<sub>2</sub>, sobretudo ao que se refere à distinção entre as diferentes fases morfológicas, o que servirá, mais adiante, como base para uma análise comparativa.

#### 1.2. Eletroquímica envolvendo Ni(OH)<sub>2</sub>

A eletroquímica relativa ao  $Ni(OH)_2$  é relativamente complexa, entretanto, bem conhecida e difundida, uma vez que esse material é muito utilizado para a aplicação em ânodos de baterias [51]. Entender o seu comportamento eletroquímico é de grande importância, visto que todos os materiais depositados em eletrodos a partir de complexos macrocíclicos de níquel em meio alcalino apresentam características similares.

Os processos redox do hidróxido de níquel são acompanhados por mudanças estruturais significativas a níveis cristalográficos. Basicamente, o Ni(OH)<sub>2</sub> possui uma célula unitária do tipo brucita, com lamelas distribuídas ao longo do eixo cristalográfico *c*, sendo que, dependendo da organização e empacotamento dessas lamelas, é possível obter duas estruturas morfológicas distintas: A forma  $\alpha$ , que possui as lamelas em maior grau de desordem e também maior distância interlamelar (8,0 Å) do que o da forma  $\beta$  (4,6 Å) que, por sua vez, apresenta um empacotamento mais ordenado em relação ao eixo *c* [52, 53].

Durante os processos eletroquímicos, cada uma das formas polimórficas do hidróxido metálico originam produtos distintos: no processo de oxidação do  $\alpha$ -Ni(OH)<sub>2</sub> forma-se o  $\gamma$ -NiOOH e, em contrapartida, durante a oxidação do  $\beta$ -Ni(OH)<sub>2</sub>, é gerado o  $\beta$ -NiOOH, de forma que ambas as formas oxidadas possuam distâncias interlamelares similares às respectivas formas reduzidas. Os processos de oxidação e redução do Ni(OH)<sub>2</sub> são sumarizados no diagrama da Figura 19.



Figura 19: Diagrama de Bode ilustrando as mudanças estruturais durante os processos de oxirredução envolvendo Ni(OH)<sub>2</sub> e NiOOH em suas diferentes formas polimórficas.

A distância interlamelar nas estruturas de Ni(OH)<sub>2</sub> é um parâmetro importante para a distinção entre as duas fases. Considerando que o espaço interlamelar é preenchido por água e íons, quanto maior esse espaçamento, maior a facilidade de difusão iônica e também maior a exposição de sítios ativos, permitindo a entrada de íons entre as estruturas lamelares, a fim de promover a compensação de carga decorrente da saída de prótons durante o processo de oxidação. Esse processo que é extremamente facilitado para α-Ni(OH)<sub>2</sub>. Em contrapartida, essa compensação de carga é mais dificultada para a fase β, que não possui espaçamento lamelar suficiente para acomodar grande quantidade de íons. Tal fato acarreta em comportamentos voltamétricos distintos cada forma, para como observado nos voltamogramas cíclicos da Figura 20a.



Figura 20: (a) Voltamogramas cíclicos e (b) respectivas curvas eletrogravimétricas registrados para filmes de hidróxido de níquel nas formas  $\alpha \in \beta \in KOH \ 1 \mod L^{-1}$ , velocidade de varredura de 10  $mV \cdot s^{-1}$ . Figura retirada da referência [54].

A capacidade de acomodação de íons confere uma maior capacidade de carga específica para a forma  $\alpha$ , devido à maior quantidade de carga envolvida no processo de oxidação em relação ao mesmo processo para a forma  $\beta$ , exibindo picos de oxidação e redução bem definidos. Além disso, pode ser observado um menor espaçamento entre picos para a forma  $\alpha$  ( $\Delta E_p = 75$  mV) do que para a forma  $\beta$  ( $\Delta E_p = 118$  mV), revelando também uma melhor reversibilidade dos processos redox para a primeira [54].

Outra maneira de fazer a distinção entre as duas formas de hidróxido de níquel é através do uso da microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (EQCM), pela qual é possível verificar as variações de massas durante os processos redox do par Ni<sup>III</sup>/Ni<sup>II</sup>, como observado nas curvas eletrogravimétricas apresentadas na Figura 20b. Dessa forma, é possível

observar que, durante o processo de oxidação na forma  $\alpha$ , ocorre um ganho de massa, explicado pelo processo de acomodação de íons K<sup>+</sup> no espaço interlamelar, que possui massa muito maior que o H<sup>+</sup> cedido durante a oxidação. Enquanto que para a forma  $\beta$ , somente é observada uma perda de massa devido à perda do próton.

Adicionalmente, a forma  $\alpha$  possui menor estabilidade e tende a se transformar na forma  $\beta$  através de processo de envelhecimento ou através de sucessivos ciclos de carga e descarga, processo no qual é possível observar gradativa diminuição na capacidade de carga, deslocamento dos picos de oxidação e redução para potenciais mais positivos, e alteração no perfil eletrogravimétrico até a conversão completa da forma  $\alpha$  para a forma  $\beta$  [55].

O oxo-hidróxido de níquel (NiOOH) na fase  $\beta$  também pode ser convertido irreversivelmente na fase  $\gamma$  durante um processo de sobrecarga, provocando estresse mecânico em sua estrutura e causando danos à estrutura do filme eletródico, visto que ocorre uma variação mais agressiva nas distâncias interlamelares (de 4,6 Å para 8,0 Å)

# 1.3. Filmes eletródicos derivados de Complexos Macrocíclicos N<sub>4</sub> de Níquel: Aspectos históricos

A modificação de eletrodos com complexos macrocíclicos de níquel por tratamento eletroquímico em meio alcalino vem sendo reportada na literatura científica desde 1982 [56], sendo alvo de estudos de aplicação na oxidação de vários substratos, tais como alcoóis [57-61], carboidratos [62], óxido nítrico [63-65], hidrazina [66], peróxido de hidrogênio [67], dopamina [68], derivados fenólicos [69-74] e nitrito [75]. Entretanto, a caracterização do material formado sobre a superfície eletródica foi pouco estudada até então, sendo os resultados apresentados pouco conclusivos ou até mesmo contraditórios.

Nos trabalhos abordados na literatura, os filmes derivados de complexos  $N_4$  de níquel compreendem essencialmente três tipos de macrociclos: tetra-aza, porfirinas e ftalocianinas, podendo apresentar diferentes substituintes. As estruturas básicas dos complexos são ilustradas na Figura 21 a seguir.



Figura 21: Estruturas básicas dos complexos macrocíclicos de níquel(II) precursores de filmes eletródicos em meio alcalino.

Em um dos primeiros estudos, Issahary e colaboradores utilizaram um complexo de Ni<sup>II</sup> com o ligante 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-5,7-dionato (dioxocyclam) [56]. Durante os experimentos de modificação eletródica, foi observado um produto precipitado na superfície do eletrodo de platina quando o pH do eletrólito era maior que 10,5, e pela aplicação de potenciais constantes maiores que 1,0 V (*vs* ECS), sendo esse produto dissolvido na superfície em pH  $\leq$  9. Nesse trabalho, os picos referentes ao par redox reversível Ni<sup>III</sup>/Ni<sup>II</sup> foram atribuídos a seus respectivos hidróxidos e óxidos, provavelmente formados devido à alcalinidade do eletrólito. Entretanto, medidas de espectroscopia Auger do eletrodo indicaram não só a presença de átomos de níquel, mas também de nitrogênio, provenientes do ligante

macrocíclico, não havendo evidências sobre a ocorrência de modificação ou demetalação do complexo durante o processo de modificação.

Em um trabalho de 1992, Roslenek e colaboradores utilizaram a voltametria cíclica e espectroscopia de absorção para estudar a oxidação de alcoóis utilizando filmes eletródicos derivados de complexos de níquel(II) com três ligantes tetra-aza macrocíclicos, realizando suposições sobre a composição dos filmes [59]. Tais filmes eram gerados em superfície de eletrodo de carbono vítreo imerso em soluções dos complexos em meio alcalino e submetidas a ciclos voltamétricos de 0 a 0,6 V (*vs* ECS). Além disso, nesse trabalho, os autores empregaram a espectroscopia eletrônica de absorção para análise do complexo dissolvido em soluções eletrolíticas de NaOH e NaClO<sub>4</sub>. Através da comparação entre os espectros, foi sugerido que uma espécie de geometria octaédrica era formada em meio alcalino pela coordenação de íons OH<sup>-</sup> nas posições axiais do complexo de níquel. A presença de íons OH<sup>-</sup> no meio também foi considerada importante para a formação de radicais hidroxil durante o tratamento eletroquímico, de forma que a geração de tais espécies permitiria a ligação entre a superfície eletródica e o complexo através da formação de grupos funcionais na superfície "S" do eletrodo, se ligando ao complexo a partir de pontes μ-oxo (S-O-Ni).

Em um posterior estudo comparativo [76], a oxidação de metanol foi conduzida utilizando eletrodos modificados com o filme derivado do mesmo complexo e também com filme de  $\beta$ -Ni(OH)<sub>2</sub>, resultante de precipitação de  $\alpha$ -Ni(OH)<sub>2</sub> após a imersão em soluções de Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e NaOH seguido por processo de envelhecimento. Os voltamogramas resultantes indicaram que, sob as mesmas condições experimentais, a oxidação de metanol utilizando o filme derivado do complexo ocorria em potencial 0,1 V menor, e gerando corrente de oxidação cerca 5 vezes maior do que quando utilizado o eletrodo modificado com filme de Ni(OH)<sub>2</sub>. Portanto, tais diferenças seriam decorrentes de distinções estruturais entre os filmes,

e que a hipótese de formação de Ni(OH)<sub>2</sub>, a partir da degradação do complexo de níquel, seria pouco provável, dada a elevada estabilidade do composto (log K = 20,1).

Em decorrência dessa análise, um experimento do mesmo grupo foi conduzido para a caracterização de filmes derivados dos complexos 2-metil-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano níquel(II) e 2,3,5,5,7,12,14,14-octametil-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecan-1,3,7,11-tetrano níquel(II) em eletrodo de ouro [77]. Nesse estudo, os filmes foram analisados através de medidas espectroeletroquímicas utilizando espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS), explorando a região de potencial de -0,20 a 0,45 V, de forma que espectros dos filmes foram monitorados em função de cada potencial.

Pela interpretação dos espectros SERS, os autores indicaram a ausência de evidências que suportem a hipótese de formação de Ni(OH)<sub>2</sub> na superfície de ouro, atribuindo as principais bandas observadas em 480 e 570 cm<sup>-1</sup>, as quais modulavam sua intensidade em função do potencial aplicado, aos estiramentos simétrico e assimétrico de vibrações O-Ni<sup>III</sup>-O, sugerindo que o material depositado no eletrodo era composto de complexos cujos centros de níquel eram interconectados por pontes do tipo μ-oxo.

Baseado em dois trabalhos complementares de 1995, Cataldi [57, 62] estudou o comportamento eletroquímico do filme derivado do complexo tetrametil-dibenzo-tetraaza[14]anuleno níquel(II). Nesse caso, a modificação se processa em duas etapas: a primeira em meio de diclorometano, pela aplicação de ciclos voltamétricos de -0,2 a 1,5 V (*vs* ECS) para prévia eletropolimerização a partir do ligante. Na segunda etapa, o eletrodo foi imerso em solução de NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> e submetido a ciclos voltamétrico de 0,1 a 0,7 V (*vs* ECS), nos quais foi possível observar o crescimento dos picos característicos do par Ni<sup>III</sup>/Ni<sup>II</sup> com picos de oxidação e de redução em 0,464 e 0,384 V, respectivamente.

Embasado em resultados de espectroscopia fotoeletrônica de raios-X, Cataldi sugeriu que as ligações Ni-N eram quebradas durante o processo de ciclagem voltamétrica em meio alcalino, com concomitante formação de microestruturas porosas no eletrodo de carbono vítreo, no qual espécies de Ni(OH)<sub>2</sub> eram confinadas no substrato. Através de medidas de variação do potencial de pico em função do pH do eletrólito, também foi sugerido que o hidróxido de níquel, formado durante o processo eletroquímico, se encontraria na fase  $\alpha$ , uma vez que os potenciais dos processos redox na fase  $\beta$  são, segundo Cataldi, insensíveis às variações de pH do meio.

Após esses primeiros estudos, durante período de mais de uma década (1996-2012), vários outros trabalhos reportados na literatura utilizaram filmes similares para aplicações analíticas baseada na oxidação eletrocatalítica de analitos, sendo estes filmes majoritariamente derivados de complexos de ftalocianinas [60, 63, 64, 68, 69, 71-75, 78-80], porfirinas [58, 65, 70, 81, 82] e tetra-aza macrociclos [66, 67, 83]. Todos estes evidenciando a formação de um filme de natureza polimérica, com a formação de pontes μ-oxo interconectando os centros metálicos como mostrado na Figura 22, entretanto, sem a apresentação de estudos de caracterização consistentes que suportassem tal hipótese. Nesse sentido, são poucos os trabalhos na literatura que abordam a caracterização mais elucidativa da composição química dos filmes em questão.



Figura 22: Representação esquemática do suposto filme composto por pontes  $\mu$ -oxo conectando os complexos de níquel com ligantes N<sub>4</sub>: ftalocianina, porfirina ou tetra-aza macrociclos.

Em 2005 e 2006, Perez-Morales conduziu dois estudos sobre o efeito catalítico de eletrodos modificados com porfirina tetrassulfonada de níquel (NiTSPP) [84, 85]. Utilizando técnicas espectroscópicas de absorção eletrônica e reflectância no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) em eletrodos de óxido de índio dopados com estanho (ITO) modificados, foi detectada a presença de estiramentos referentes aos grupos Ni-OH em 472 cm<sup>-1</sup>, atribuídos à formação de  $\beta$ -Ni(OH)<sub>2</sub> com co-deposição do ligante na forma de cátion-radical, descartando a existência de pontes Ni-O-Ni no filme eletródico.

Utilizando uma ftalocianina análoga, em 2007, Ureta-Zañartu empregou ECQM para averiguar as variações de massas durante os processos redox envolvendo o par Ni<sup>III</sup>/Ni<sup>II</sup> nos filmes em pH 11 [60], tendo sido observada significativa perda de massa durante a oxidação. Tal comportamento não pôde ser atribuído à presença de Ni(OH)<sub>2</sub>, já que, para a fase  $\alpha$ , o processo acarreta em ganho de massa devido à inserção de cátion no espaço interlamelar. Além disso, a perda de massa observada não era compatível com a perda protônica esperada para a fase  $\beta$ . Dessa forma, o decréscimo observado foi atribuído unicamente à expulsão de moléculas de água, indicando que, no estado oxidado, o filme teria elevada hidrofobicidade, embora o complexo apresentasse grupos sulfonados em sua estrutura.

Entre 2007 e 2009, Berríos e colaboradores [70, 82, 86], através de estudos envolvendo espectroscopias fotoeletrônica de raios-X (XPS), eletrônica, e de impedância eletroquímica (EIS), exaltaram as controvérsias indicadas na literatura, apontando para o fato de existirem discrepâncias entre os filmes de Ni(OH)<sub>2</sub> e os derivados de complexos porfirina e ftalocianina, principalmente no que se refere às mudanças estruturais em função do tempo, que seriam muito mais lentas no último tipo. Dessa forma, ocorrendo de forma diferente à que ocorre com o processo de envelhecimento em eletrodos de hidróxido de níquel, muito embora os autores julgassem, como produto final, a formação de agregados de Ni(OH)<sub>2</sub> a partir da demetalação dos macrociclos.

Em contrapartida, o mesmo grupo conduziu o desenvolvimento de um estudo teórico, utilizando método de Monte Carlo, para filmes crescidos em superfície de carbono vítreo, predizendo os valores de energia de interações superfície-complexo e complexo-complexo, para sistemas teóricos envolvendo pontes do tipo µ-oxo (Ni-O-Ni), µ-hidroxo (Ni-OH-Ni) e interações sem ponte, de forma que os sistemas contendo pontes µ-oxo seriam os mais estáveis e mais prováveis, uma vez que geram elevada estabilização de carga, sendo este o melhor sistema para promover a transferência eletrônica em um processo catalítico.

#### 2. Objetivos

A composição química do filme eletródico derivado de [Ni<sup>II</sup>TPyP{Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl]<sub>4</sub>]<sup>4+</sup> em meio alcalino não é precisamente conhecida. Além disso, a inconsistência sobre a composição de filmes similares, discutida no capítulo II, não permite a analogia ou extensão de conceitos para uma melhor compreensão desse sistema eletroquímico. Visto isso, o objetivo dos estudos descritos neste capítulo é a caracterização química do material depositado na superfície de eletrodo de carbono vítreo após o processo de modificação com [Ni<sup>III</sup>TPyP{Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl]<sub>4</sub>]<sup>4+</sup>. Nesse estudo, será abordada, de forma detalhada, a busca de informações que possibilitem a elucidação de formação dos depósitos, explorando as técnicas de Voltametria Cíclica, Espectroscopia de Absorção e Refletância na região UV-Vis, Ressonância Paramagnética Eletrônica, Espectroscopia Raman com comparação com modelo simulado e Espectroeletroquímica. Além das técnicas instrumentais, algumas observações realizadas durante os experimentos servirão de base para a interpretação dos resultados.

#### 3. Parte Experimental

#### 3.1. Reagentes e Soluções

Metanol, hidróxido de sódio, ferrocianeto de potássio e ferricianeto de potássio em alto grau de pureza foram obtidos da Merck. Suspensões aquosas de alumina (de granulometrias 1,0, 0,3 e 0,5  $\mu$ m) para polimento de eletrodo foram adquiridas da Arotec. Dimetil sulfóxido (DMSO) e 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, sendo este purificado por destilação a pressão reduzida, como recomendado para seu uso em espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica [87]. Os complexos porfirínicos  $\mu$ -meso-tetra(4-piridil)porfirinatoniquel(II)-tetrakis[bis(piridina)-(cloro)rutênio(II) (CF3SO3)<sub>4</sub>, [Ni<sup>II</sup>TPyP{Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl}<sub>4</sub>]<sup>4+</sup> e 5, 10, 15, 20-tetrakis(4-

sulfonatofenil)porfirinatozinco(II), Na<sub>4</sub>[ZnTPPS], foram sintetizados e caracterizados no Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia (LQSN), Instituto de Química da USP, de acordo com os procedimentos descrito na literatura [88].

Todas as soluções foram preparadas utilizando água purificada em sistema Millipore Milli-Q (resistividade  $\geq$  18,2 M $\Omega$  cm).

## 3.2. Instrumentação

## 3.2.1 Voltametria Cíclica

As medidas voltamétricas realizadas para o estudo do complexo porfirínico e dos aminoácidos foram feitas usando um potenciostato µ-Autolab type III (EcoChemie, Holanda). Um eletrodo de carbono vítreo, com 0,071 cm<sup>2</sup> de área, foi utilizado como eletrodo de trabalho, um fio de platina com eletrodo auxiliar e Ag/AgCl<sub>(KClsat)</sub> como eletrodo de referência [89]. Para modificação do eletrodo foi utilizada uma célula eletroquímica adaptada em um frasco de 2,0 mL de forma que o eletrodo de evitar vazamentos, enquanto os outros dois eletrodos foram alocados na parte superior da célula, conforme ilustrado na Figura 23. Esta configuração permitiu que se trabalhasse com apenas 0,5 mL de solução de porfirina. Esta solução era descartada após a formação do filme. Os experimentos em voltametria cíclica, pós-modificação, foram realizados numa célula eletroquímica convencional de 10,0 mL.



Figura 23: Célula eletroquímica adaptada utilizada para a modificação de eletrodo de carbono vítreo.

## 3.2.2 Espectroscopia Eletrônica por Reflectância

Os espectros eletrônicos das soluções de porfirinas foram registrados por um espectrofotômetro HP 8453 (Agilent Technologies, USA) utilizando uma cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico. Já os espectros de refletância dos eletrodos modificados foram obtidos usando um espectrofotômetro com sonda de fibra óptica Field Spec ASD (ASD Inc. Boulder, CO, USA) equipado com lâmpada de tungstênio. O eletrodo de Platina (0,071 cm<sup>2</sup> de área) utilizado para este experimento foi construído sobre uma placa de acrílico alocada no interior de uma cubeta de quartzo. Os eletrodos de referência e auxiliar também foram colocados na cubeta de acordo com a Figura 24. Os espectros de reflectância obtidos foram convertidos de porcentagem de reflectância para unidades de absorbância através da equação:

$$A = \log\left(\frac{1}{Reflectancia}\right)$$



Figura 24: Esquema representativo da célula eletroquímica adaptada em cubeta de quartzo para as medidas de reflectância em eletrodo de Pt modificado com filme porfirínico.

## 3.2.3 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

Para execução do experimento utilizando EPR foi desenvolvida uma célula eletroquímica de coleta e reação em linha (Figura 25) na qual o eletrodo de trabalho (carbono vítreo) foi modificado com arranjo eletrostático das porfirinas  $[Ni^{II}TPyP{Ru^{II}(bipy)_2Cl}_4]^{4+}$  e  $[ZnTPPS]^{4-}$ . Uma confluência foi projetada para injetar DMPO imediatamente após o eletrodo de trabalho, na linha de fluxo. Nesse ponto, o DMPO (necessário para a reação "*spin trapping*") foi inserido no sistema de forma a reagir com espécies paramagnéticas formadas na superfície do eletrodo de trabalho, polarizada a 0,9 V. O fluxo principal foi constituído da solução eletrolítica de NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup>, que foi impulsionada por uma bomba peristáltica operando à vazão de 0,6 mL·min<sup>-1</sup>. A solução resultante (200 µL) foi coletada e injetada em uma célula "*flat*", colocada na cavidade de um espectrofotômetro Brunker EMX operando na

banda X (9,5 GHz). Os espectros foram obtidos à temperatura ambiente utilizando os parâmetros: modulação de frequência de 100 kHz, modulação de amplitude = 1 G, e potência de saturação = 20,21 mW.



Figura 25: Esquema representativo da célula eletroquímica em fluxo para coleta do produto formado na superfície de eletrodo de carbono vítreo modificado com fime de  $[Ni^{II}TPyP{Ru^{II}(bipy)_2Cl}_4]^{4+}/$  $[ZnTPPS]^{4-}$  para subsequente medida por EPR.

# 3.2.4 Espectroscopia Raman e Espectroeletroquímica

Os experimentos visando a caracterização da superfície eletródica modificada por espectroeletroquímica foram realizados utilizando um microscópio Raman confocal modelo Alpha 300R (WITec, Knoxville, TN, USA) equipado com os lasers de Nd:YAG (532 nm), Ar (488 nm) e He-Ne (633 nm). Todos os espectros foram adquiridos com excitação em 488 e 532 nm com potência ajustada a 0,50 mW e com tempo de integração de 10 s. Para a aplicação de potencial no sistema eletroquímico com eletrodo modificado foi utilizado um potenciostato PalmSens (Hounten, The Netherlands).O acoplamento entre os sistemas espectroscópico e eletroquímico foi realizado utilizando uma célula espectroeletroquímica

construída no laboratório de pesquisa (Figura 26) composta por: uma cobertura de acrílico com orifícios para entrada e saída de solução e para os eletrodos de referência e auxiliar, além de um orifício maior para encaixe do sistema óptico; uma janela de acrílico que limitava verticalmente o volume de solução e permitia a passagem do laser incidente; um espaçador composto de borracha que limitava lateralmente o volume de solução e a região do eletrodo de carbono vítreo fixado em uma base polimérica. As partes componentes da célula eram fixadas por dois parafusos (não mostrados na figura). Os modelos e especificações utilizados para simulação dos espectros Raman encontram-se no Anexo A.



Figura 26: (a) Esquema detalhado de montagem da célula espectroeletroquímica para os experimentos de caracterização; (b) Célula espectroeletroquímica em funcionamento.

## 3.3.Procedimentos

#### 3.3.1 Preparo e modificação dos eletrodos

Antes de cada procedimento de modificação, os eletrodos de carbono vítreo utilizados foram polidos em suspensão aquosa de alumina e em seguida colocados em banho ultrassônico em água deionizada por 5 minutos. Por fim, os eletrodos foram submetidos a um procedimento eletroquímico de limpeza por ciclagem voltamétrica em NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> de - 1,0 a 1,5 V por 100 ciclos a 0,5 V·s<sup>-1</sup>.

Para a modificação da superfície, o eletrodo de carbono vítreo foi inserido na célula eletroquímica adaptada, contendo 500  $\mu$ L do complexo [Ni<sup>II</sup>TPyP{Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl}<sub>4</sub>]<sup>4+</sup> 1,0 x 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> em NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup>, e então foi submetido a contínuas varreduras cíclicas de potencial, totalizando 50 ciclos, entre 0 e 0,9 V com velocidade de varredura a 0,1 V·s<sup>-1</sup>. Após esse procedimento, o eletrodo foi lavado com solução de NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> para remover da superfície a solução de porfirina remanescente.

Os filmes de porfirinas feitos por arranjo eletrostaticamente montado de  $[Ni^{II}TPyP{Ru^{II}(bipy)_2Cl}_4]^{4+}/[ZnTPPS]^{4-}$  foram obtidos seguindo a metodologia reportada na literatura [14, 90, 91]: 2 µL de solução metanólica de  $[Ni^{II}TPyP{Ru^{II}(bipy)_2Cl}_4]^{4+}$  na concentração de 1,0 x 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> foram transferidos para a superfície do eletrodo de carbono vítreo, sendo este deixado exposto ao ar ambiente para evaporação do solvente por aproximadamente 5 minutos. Em seguida, sobre o mesmo eletrodo, o procedimento foi repetido usando solução aquosa de Na<sub>4</sub>[ZnTPPS] 1,0 x 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup>, sendo o tempo para secagem, nesse caso, variando entre 10 e 20 minutos. Posteriormente, a superfície eletródica modificada foi lavada com água deionizada.

# 4. Resultados e Discussões

#### 4.1. Observações Preliminares

Antes das analises instrumentais, durante o preparo das soluções de  $[Ni^{II}TPyP{Ru^{II}(bipy)_2Cl}_4]^{4+}$ , foi possível obter informações visuais preliminares sobre o seu comportamento em diferentes meios. Nos próximos parágrafos serão descritas as observações
visuais do reagente [Ni<sup>II</sup>TPyP{Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl}<sub>4</sub>]<sup>4+</sup> quando solubilizado em diferentes meios. Estas informações darão suporte às hipóteses levantadas nas discussões dos ensaios instrumentais.

A Figura 27 mostra três frascos contendo o equivalente a 1,0 x  $10^{-4}$  mol·L<sup>-1</sup> de  $[Ni^{II}TPyP{Ru^{II}(bipy)_2Cl}_4]^{4+}$  em (a) água; (b) em solução de NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup>; (c) em metanol.



Figura 27: Frascos contendo 1 x  $10^{-4}$  mol·L<sup>-1</sup> do complexo porfirínico [Ni<sup>II</sup>TPyP{Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl}<sub>4</sub>]<sup>4+</sup> em 1,0 mL de diferentes meios: (a) água, (b) solução aquosa de NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> e (c) metanol.

Quando a porfirina foi adicionada a um frasco contendo apenas água, mesmo após inserção em banho ultrassônico por períodos de 20 minutos ou mais, não foi possível observar solubilização total do composto, sendo observada a formação de um corpo de fundo na porção inferior do frasco e sobrenadante de coloração pouco intensa e de aspecto levemente túrbido. Em solução alcalina, não foi observada imediata solubilização da porfirina após agitação manual, em contrapartida, a solubilização completa do sólido foi obtida após banho ultrassônico dutante 10 minutos. Já em metanol, a porfirina foi facilmente solubilizada por simples agitação manual, não apresentado necessidade de banho ultrassônico.

A baixa solubilidade de compostos porfirínicos em água é bem entendida e previsível mesmo com a inserção de grupos com carga como o grupo Ru(bipy)<sub>2</sub>Cl, a solubilidade dela em água ainda é muito pequena, pois a carga é dispersa no seu sistema molecular volumoso, sendo necessários o emprego de solventes de menor polaridade, como o metanol. Intrigantemente, a maior solubilidade relativa da porfirina em solução alcalina (frente à solubilidade em e água) revela a possibilidade de uma reação química entre porfirina com componentes do eletrólito presente, possivelmente íons OH<sup>-</sup>, uma vez que, como visto anteriormente, a formação eletroquímica dos filmes derivados de complexos macrocíclicos de níquel, como visto no capítulo anterior, parece ser um processo intimamente dependente da alcalinidade do meio.

Tendo isso em vista, os ensaios instrumentais foram direcionados não somente à composição do filme porfirínico gerado eletroquimicamente, mas também às características químicas da solução precursora.

#### 4.2. Espectroscopia Eletrônica e Comportamento em Meio alcalino

O espectro eletrônico da solução [Ni<sup>II</sup>TPyP{Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl}<sub>4</sub>]<sup>4+</sup> em metanol (Figura 28a) possui bandas de absorção em 209, 244, 291, 355, 408, 434, 486, 526, e 558 nm, as quais são consistentes com a presença de dois grupos cromóforos: a níquel-porfirina e o complexos periféricos de rutênio. As bandas em 291, 355, 434 e 486 nm foram atribuídas ao complexo perférico, sendo que a banda em 291 nm é caracterizada como uma transição do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  dos ligantes bipiridina (bipy).

A transição referente ao desdobramento do campo ligante dos átomos de Ru em relação ao ligante bipy ocorre em 355 nm, enquanto as bandas em 434 e 486 nm podem ser atribuídas à transferência de carga do metal para o ligante (MLCT) Ru<sup>II</sup> $\rightarrow$ bipy,  $d_{\pi}\rightarrow p_{\pi}^*$ . As mudanças observadas nas bandas MLCT em metanol e solução alcalina podem ser atribuídas

ao efeito solvatocrômico, devido à mudança do solvente. As bandas características das transições no anel porfirínico em 408, 526 e 558 nm são atribuídas às transições Soret,  $Q_{(1,0)}$  e  $Q_{(0,0)}$ , respectivamente, sendo observado para a banda Soret, além do efeito solvatocrômico, uma diminuição da sua intensidade relativa frente à banda bipy( $\pi \rightarrow \pi^*$ ).



Figura 28: Espectros eletrônicos para solução de  $[Ni^{II}TPyP\{Ru^{II}(bipy)_2Cl\}_4]^{4+}$   $1x10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> em (a) metanol em (b) solução de NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> (----), conjunto de bandas deconvoluídas usando funções Gaussianas e respectivos espectros calculados (----). À direita: Representação esquemática da coordenação de íons hidroxila nas posições axiais do centro de Ni<sup>II</sup> do complexo  $[Ni^{II}TPyP\{Ru^{II}(bipy)_2Cl\}_4]^{4+}$  em meio alcalino.  $R = py-\{Ru(bipy)_2Cl\}_{+4}^{+}$ . As demais cores representam as bandas deconvoluídas.

De acordo com o modelo de quatro orbitais de fronteira [38] para os estados eletrônicos porfirínicos, a banda Soret é caracterizada pela transição do orbital HOMO ( $a_{2u}$ ) para o orbital LUMO ( $e_g$ ). O orbital  $a_{2u}$  apresenta uma baixa densidade eletrônica nos carbonos pirrólicos, sendo mais sensível à natureza dos substituintes nas posições *meso*, o íon metálico coordenado e os respectivos ligantes axiais. Por isso, a coordenação de íons hidroxila no Ni central, induzida pela alta concentração do ligante no eletrólito suporte, causa o deslocamento para o azul e diminui a intensidade da banda Soret e o surgimento de uma nova banda em 472 nm [92], observados na Figura 28b, indicando a presença de uma nova espécie em solução de NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup>, a porfirina ligada axialmente à hidrolixa [Ni(OH)<sub>2</sub>TRPyP]<sup>2+</sup>, como representado na reação da Figura 28. A coordenação axial de íons OH explica o aumento de solubilidade observado da porfirina em meio alcalino, uma vez que a inserção de grupos hidroxila deve aumentar consideravelmente a interação com o solvente por meio de ligações de hidrogênio, apesar da diminuição da carga total do complexo.

Depois de 50 ciclos voltamétricos em solução alcalina da porfirina, é possível perceber visualmente a formação de um filme fino de coloração castanho escuro depositado no eletrodo de disco de platina. O mesmo acontece no eletrodo de carbono vítreo, porém, devido à sua coloração escura, a mudança é muito sutil. Na Figura 29 é mostrado o espectro de reflectância (convertido para absorbância) para o eletrodo de platina modificado. As semelhanças entre os perfis espectrais entre filme e solução alcalina podem indicar uma conservação de geometria. Além disso, observa-se o deslocamento para o vermelho das transições Soret,  $Q_{(1,0)}$  e  $Q_{(0,0)}$ , consistente com a formação de um sistema de  $\pi$ - $\pi$  stacking, enquanto as bandas MLCT dos complexos periféricos exibem somente um ligeiro deslocamento no mesmo sentido, além de um alargamento, indicando um grau de interação intermolecular menor quando comparado com o anel porfirínico.



Figura 29: Espectro eletrônico do material depositado na superfície de eletrodo de Pt após 50 sucessivos ciclos voltamétricos em solução  $[Ni^{II}TPyP\{Ru^{II}(bipy)_2Cl\}_4]^{4+}$  1,0 x 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> em NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> entre 0 e 0,9 V (—) e conjunto de bandas deconvoluídas usando funções Gaussianas e respectivos espectros calculados (—).As demais cores representam as bandas deconvoluídas

# 4.3. Aspectos Eletroquímicos do Crescimento do Filme Porfirínico

Devido à complexidade dos processos eletroquímicos envolvidos no crescimento do filme, a análise dos voltamogramas foi realizada, em primeira instância, observando os processos individualmente, atribuindo os sítios de oxidação/redução aos dois diferentes centros metálicos, identificando produtos de reação (em combinação com EPR) e, posteriormente, a análise da dependência entre esses processos.

#### a) Aspectos Gerais

Os voltamogramas típicos (50 primeiros) registrados para o processo de modificação de eletrodo de carbono vítreo com o filme porfirínico são apresentados na Figura 30, na qual

o sinal mais proeminente, ainda no primeiro ciclo, é o surgimento de um pico de corrente em 0,820 V que cresce gradativamente ao longo dos ciclos até perder a forma característica de pico, de forma que, nos últimos ciclos, é observado somente o aumento contínuo da corrente com o potencial aplicado. Os picos de oxidação em 0,485 V e redução em 0,398 V, característicos para esse tipo de filme, são atribuídos aos processos de oxidação e redução envolvendo o par Ni<sup>III</sup>/Ni<sup>II</sup>, respectivamente.



Figura 30: Voltamogramas sucessivos (n=50) registrados o monitoramento do crescimento do filme porfirínico em eletrodo de carbono vítreo na presença de 1,0 x  $10^{-4}$  mol·L<sup>-1</sup> [Ni<sup>II</sup>TPyP{Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl}<sub>4</sub>]<sup>4+</sup> em NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> de 0 a 0,9 V a 0,1 V·s<sup>-1</sup>.

O primeiro estudo eletroquímico visando à obtenção de informações para a elucidação do mecanismo de formação do material foi realizado pelo monitoramento dos três primeiros voltamogramas cíclicos registrados durante o processo de modificação, que são apresentados na Figura 31.

Já no primeiro ciclo, é possível perceber o surgimento de um pico de corrente elevada em 0,820 V que sugere a participação do par Ru<sup>III</sup>/Ru<sup>II</sup> na formação do filme. Como a corrente é elevada (aproximadamente 55 μA) e não é observado pico de redução na varredura reversa, é provável que este processo seja decorrente da oxidação eletrocatalítica. Como a redução Ru<sup>III</sup>/Ru<sup>II</sup> é observada em eletrólitos neutros e levemente ácidos, é provável que esse processo envolva íons OH<sup>-</sup> presentes no eletrólito. Além disso, o crescimento do sinal do pico de corrente referente ao par [Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl(PyP)]<sup>+</sup>/[Ru<sup>III</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl(PyP)]<sup>2+</sup>, nos ciclos subsequentes, torna-se um indicativo que o complexo periférico também é depositado durante a formação do filme.



Figura 31: Primeiros voltamogramas cíclicos registrados durante o processo de modificação eletródica de 1,0 x  $10^{-4}$  mol·L<sup>-1</sup> [Ni<sup>II</sup>TPyP{Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl}<sub>4</sub>]<sup>4+</sup> em NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> a 0,1 V·s<sup>-1</sup>, de 0 a 0,9 V: Branco (----); 1.° ciclo (----), 2.° ciclo (----) e 3.° ciclo (----).

# b) Etapas iniciais do crescimento do filme: Papel dos sítios $[Ru^{II}(bipy)_2Cl(PyP)]^+$

Para confirmar a hipótese de oxidação eletrocatalítica de íons OH<sup>-</sup> foi realizado um experimento utilizando um eletrodo modificado com filme de porfirinas montado eletrostaticamente, composto por  $[Ni^{II}TPyP{Ru^{II}(bipy)_2Cl}_4]^{4+}$  e  $[ZnTPPS]^{4-}$  (mesotetraquis(4-sulfonato fenil) porfirina de  $Zn^{2+}$ ) em eletrólito KCl 0,1 mol·L<sup>-1</sup> e, a essa solução, foi adicionado o equivalente a 1,0 x 10<sup>-3</sup> mol·L<sup>-1</sup> de NaOH. O mesmo tipo de filme foi utilizado nas medidas de EPR, pois este permite a exploração das propriedades eletroquímicas dos complexos periféricos de Rutênio, uma vez que, as porfirinas tetracatiônica e tetra-aniônica se empilham axialmente, impedindo estericamente a formação de possíveis pontes de oxigênio que poderiam consumir os radicais hidroxil formados em meio alcalino.

Os voltamogramas apresentados na Figura 32 mostram a resposta do eletrodo a presença do par redox reversível [Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl(PvP)]<sup>4+</sup>/ com modificado, [Ru<sup>III</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl(PyP)]<sup>5+</sup>, com pico de oxidação 0,814 V e de redução em 0,751 V. O nítido incremento de corrente após a adição de solução de NaOH, na mesma região de oxidação de íons rutênio, com pequeno deslocamento de potencial de pico para 0,830 V e a clara supressão do respectivo sinal de redução, revelam um efeito eletrocatalítico de oxidação. Entretanto, o processo de oxidação de íons OH<sup>-</sup> diretamente mediado pelos íons Ru<sup>III</sup>, acarretaria em uma mudança na esfera de coordenação do metal, com formação de espécies Ru-hidroxo e Ru-oxo, resultando em um deslocamento de potencial considerável e coeso dos picos de oxidação e redução, o que não ocorre. O ligeiro deslocamento observado para o pico de oxidação é atribuído à variação esperada em relação potencial padrão do mediador para processos eletrocatalíticos (conforme previsto pela Eq. 7 do Capítulo I). Veremos posteriormente que os ligantes bipiridina também apresentam um papel importante na transferência de carga.



Figura 32: Avaliação da atividade eletrocatalítica dos complexos periféricos de  $[Ru^{II}(bipy)_2Cl(PyP)]^+$ : voltamogramas cíclicos registrados para filme de *NaOH* 1,0  $\times$  10<sup>-3</sup> *mol*·*L*<sup>-1</sup>;

Uma vez que o processo de formação do filme não é observado quando as varreduras são realizadas até potenciais menores que 0,82 V, presume-se a participação ativa dos complexos periféricos [Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl(PyP)]<sup>+</sup> para o crescimento do filme como mediador redox, atuando na oxidação de íons OH<sup>-</sup> para, muito provavelmente, radicais 'OH, uma vez que esta é uma espécie de tempo de vida curto e altamente instável, potencialmente ativadora de processos reativos que podem desencadear a formação do filme.

A dependência da formação do filme em relação à janela de varredura foi estudada variando-se o potencial de inversão ( $E_i$ ) durante a modificação de eletrodo de carbono vítreo por voltametria cíclica. Os voltamogramas obtidos neste experimento são apresentados na Figura 33. Nesse estudo, a formação do filme foi avaliada pela intensidade de corrente do par reversível do par Ni<sup>III</sup>/Ni<sup>II,</sup> com oxidação em 0,486 V e redução em 0,399 V.

Nos três primeiros voltamogramas a presença do par redox característico não é observada, somente outro par reversível ( $E_{OXI} = 0,310$  V;  $E_{RED} = 0,238$  V), que aparenta possuir queda difusional de corrente ao longo dos ciclos. Esses sinais foram atribuídos ao par  $[Ni^{III}(OH)_2TRPyP]^{3+}/[Ni^{II}(OH)_2TRPyP]^{2+}$ . Apenas quando  $E_i$  atinge o valor de 0,8 V (valor muito próximo ao potencial de oxidação dos complexos periféricos contendo rutênio) o par característico do filme é observável. Entretanto, a baixa magnitude de corrente de pico (menor que 20  $\mu$ A para oxidação) indica que esse valor de  $E_i$  não é o mais favorável para a formação do filme.

Quando  $E_i$  atinge valores entre 0,9 e 1,0 V a magnitude de corrente de pico é máxima (67 µA para oxidação em ambos os casos), sendo que essa faixa de potencial de inversão considerada a melhor para formação do filme, uma vez que, em valores de potencial de inversão maiores, a magnitude de corrente diminui, como no caso de  $E_i = 1,10$  V, onde também ocorre acentuado deslocamento de potencial de pico durante os ciclos. A total supressão dos picos pode ser observada quando  $E_i = 1,20$  V. Nesse caso, o surgimento dos sinais referentes ao par redox Ni<sup>III</sup>/Ni<sup>II</sup> ocorre nos dois primeiros ciclos de varredura, sendo que, nos ciclos subsequentes, a magnitude de corrente diminui gradativamente.



Figura 33: Voltamogramas cíclicos (50 primeiros) registrados para modificação de eletrodo de carbono vítreo com solução de  $[Ni^{II}TPyP\{Ru^{II}(bipy)_2Cl\}_4]^{4+}$  1,0 x 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> em NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> a 0,1 V·s<sup>-1</sup> com variação do potencial de inversão: (a) 0,5; (b) 0,6; (c) 0,7 (d) 0,8; (f) 0,9; (F) 1,0; (g) 1,1 e (h) 1,2 V. Detalhes: Ampliações das regiões de potencial entre zero a 0,7 V.

A hipótese da formação de radicais hidroxil mediada pelos complexos periféricos contendo Ru<sup>III</sup> foi averiguada por Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica, de forma que as espécies 'OH, geradas a 0,9 V na superfície do eletrodo de carbono vítreo, devidamente modificado, foram submetidas a reação com o DMPO.

A reação com DMPO se desenvolve a partir de uma confluência, pela qual o composto era injetado no sistema em fluxo, imediatamente após a passagem do eletrólito pelo eletrodo modificado, de forma que as espécies radicalares geradas na superfície do eletrodo eram prontamente "capturadas" (*reação spin trapping*). A solução final contendo o aduto DMPO/OH formado foi então coletada em um frasco e submetida à análise no espectrômetro EPR. O espectro da solução resultante, apresentado na Figura 34, exibe claramente o conjunto de linha típica referente ao aduto DMPO/OH, apresentando uma constante hiperfina de 15,6 G, consistente com o valor de referência de 15,01 G [47-49, 93], confirmando assim, a formação de radicais hidroxil no eletrodo polarizado em 0,9 V.



Figura 34: O espectro de EPR da solução a partir da célula eletroquímica em fluxo para detecção de radicais hidroxil, com eletrodo de carbono vítreo modificado [Ni<sup>II</sup>TPyP{Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl}<sub>4</sub>]<sup>4+</sup>/[ZnTPPS]<sup>4-</sup> polarizado em 0,9 V, que mostra os sinais característicos do aduto DMPO/'OH.

A oxidação da água a oxigênio molecular mediada por  $[Ru(bipy)_3]^{3+}$  em meio alcalino é relatada intensamente na literatura científica [94-97]. Tal reação possui o radical hidroxil como espécie intermediária. Dessa forma, é pertinente que uma reação semelhante ocorra nos complexos  $[Ru(bipy)_2Cl(PyP)]^+$  em condições eletroquímicas apropriadas. Supõe-se que as espécies radicais sejam consumidas durante o crescimento do filme, de forma que a geração de O<sub>2</sub> não seja significativa.

Em uma solução de NaOH 0,1 mol·L, os radicais hidroxil parecem ser gerados como um dos principais produtos de oxidação que sugerem que pode ser a espécie-chave envolvida no mecanismo de que leva ao crescimento do filme na superfície do eletrodo.

A Figura 35 mostra o possível mecanismo para geração de radicais hidroxil a partir dos complexos periféricos [Ru<sup>III</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl(PyP)]<sup>2+</sup> gerados em meio alcalino em potenciais acima de 0,8 V. Com a elevação do estado redox desse sítios, espécies intermediárias devem ser geradas por ataque nucleofílico de uma molécula de H<sub>2</sub>O de uma das posições *para* do ligantes bipy, produzindo uma aduto protonado. Em seguida, a desprotonação do nitrogênio coordenado ao Ru ocorre, sendo facilitada pela elevada concentração de hidróxido no eletrólito suporte, formando um radical bipiridil hidroxilado. A homólise da ligação C-OH permite a saída do 'OH regenerando o ligante bipiridina, mas reduzindo o complexo periférico ao estado de Ru<sup>II</sup>. Este é reoxidado a Ru<sup>III</sup>, regenerando as espécies de partida.



Figura 35: Possível mecanismo eletrocatalítico para a geração de radicais hidroxil mediadas por  $[Ru(bipy)_2Cl(PyP)]^{2+}$  em meio de NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup>.  $R = py-\{Ru(bipy)_2Cl\}^+_{4.}$ 

A geração eletroquímica de radicais hidroxil em solução aquosa é um processo extremamente útil, uma vez que esta espécie é altamente reativa e ela pode desencadear vários outros processos reativos em cascata, incluindo uma provável eletropolimerização. O processo de geração eletroquímica dessa espécie requer uma elevada demanda energética e seu mecanismo é dependente do pH do meio. Em meio ácido (pH = 0) e alcalino (pH = 14), segue respectivamente as seguintes equações químicas:

pH = 0 
$$H_2O = OH + H^+ + e^- E^\circ = 2,38 V (vs EPH) [98]$$

$$pH = 14$$
  $OH^{-} \iff OH + e^{-}$   $E^{\circ} = 1,55 \text{ V} (vs \text{ EPH}) [99]$ 

A Figura 36 mostra outro estudo comparativo utilizando um eletrodo de carbono vítreo não modificado em meio eletrolítico de NaOH na ausência e na presença do complexo porfirínico em solução. No primeiro caso, o processo de oxidação de íons OH<sup>-</sup> inicia-se em aproximadamente 1,3 V, valor que está de acordo com o potencial para geração de radical hidroxil quando convertido para o eletrodo de referência Ag/AgCl(KCl<sub>sat</sub>), sugerindo que a presença do complexo porfirínico em solução antecipa este processo em, pelo menos, 0,480 V.



*Figura 36: Voltamogramas referentes à geração de radicais hidroxil utilizando eletrodo de carbono vítreo na ausência (*---) *e na presença de 1,0 x 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> [Ni(OH)<sub>2</sub>TRPyP]<sup>2+</sup> (*---).

### c) Processos envolvendo os sítios centrais Ni-porfirina e dependência dos processos

Voltando a atenção para os primeiros voltamogramas do processo de modificação, especificamente na região entre 0 e 0,7 V apresentados na Figura 37 (ampliação da Figura 31

nessa região de potencial), pode-se perceber as mudanças referentes aos centros contendo níquel.



Figura 37: Ampliação da região entre 0 e 0,7 V dos primeiros voltamogramas cíclicos registrados durante o processo de modificação eletródica de 1,0 x  $10^{-4}$  mol·L<sup>-1</sup> [Ni<sup>II</sup>TPyP{Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl}<sub>4</sub>]<sup>4+</sup> em NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> a 0,1 V·s<sup>-1</sup>, de 0 a 0,9 V: Branco (somente eletrólito suporte) (—); 1.° ciclo (—), 2.° ciclo (—) e 3.° ciclo (—).

Ainda durante a varredura direta do primeiro ciclo é observado um pico de oxidação I em 0,310 V, possuindo um respectivo processo de redução em II (0,240 V) durante a varredura reversa. Esses processos foram atribuídos à espécie porfirínica em solução, ou seja, o par redox reversível [Ni<sup>III</sup>(OH)<sub>2</sub>TRPyP]<sup>3+</sup>/[Ni<sup>II</sup>(OH)<sub>2</sub>TRPyP]<sup>2+</sup>. Ainda no primeiro ciclo voltamétrico, observa-se também o surgimento de um sutil pico de redução em 0,399 V (III) durante a varredura reversa que, por sua vez, apresenta um processo pareado de oxidação, IV, durante o segundo ciclo em 0,518 V, que não é observado durante o primeiro ciclo. Estes dois processos são mais proeminentes no terceiro ciclo e nos ciclos subsequentes, com ligeiro deslocamento do potencial dos picos de oxidação e redução para valores menos positivos, evidenciando-se como o par redox característico do filme depositado sobre a superfície eletródica. Tais processos são atribuídos a espécies também contendo níquel que é formada na superfície eletródica no decorrer dos ciclos.

A ocorrência do pico IV apenas após o primeiro ciclo indica a dependência de processos, ou seja, uma vez que o crescimento do filme é obsevado somente quando a varredura atinge valores de potencial para a formação de 'OH, é pertinente dizer que os processos III e IV são dependentes do processo redox associados aos complexos periféricos [Ru<sup>II</sup>(bipy)<sub>2</sub>Cl(PyP)]<sup>+</sup>. Além disso, pela análise global dos processos, pode-se sugerir que a formação do filme se assemelha a processos regidos por um mecanismo clássico do tipo Eletroquímico-Químico-Eletroquímico (ECE) [100], entretanto, com a complexidade do processo de oxidação eletrocatalítica que envolve os sítios de rutênio que já compreende uma etapa eletroquímica e outra química.

Tal processo é desencadeado em 0,814 V com formação de radicais hidroxil, envolvendo uma etapa química complexa. Os radicais formados participam de uma segunda etapa química juntamente com sítios situados no centro metálico porfirínico. Dessa forma, o produto gerado é reduzido em 0,399 V e reoxidado na varredura direta do ciclo voltamétrico subsequente em 0,518 V, sendo todo esse processo repetido ao longo dos ciclos.

## 4.4. Espectroscopia Raman e Espectroeletroquímica

Os estudos envolvendo espectroscopia Raman foram utilizados como ferramenta adicional para a caracterização do material formado na superfície do eletrodo de carbono vítreo. A análise das variações estruturais do filme porfirínico foi realizada por comparação dos espectros de  $[Ni^{II}TPyP{Ru^{II}(bipy)_2Cl}_4]^{4+}$  no estado sólido, em solução aquosa alcalina, depois de 5 ciclos e 50 ciclos voltamétricos entre 0 e 0,9 V, a velocidade de varredura de 0,1 V·s<sup>-1</sup> a fim de acompanhar o processo de crescimento do filme. Os espectros Raman de  $[Ni^{II}TPyP{Ru^{II}(bipy)_2Cl}_4]^{4+}$  no estado sólido e em solução alcalina de NaOH são apresentados na Figura 38.

Os modos de vibração característicos de ligações C=C e C=N para o anel porfirínico e para a bipiridina podem ser vistos na faixa de 1450-1650 cm<sup>-1</sup>, utilizando as linhas de laser de 532 e 488 nm. O laser de 532 nm está em ressonância com a transição  $Q_{(1,0)}$  para a porfirina de níquel, de modo que o mecanismo de Herzberg-Teller, que opera aumentando os modos normais e os modos assimétricos são mais intensificados que os assimétricos [101]. Portanto, os modos de estiramento C=C e C=N assimétricos em 1515 cm<sup>-1</sup> e o modo de deformação do anel porfirínico em 454 e 116 cm<sup>-1</sup> são os mais intensificados.



Figura 38: Espectros Raman normalizados para  $[Ni^{II}TPyP\{Ru^{II}(bipy)_2Cl\}_4]^{4+}$  na forma sólida (------) e  $[Ni^{II}(OH)_2TRPyP]^{2+}$  presente em solução alcalina de NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> (-----), obtidos com excitação em (a) 488 e (b) 532 nm.

0 espectral intensidades perfil dos picos espécie e as para а  $[Ni^{II}TPyP{Ru^{II}(bipy)_2Cl}_4]^{4+}$  em meio de NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> ( $[Ni^{II}(OH)_2TRPyP]^{2+}$ ) se assemelha ao obtido para a mesma espécie no estado sólido, indicando que não há degradação do complexo quando este é dissolvido em meio fortemente alcalino. A intensidade do modo v(Ru-Cl) em 253 cm<sup>-1</sup> diminui em solução de NaOH quando excitado com os lasers de 488 nm e de 532 nm, sugerindo que o ligante cloreto poderia ser trocado por ânions hidroxila na esfera de coordenação do Ru, mas nenhuma evidência dessa reação pôde ser encontrada eletroquimicamente, uma vez que seria necessário a formação de espécies Ru-oxo, alterando o potencial de oxidação Ru<sup>II</sup>/Ru<sup>III</sup>, como visto anteriormente. Entretanto, esse potencial é praticamente invariável, mesmo com mudanças de pH do eletrólito. Contudo, bandas atribuídas aos modos de estiramento Ni-O e de deformação angular Ni-O-H são encontradas em 405 e 1252 cm<sup>-1</sup> respectivamente, corroborando a hipótese de coordenação de íons hidróxido nas posições axiais da esfera de coordenação do níquel. Portanto, pode-se assumir que  $[Ni^{II}(OH)_2TRPyP]^{2+}$  é a espécie majoritariamente presente em meio alcalino, como visto nos resultados para espectroscopia eletrônica.

Os resultados obtidos por EPR e por voltametria cíclica, juntamente com a espectroscopia Raman, sugerem ocorrência de um processo de eletropolimerização mediado por radicais hidroxil. Como vários artigos científicos sugerem a formação de um composto polimérico com pontes  $\mu$ -oxo entre os centros de níquel, essa hipótese foi considerada nos cálculos teóricos (Anexo A, p,166). Entretanto como os espectros Raman apresentam indícios de estiramento O-O em 1382 cm<sup>-1</sup>, a formação de um polímero com pontes  $\mu$ -peroxo, que poderia explicar algumas propriedades eletroquímicas do filme, também foi considerada nos cálculos.

As tentativas de atribuição de bandas dos espectros Raman apresentados na Tabela 1 foram realizadas em comparação com os espectros da porfirina e seus derivados encontrados na literatura [102-104] e também pelos espectros Raman teóricos para as espécies [NiP],  $[Ni(OH)]^{-1}$  e  $[NiP(O_2)]^{-1}$ , como prováveis componentes monoméricos, apresentados na Figura 1 do Anexo A, no qual P representa o anel porfirínico e também os complexos periféricos  $[Ru(bipy)_2Cl(PyP)]^+$ . Essas espécies foram consideradas nos cálculos teóricos assumindo a possibilidade de que o material depositado sobre a superfície eletródica possa ser um polímero de coordenação no qual as unidades porfirínicas são conectadas pelos centros de Ni através de pontes  $\mu$ -oxo ou  $\mu$ -peroxo.

-				
Teórico	Ru(bipy) <sub>2</sub> Cl	$[Ni^{II}TPyP{Ru^{II}(bipy)_2Cl}_4]^{4+}$	[Ni <sup>II</sup> (OH) <sub>2</sub> TRP	PyP] <sup>2+</sup> Atribuição
NiP				
3133				$v_{si}C_{\beta}$ -H
3117				$v_{ass}C_{\beta}$ -H
3087				
1632	1600	1609	1608	$v_{ass}C_mC_\alpha$ $v_{si}$ CC e $v_{si}$ CN (bipy)
1555	1558	1557	1565	$v_{ass} CC e v_{ass} CN (bipy)$ $v_{si}C_mC_\alpha$ $v_{si}C_\beta C_\beta$
1493	1487	1491	1490	$v_{ass}C_{\beta}C_{\beta}$ $v_{ass}CC e v_{ass}CN (bipy)$
1447		1455	1438	$v_{si}C_{\beta}C_{\beta} + v_{si}C_{m}C_{\alpha}$ (for a de fase)
1369			1379	
1348		1352	1355	$ \delta_{si,op}NCC + \delta_{si,ip}C_{\alpha}C_{m}C_{\alpha} \text{ (for a de fase)}  $ vNiN
1338		1321	1324	v <sub>ass</sub> NC
	1319			
	1274		1271	v(bipy)
		1259	1252	$vC_{m}$ -py + $\delta_{ip}$ Ni-OH
		1217	1217	v(py)
1168	1170	1173	1177	$\delta_{in}C_{\beta}H$
		1090	1094	
1052		1070	1066	δ <sub>si.in</sub> NNiN
974	1027	1024	1021	Respiração do anel (P + bipy) + $v_{si}$ NiN
		1004	989	
889		901		
843				
			807	$\delta_{si,ip}C_{\alpha}C_{\beta}C_{\beta} + \delta_{si,ip}C_{\alpha}C_{m}C_{\alpha}$
719			744	
696				
650	662	669	668	$\delta_{si.op}C_{\alpha}C_{\beta}H + \delta_{si.op}CH(py)$
			557	vNi <sup>III</sup> O
		409	405	$vNi^{II}O + \delta_{si.on}P$
		389	381	
	371	371	370	vRuN
348		320	325	v <sub>si</sub> NiN
		- •	253	vRuCl
216		230	214	$v_{ass}NiN + \delta_{ass}NiN$
-			116	$\delta_{i} = P + \delta_{i} = NiN$

Tabela 1: Atribuição do espectro Raman para  $[Ni^{II}TPyP\{Ru^{II}(bipy)_2Cl\}_4]^{4+}$  solução de NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup>  $([Ni^{II}(OH)_2TRPyP]^{2+})$  em comparação com o espectro da porfirina pura no estado sólido e o complexo  $[Ru(bipy)_2Cl]$ , registrados com excitação em 488 nm.

v: estiramento, v<sub>si</sub>:estiramento simétrico; v<sub>ass</sub>:estiramento assimétrico

δ: deformação angular;  $\delta_{op}$ : deformação angular fora do plano;  $\delta_{ip}$ : deformação angular dentro do plano  $C_m$ ,  $C_a$  e  $C_\beta$ : átomos de carbono nas posições meso, α e β do anel porfirínico, respectivamente py: piridil

bipy: 4,4'- bipiridil

De forma a testar essa hipótese e identificar o grupo de ligação mais provável, o processo de formação do filme foi monitorado por medidas Raman espectroeletroquímicas. O espectro do material depositado na superfície de carbono vítreo depois de 5 e 50 ciclos voltamétricos é mostrado na Figura 39, em comparação com o espectro de  $[Ni^{II}TPyP{Ru^{II}(bipy)_2Cl}_4]^{4+}$  em solução de NaOH, onde pode-se notar o surgimento de uma banda em 405 cm<sup>-1</sup> atribuída ao modo de estiramento Ni-O. Entretanto, o modo de estiramento O-O aparece geralmente como bandas intensas na região entre 1600-1100 cm<sup>-1</sup> dependendo do estado de oxidação do átomo de oxigênio e da ordem de ligação. De acordo com o espectro Raman teórico para a espécie  $[NiP(O_2)]^{-1}$  (Figura 39), o modo de estiramento O-O deve ser encontrada em torno de 1376 cm<sup>-1</sup> e o comprimento de ligação, de acordo com a simulação, é de 1,31 Å, como esperado para a formação de espécies peroxo com elevada deslocalização de carga no anel porfirínico. Comparando o espectro teórico com o espectro do material depositado após 5 e 50 ciclos, pode-se notar o surgimento de novas bandas em 1380 e 1234 cm<sup>-1</sup>, que podem ser atribuídas ao modo  $v(O_2^{-1})$  com ordem de ligação ligeiramente superior ao previsto teoricamente. Além disso, as bandas em 249 e 216 cm<sup>-1</sup> podem ser atribuídas à deformação angular  $\delta$ (NiOO), reforçando a hipótese de formação de um composto porfirínico polimérico ligado por pontes µ-peroxo. Nenhuma banda adicional atribuível a espécies com características  $\mu$ -oxo puderam ser encontradas na faixa característica entre 800 e 1300 cm<sup>-1</sup>.

É possível notar o deslocamento para o vermelho e alargamento da maioria dos picos quando os espectros após 5 e 50 ciclos são colocados em comparação. Este comportamento indica que interações intermoleculares tornam-se mais fortes à medida que o processo de eletropolimerização procede em solução alcalina. Esse comportamento pode ser decorrente do empilhamento  $\pi$  dos anéis Ni-porfirínicos em sua fase mais condensada, como esperado para o crescimento do filme como função do número de ciclos voltamétricos.



Figura 39: (a) Espectros Raman teóricos para espécie  $[NiP(O_2)]^{-1}$  e espectros Raman experimentais para a espécie  $[\mu - O_2 - NiTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}^+_4]_n$  na superfície de carbono vítreo após (b) 50 e (c) 5 ciclos voltamétricos entre 0 e 0,9 V em NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup>.

As pontes do tipo peroxo (O-O) podem ter diferentes estados de oxidação e a ligação com o centro metálico da Ni-porfirina pode levar a uma maior ou uma menor deslocalização de carga que pode mudar o estado de oxidação do centro de Ni. Dessa forma, a banda em 805 cm<sup>-1</sup> pode ser atribuída ao modo v(Ni<sup>III</sup>-O) que apresenta maior frequência que o módulo análogo v(Ni<sup>II</sup>-O) em 405 cm<sup>-1</sup>.

Por fim, o material foi estudado através de ensaios envolvendo espectroeletroquímica Raman (Figura 40) pela observação das mudanças espectrais sobre aplicação de potencial constante, na faixa entre 0,05 e 0,85 V a fim de confirmar a estrutura proposta. Dessa forma, foi possível correlacionar as mudanças estruturais associadas aos processos redox do material.



Figura 40: Série espectroeletroquímica Raman para  $[\mu - O_2 - NiTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}^+_4]_n$  depositado em eletrodo de carbono vítreo em NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> em diferentes faixas de número de onda (de 1650 a 1450 cm<sup>-1</sup>(topo); 1450 a 900 cm<sup>-1</sup> (meio) e 900 a 50 cm<sup>-1</sup>(abaixo).

O espectro do filme mostra que a oxidação de Ni<sup>II</sup> para Ni<sup>III</sup>, em potenciais acima de 0,40 V, é acoplada com a formação de pontes peroxo Ni-O-O-Ni. Isso pode ser confirmado pelo surgimento de bandas em 1234 e 206 cm<sup>-1</sup> atribuídas aos modos v(O-O) e  $\delta$ (NiOO)

respectivamente. Adicionalmente, o deslocamento para o vermelho dos modos v(CC) e v(CN) do anel porfirínico em 1610 e 1560 cm<sup>-1</sup> evidencia o empilhamento ( $\pi$ - $\pi$  stacking) de anéis porfirínicos [105]. Esses modos vibracionais não são influenciados significativamente quando potenciais elevados são aplicados, confirmando a atribuição da onda anódica em 0,52 V (voltamograma da Figura 37) para o processo Ni<sup>II</sup>/Ni<sup>III</sup>. Essa conclusão é reforçada quando a intensidade da banda em 805 cm<sup>-1</sup> (modo v(Ni<sup>III</sup>-O)) varia em relação ao potencial aplicado e alcança seu máximo a partir de 0,50 V.

## 5. Conclusões

Através dos resultados apresentados nesse capítulo, chega-se às seguintes conclusões sobre a estrutura e mecanismo de formação do filme porfirínico:

A ausência das bandas largas típicas da transição Ni(OH)<sub>2</sub>/NiOOH, em torno de 475 e 555 cm<sup>-1</sup> [106, 107] na série espectroeletroquímica Raman da Figura 40 e a ausência de sinais que evidenciem uma provável demetalação da porfirina no espectro eletrônico do filme, o que indicaria a degradação do complexo, descartam a possibilidade de formação de Ni(OH)<sub>2</sub> como componente principal do filme concomitantemente com a decomposição do complexo.

- Os resultados das medidas eletroquímicas em conjunto com EPR indicam a formação de radical 'OH em potenciais acima de 0,82 V por um processo eletrocatalítico complexo mediado pelos complexos periféricos Ru(bipy)<sub>2</sub>Cl, sendo a formação dessa espécie radical uma etapa essencial para a formação do filme.
- Os dados de Espectroscopia Eletrônica e Raman da solução da porfirina tetrarrutenada em meio alcalino, sugerem a formação da espécie [Ni<sup>II</sup>(OH)<sub>2</sub>TRPyP]<sup>2+</sup> pela coordenação de

íons OH<sup>-</sup> nas posições axiais do centro de níquel, sendo uma espécie precursora do filme resultante e explicando os mecanismos de solubilidade.

Os estudos envolvendo Espectroscopia Eletrônica Reflectância por e Espectroeletroquímica Raman reforçam a hipótese que o material na superfície do eletrodo é um polímero supramolecular constituído por macrociclos porfirínicos em stacking, com centros de Ni conectados por pontes µ-peroxo formados eletroquimicamente, como representado na Figura 41.



Figura 41: Representação do polímero de coordenação supramolecular com unidades ligadas pelos centros de Ni por pontes  $\mu$ -peroxo formado sobre a superfície eletródica.  $R = py-\{Ru(bipy)2Cl\}^+_4$ .

A estrutura polimérica baseada em pontes  $\mu$ -peroxo pode ser a razão fundamental do comportamento eletroquímico similar ao  $\alpha$ -Ni(OH)<sub>2</sub>. Em geral, complexos metálicos de ligantes

macrocíclicos se depositam no eletrodo em *stacking*, obtendo-se cadeias lineares que possui elevada condutividade ao longo do eixo de *stacking*, que é sobreposto ao orbital  $dz^2$  do metal central. Quando existem ligantes axiais que permitem a junção entre dois centros metálicos, a transferência de carga ocorre eficientemente através das ligações metal-ligante-metal.

Definido o produto final de reação como o polímero de coordenação  $[\mu$ -O<sub>2</sub>-NiTPyP{Ru(bipy)<sub>2</sub>Cl}<sub>4</sub>]<sub>n</sub> e tomando como base as considerações sobre o mecanismo envolvido, é possível sumarizar o processo global de eletropolimerização em meio alcalino pelas seguintes equações:

$$[Ni^{III}(OH)_2TPyP\{Ru^{II}(bipy)_2Cl_4] \xrightarrow{E = 0.820V} [Ni^{III}(OH)_2TPyP\{Ru^{III}(bipy)_2Cl_4]$$

$$[Ni^{III}(OH)_2TPyP\{Ru^{III}(bipy)_2Cl_4] + H_2O \xrightarrow{k_1} [Ni^{III}(OH)_2TPyP\{Ru^{II}(bipy)_2Cl_4] + OH$$

$$[\text{Ni}^{\text{III}}(\text{OH})_2\text{TPyP}\{\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bipy})_2\text{Cl}_4] + \text{OH} \xrightarrow{k_2} [\mu - O_2 - \text{Ni}^{\text{III}}\text{TPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4]_n$$

$$[\mu-O_2-Ni^{III}TPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]_n \xrightarrow{E = 0.399V} [\mu-O_2-Ni^{II}TPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4]_n(ads.)$$

Embora o processo de polimerização seja complexo, sabe-se que ele se inicia após a formação de radicais hidroxil e pode-se defini-lo como uma única etapa química.  $k_1 e k_2$  representam as constantes cinéticas das etapas químicas de geração eletrocatalítica. O ciclo de eletropolimerização é encerrado com a redução de Ni<sup>III</sup> a Ni<sup>II</sup> com a adsorção do polímero na superfície eletródica.

CAPÍTULO IV Aplicação Analítica de Filmes Eletropolimerizados de Porfirina Tetrarrutenada de Níquel em Meio Alcalino: Determinação Amperométrica de Ácido Fólico

## 1. Introdução

Neste capítulo serão descritos os estudos referentes às aplicações dos eletrodos modificados com filmes porfirínicos poliméricos como sensores eletroquímicos na quantificação de ácido fólico, utilizando o eletrodo de carbono vítreo modificado com porfirina tetrarrutenada de níquel.

No método proposto, utilizou-se Batch Injection Analysis (BIA) associada à amperometria, recurso que possibilita análises mais rápidas comparadas com métodos convencionais em batelada, além de algumas características similares às obtidas em Análise por Injeção em Fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*), como rapidez, volume reduzido de amostras, simplicidade, além de repetibilidade e sensibilidade elevadas. Entretanto, BIA também possui algumas particularidades.

BIA foi proposta inicialmente em 1991 por Wang e Taha [108] como uma abordagem alternativa para a realização de análises rápidas, sendo posteriormente demonstrada sua aplicação a vários sistemas de detecção, como espectrofotometria UV-Vis [109], fluorescência [110], calorimetria e técnicas eletroquímicas como potenciometria [108] e voltametria [111-113]. Ao longo de quase 25 anos, BIA se mostrou uma poderosa ferramenta quando combinada com amperometria, devido à maior versatilidade e sensibilidade inerente a essa associação [114-117]. Além disso, como vantagem sobre FIA, BIA dispensa o uso de válvulas, bombas e tubos de conexão, contudo, devido a sua simplicidade, a realização de diferentes etapas analíticas, como extrações e reações químicas, durante a etapa de transporte da amostra, não são contempladas.

Em um sistema BIA com detecção amperométrica, volumes discretos do analito (da ordem de 10 a 100  $\mu$ L) são injetados diretamente sobre a superfície de um eletrodo imerso em eletrólito suporte, de forma que, durante a interação do analito com a superfície do eletrodo

adequadamente polarizada, um sinal transiente de corrente é gerado, semelhante ao obtido em FIA, entretanto, não representando um gradiente de concentração, mas sim um gradiente de velocidade de transporte de material eletroativo para a superfície do eletrodo, como mostrado na Figura 42. Logo no início da injeção (em B), a velocidade de injeção aumenta quase que instantaneamente chegando a seu valor máximo em C, que se estende em um curto intervalo até a dispensa total da a amostra. Em D ocorre a dispersão da amostra no meio, na qual a velocidade decresce rapidamente até chegar a um estado de equilíbrio final, indicando o retorno à linha base (em E), no qual o transporte passa a ser governado por difusão.



Figura 42: Etapas na Injeção e sinal transiente em BIA. A: antes da injeção; B: transporte convectivo; C: Final de injeção; D: Dispersão; E: equilíbrio final. Figura retirada na referência [50].

A configuração de um sistema BIA-amperométrico é baseada em um processo hidrodinâmico de eletrodo do tipo "*Wall-Jet*" [118], ou seja, trabalha em regime de convecção forçada. Além disso, opera em fluxo não contínuo, de forma que o regime hidrodinâmico é válido somente durante a injeção de amostra, diferentemente do que ocorre em FIA, onde o

fluxo é contínuo durante toda análise (salvo raras exceções, como em configurações "*stopped flow*"). Assume-se então que, sob condições hidrodinâmicas, a espessura da camada de difusão,  $\delta$ , em determinado ponto da superfície do eletrodo, é constante, entretanto, variando ao longo de toda superfície, uma vez que se trata de uma configuração de eletrodo hidrodinâmico não uniformemente acessível, como é mostrado pelas linhas de fluxo para células *Wall-Jet* na Figura 43.



Figura 43: Linhas de fluxo em eletrodo hidrodinâmico de configuração Wall-Jet. Figura retirada da referência [118].

Como vantagem analítica ao se trabalhar em condição hidrodinâmica, vale destacar os ganhos em termos de sensibilidade e de repetibilidade, uma vez que o aumento do transporte de espécies eletroativas à superfície do eletrodo acarreta em um crescimento da corrente resultante, dependendo da velocidade do fluxo, além de diminuir consideravelmente a dependência da resposta eletródica à propriedades físicas da solução quando comparado a sistema cujo regime de transporte é somente difusional [118]. Isso fica ainda mais claro quando comparamos qualitativamente as equações que governam a variação da intensidade de corrente em função dos parâmetros de transporte. Segundo a Equação 1, para células configuração *Wall-Jet*, a corrente limite é altamente dependente da velocidade com o qual o

fluxo atinge a superfície do eletrodo, enquanto que na Equação 2, que é a equação de Cottrell para transporte difusional em eletrodos em formato de disco, o único parâmetro que define o transporte é o coeficiente de difusão (normalmente da ordem de  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  cm<sup>2</sup>·s<sup>-1</sup>).

$$I_L = 1,59 n F r^{\frac{3}{4}} V_f^{\frac{3}{4}} D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{5}{12}} a^{\frac{1}{2}} C_{\infty}$$
 (Equação 1)

$$I_t = n F r^2 D^{\frac{1}{2}} C_{\infty} t^{-\frac{1}{2}}$$
(Equação 2)

Onde "*n*" é número de elétrons, "*F*" é a constante de Faraday (96 485 C·mol<sup>-1</sup>), "*r*" é o raio do eletrodo, "*V<sub>f</sub>*" é velocidade de dispensa, "*D*" é o coeficiente de difusão da espécie eletroativa, "*v*" é viscosidade do meio, "*a*" é o diâmetro do jato e " $C_{\infty}$ " é concentração da espécie eletroativa.

Dessa forma, a Equação 1 define a magnitude da corrente durante a etapa de injeção e a Equação 2 define a magnitude da corrente de fundo (background) quando o analito está disperso no eletrólito, de forma que a diferença de magnitudes de corrente é elevada o suficiente para que o aumento de linha base decorrente de várias injeções sucessivas torna-se desprezível, dependendo da velocidade de injeção [119].

A Equação 2 também define o tempo decorrido entre as etapas de dispersão, o equilibro de linha base (Etapas D e E da Figura 42) que está intimamente relacionada à frequência de amostragem, uma vez que esse intervalo é definido como tempo de limpeza  $t_L$  ( $f = 1/t_L$ ). Portanto, a frequência de amostragem se torna dependente do coeficiente de difusão do composto analisado.

Os primeiros sistemas BIA utilizavam micropipetas manuais como propulsores de amostras [108, 117], o que prejudicava a reprodutibilidade do sistema, uma vez que a velocidade de dispensa era totalmente dependente da habilidade do analista. Com a utilização de micropipetas automáticas, com as quais é possível definir as velocidades de propulsão de solução, a perda de reprodutibilidade deixou de ser um problema, entretanto, essa velocidade era limitada ao valor de 75,2  $\mu$ L·s<sup>-1</sup> (aproximadamente 4,5 mL·min<sup>-1</sup>).

A utilização de algumas pipetas modernas possibilita realizar a introdução da amostra com vazão elevada, comparada aos propulsores convencionais utilizados em FIA, sendo possível alcançar velocidades de injeção de até 274  $\mu$ L·s<sup>-1</sup>, o que não seria simples com propulsão por gravidade [120] ou usando os propulsores pneumáticos mais comuns [121]. A utilização das micropipetas apresenta ainda a vantagem de gerar sinal virtualmente isento de ruído devido à pulsação, como é observado quando são utilizadas bombas peristálticas.

A utilização de vazões elevadas aumenta significativamente a resposta do eletrodo (Figura 44) e também a relação entre sinal analítico (corrente faradaica,  $I_F$ ) e ruído de fundo, devido à corrente capacitiva,  $I_C$  [122] (desprezando a contribuição faradaica após diversas injeções), propiciando uma maior detectabilidade. Essas vantagens tornam essa estratégia muito favorável para a aplicação em amperometria de múltiplos pulsos, idealizada primeiramente para FIA em determinações simultâneas [123-126]. Com o uso de pulsos de potencial de curta duração (variando entre 50 a 300 ms), a corrente capacitiva torna-se relevante, uma vez que ocorre o carregamento da dupla camada elétrica a cada pulso efetuado.



Tempo de aplicação do pulso de potencial

Figura 44: Dependência da corrente faradaica  $(I_F)$  e da corrente capacitiva  $(I_C)$  em função do tempo de aplicação de um pulso de potencial em uma solução em estado estacionário (A) e em sistemas em fluxo com vazões baixas (B) e mais elevadas (C) [122].

## 2. Parte Experimental

Um desenho esquemático da célula eletroquímica para BIA utilizado nos estudos analíticos é apresentado na Figura 45. A célula foi construída com um corpo de polimetilmetacrilato (PMMA) e conjunto de base e cobertura feito de politetrafluoretileno (PTFE). No corpo da célula, à altura de 2,5 cm da base, um orifício lateral foi feito com finalidade de drenar a solução excedente, mantendo o volume total de eletrólito em aproximadamente 40 mL. A base da célula possui um orifício de 7,0 mm de diâmetro através do qual o eletrodo de trabalho foi posicionado. A parte superior possui três orifícios, sendo os dois laterais para acomodar os eletrodos de referência e auxiliar, enquanto o orifício central foi utilizado para posicionar a seringa da pipeta, possuindo uma plataforma invertida utilizada como guia para seringa.



Figura 45: Célula para medidas em BIA utilizada nos experimentos para determinação amperométrica de ácido fólico em amostras farmacêuticas

Uma micropipeta eletrônica motorizada Eppendorf Multipette<sup>®</sup> stream foi utilizada para fazer as injeções. Esse dispositivo permite efetuar injeções de volumes que variam entre 1  $\mu$ L a 50 mL dependendo do volume total da seringa utilizada. Como o tempo de dispensa é o mesmo para todos os volumes de seringa, a pipeta também possibilita trabalhar numa variedade de vazões dentro da faixa de volume determinada por cada seringa. Nos experimentos realizados foi utilizada uma seringa de 1 mL, que permite a injeção de um volume mínimo de 10  $\mu$ L e uma faixa de vazão variando entre 25 e 274  $\mu$ L·s<sup>-1</sup>.

# 3. Determinação Amperométrica de Ácido Fólico em Amostras Farmacêuticas

O ácido fólico (AF), de nome IUPAC de ácido (2*S*)-2-[(4-{[(2-amino-4-hidroxipteridin-6-il)metil]amino}fenil)formamido]pentanodioico (Figura 46), de massa molar

441,37 g·mol<sup>-1</sup>, também conhecido com os nomes: folacina, ácido pteroil-L-glutâmico ou vitamina B9, é um composto solúvel em água, pertencente à classe de vitaminas do chamado complexo B, importante no processo de divisão e crescimento celular, uma vez que atua como coenzima em processos de transferência de radical metila envolvidos na síntese de bases púricas e pirimídicas requeridas para a síntese de ácido nucleicos. A deficiência de ácido fólico no organismo humano está associada à Doença de Alzheimer [127], doenças cardiovasculares [128, 129] e também à má formação neurológica durante o processo de gestação [130, 131].



*Figura 46: Fórmula estrutural do ácido (2S)-2-[(4-{[(2-amino-4-hidroxipteridin-6-il)metil]amino} fenil)formamido]pentanodioico, o ácido fólico.* 

Apesar de possuir ocorrência natural em alimentos de origem vegetal, alguns alimentos, como a farinha de trigo, são enriquecidos com esse composto, uma vez que a dieta humana moderna, rica em alimentos processados, não possui as quantidades diárias necessárias desse nutriente. Em virtude disso, acredita-se que a deficiência de ácido fólico seja o mais comum tipo de hipovitaminose em todo o planeta [132], sendo que a suplementação em forma de comprimidos é amplamente indicada, principalmente para
mulheres no período de gestação, fato que justifica a necessidade de um controle de qualidade seguro e confiável para fármacos à base desse suplemento.

Vários métodos são citados na literatura científica para a quantificação de ácido fólico em suplementação em forma de comprimidos e dentre eles destacam-se os que utilizam técnicas de espectrofotometria [133-135], fluorimetria [132], voltametria [136-139] e espectrometria de massas [140]. Nesta seção serão descritos os estudos para a proposta de um método analítico utilizando a cronoamperometria com eletrodo modificado com o complexo porfirínico polimérico [(Ni<sup>II</sup>TRPyP)-µ-O<sub>2</sub>]<sub>n</sub> associado à BIA, e a comparação com o método indicado pela Farmacopéia Brasileira, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) [141]

# 4. Objetivos

O objetivo deste capítulo restringe-se a aplicação analítica do eletrodo modificado com o filme porfirínico polimétrico  $[(Ni^{II}TRPyP)-\mu-O_2]_n$  como sensor na quantificação amperométrica de ácido fólico em comprimidos farmacêuticos em associação com Batch Injection Analysis, tomando como foco básico a otimização dos parâmetros eletroquímicos relacionados ao processo de oxidação do fármaco no eletrodo modificado e dos parâmetros hidrodinâmicos do sistema BIA. O desenvolvimento dessa metodologia é realizado juntamente com o desenvolvimento de um método para remoção de lactose, excipiente farmacêutico presente em todas as amostras, que atua como um interferente.

### 5. Resultados e Discussões

### 5.1. Voltametria Cíclica

Para obter informações sobre o comportamento redox do ácido fólico, visando posterior aplicação em BIA, realizaram-se estudos voltamétricos preliminares, recorrendo-se à voltametria cíclica. A princípio, foram realizadas varreduras com eletrodo de carbono vítreo polido, não modificado, no intervalo de potencial de 0 a 0,70 V com o objetivo de averiguar a existência de algum processo redox, possivelmente anódico, nessa região. Os voltamogramas apresentados na Figura 47a mostram a resposta eletroquímica para oxidação de ácido fólico em eletrodo de carbono vítreo não modificado.

Como observado no voltamograma cíclico da Figura 47a, a adição de solução de AF  $1,0 \ge 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , usando NaOH 0,1 mol $\cdot \text{L}^{-1}$  como eletrólito suporte, gerou uma resposta sutil de incremento de corrente sem a formação de picos bem definidos, variando em aproximadamente 0,06  $\mu$ A a 0,55 V. Embora seja difícil estabelecer a causa específica desse ligeiro aumento de sinal, que pode ter sido gerado por simples readequação da dupla camada elétrica após a adição de AF, que é um composto facilmente ionizável, também é plausível que este aumento seja proveniente da oxidação da algum grupo funcional presente no ácido fólico.



Figura 47: voltamogramas cíclicos registrados para a oxidação de ácido fólico em eletrodo de carbono vítreo (a) não modificado e (b) modificado com  $[(Ni^{II}TRPyP)-\mu-O_2]_n$  em eletrólito NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> antes (----) e após (----) a adição de solução padrão de AF. v: 0,05 V·s<sup>-1</sup>;  $[AF]_a=1,0 \times 10^{-3}$  mol·L<sup>-1</sup>;  $[AF]_b=2,0 \times 10^{-4}$  mol·L<sup>-1</sup>.

Na Figura 47b são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos utilizando o eletrodo modificado com filme porfirínico  $[(Ni^{II}TRPyP)-\mu-O_2]_n$ . O voltamograma em preto apresenta o comportamento característico do eletrodo modificado em meio de NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup>, composto por um par redox reversível com pico de oxidação em 0,480 V e de redução 0,413 V. Após a adição de solução de AF 2,0 x 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup>, observa-se o aumento de aproximadamente 1  $\mu$ A na corrente de pico anódico, acompanhado de um deslocamento de 9 mV no potencial de pico, e também uma sutil diminuição da corrente de redução durante a

varredura reversa, caracterizando um efeito eletrocatalítico para a oxidação de ácido fólico mediado pelo par Ni<sup>III</sup>/Ni<sup>II</sup> contidos no filme polimérico.

A Figura 48 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados para adições de solução padrão de ácido fólico em concentrações crescentes  $(1,0 \times 10^{-4} \text{ a } 5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$  em meio de NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> sobre o eletrodo modificado. Observa-se um nítido deslocamento do potencial de pico de oxidação a cada adição, não sendo observado comportamento similar nos picos de redução durante a varredura reversa. Tal comportamento também foi observado por Quintino et al. [142] durante a oxidação de açúcares utilizando o mesmo filme porfirínico, sendo esse fenômeno atribuído a processos que poderiam afetar à transferência de carga, tornando-a mais lenta. De fato, como a transferência de carga em eletrodos modificados com filmes poliméricos tende a se propagar por meio de difusão interna, dessa forma, produtos de oxidação podem ficar retidos no interior do filme por processos de adsorção, dificultando o transporte de íons para a compensação de carga [143], requerendo assim, um sobrepotencial maior para realizar a transferência eletrônica. A possibilidade de deslocamento de potencial por queda ôhmica (RI) é improvável, uma vez que o incremento de corrente por adição tem magnitude relativamente baixa, além disso, a solução eletrolítica é suficientemente condutora. Ainda assim, a ocorrência desse deslocamento não afetou a reprodutibilidade do sinal de corrente.



Figura 48: Voltamogramas cíclicos registrados para eletrodo de carbono vítreo modificado com  $[(Ni^{II}TRPyP)-\mu-O_2]_n$  em eletrólito NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> (·····) e adições crescentes de solução de AF contendo 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 x 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> (·····) v: 0,05 V·s<sup>-1</sup>. Detalhe: curva de calibração.

Observa-se também a correlação linear entre corrente de pico e concentração do analito dentro da faixa considerada. No detalhe da Figura 48 encontra-se a curva analítica representada pela seguinte equação:  $I = (4,46 \pm 0,04) \times 10^{-3} \times [AF] - (4,00 \pm 0,01) \times 10^{-8}$ , com coeficiente de correlação linear  $R^2 = 0,999$ , entre sinal de corrente e concentração de ácido fólico na faixa de concentração avaliada.

## 5.2. Pré-tratamento de amostras farmacêuticas contendo ácido fólico

As amostras comerciais (comprimidos) analisadas continham, além do ácido fólico (princípio ativo), quantidade significativa de lactose como parte do excipiente. Uma vez que o eletrodo modificado possibilita a oxidação de diferentes carboidratos, a lactose [142] presente nos comprimidos é um interferente em potencial para as análises eletroquímicas. Dessa forma,

um procedimento experimental para remoção de lactose foi proposto com base na precipitação, na forma de complexo, com íons  $Ca^{2+}$  em meio alcalino [144, 145].

O procedimento proposto segue o fluxograma apresentado no Esquema 1. Dez comprimidos foram macerados, aproximadamente 150 mg deste material foram pesados precisamente, transferidos para 5,0 mL de NaOH 1,0 mol·L<sup>-1</sup>, sendo então os excipientes insolúveis separados do sobrenadante por centrifugação a 5000 rpm durante 5 minutos. A este sobrenadante foram adicionados 5,0 mL de CaCl<sub>2</sub> 1,0 mol·L<sup>-1</sup>. Novo precipitado de aparência leitosa foi formado. Esta solução foi centrifugada a 8000 rpm durante 5 minutos para a separação do complexo Ca-lactose e do Ca(OH)<sub>2</sub> formados. Então, uma alíquota de 500 µL do sobrenadante foi retirada e diluída em eletrólito suporte em um balão de 5,00 mL, sendo esta a solução final analisada por amperometria associada a BIA.



Esquema 1: Fluxograma para remoção de lactose em amostras farmacêuticas contendo AF.

### 5.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os resultados das análises das amostras farmacêuticas por BIA foram comparados com o método recomendado para doseamento segundo a Farmacopeia Brasileira [141] para comprimidos contendo ácido fólico utilizando HPLC. Para tal foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu LC-10 AS equipado com coluna C18 com detecção espectrofotométrica em 283 nm.

### 5.4. Batch Injection Analysis

Os resultados a seguir ilustram o efeito dos principais parâmetros relativos à técnica amperométrica associada à BIA. Tais parâmetros (potencial aplicado, volume injetado e velocidade de injeção). foram investigados a fim de encontrar as melhores condições para a determinação de ácido fólico. Foram também averiguados o intervalo de linearidade, repetibilidade e frequência de amostragem. Posteriormente, as amostras foram submetidas à análise.

Em todos os experimentos, a distância entre o eletrodo e a ponta da pipeta foi mantida fixa no valor convencional de 2,0 mm [114-116, 142], dado que a essa distância, a diluição da zona de amostra e os efeitos hidrodinâmicos de retorno são minimizados para eletrodos de 3 mm de diâmetro.

Os estudos realizados sob condição hidrodinâmica para avaliação do potencial ótimo aplicado, foram feitos injetando em triplicata a solução padrão de ácido fólico  $1,0 \ge 10^{-5} \mod \cdot L^{-1}$ , variando-se o potencial de 0,300 a 0,575 V *vs* Ag/AgCl(KCl<sub>sat</sub>) em intervalos de 25 mV. O perfil de voltamograma hidrodinâmico apresentado na Figura 49 (círculo preenchido) mostra que houve um aumento de corrente com o incremento do potencial aplicado em toda a faixa estudada. Entretanto, analisando a corrente de fundo no mesmo intervalo (círculo não preenchido), observa-se que a mesma apresenta uma maior variação de magnitude no

intervalo acima de 0,50 V, indicando que o sinal de fundo deixa de ser puramente de natureza capacitiva nessa região (também observado na Figura 47b). A partir desse ponto, a corrente de fundo torna-se elevada e suscetível a variações de magnitude, resultado que pode ser observado pelo desvio padrão das replicatas (representado pela barra de erro). Como esses resultados estão em concordância com os resultados para voltametria cíclica, definiu-se 0,50 V como valor de potencial a ser utilizado nos experimentos seguintes.



Figura 49: Influência da variação do potencial aplicado sobre a magnitude corrente de pico na injeção em triplicata de solução padrão de AF 1,0 x  $10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado [(Ni<sup>II</sup>TRPyP)- $\mu$ -O<sub>2</sub>]<sub>n</sub> em NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup>. (•) Sinal analítico subtraído de linha base; (•) corrente de fundo. Volume injetado: 100  $\mu$ L; Velocidade de injeção: 70  $\mu$ L·s<sup>-1</sup>.

Outros parâmetros, como os efeitos da velocidade de injeção da pipeta programável na magnitude do sinal analítico e o efeito do volume injetado, foram avaliados variando-os de 25 a 274  $\mu$ L·s<sup>-1</sup> e de 10 a 140  $\mu$ L, respectivamente. Na Figura 50 são apresentados os resultados de corrente em relação à velocidade de injeção, de 25  $\mu$ L·s<sup>-1</sup> até o máximo valor de velocidade disponível pela pipeta (274  $\mu$ L·s<sup>-1</sup>). Como não foram observadas variações

significativas de sinal que indicassem lixiviação do filme para esse valor vazão este foi considerado adequado e fixado para os estudos subsequentes.



Figura 50: Influência da variação da velocidade de injeção sobre a magnitude corrente de pico na injeção em triplicata de solução padrão de AF 1,0 x  $10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado [(Ni<sup>II</sup>TRPyP)- $\mu$ -O<sub>2</sub>]<sub>n</sub> em NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup>. E<sub>aplicado</sub>: 0,50 V vs Ag/AgCl(KCl<sub>sat</sub>); Volume injetado: 100  $\mu$ L.

No estudo da variação do volume de injeção, mostrado na Figura 51, o incremento de corrente ocorre até 100  $\mu$ L. Em valores de volume menores que este o efeito a diluição da zona de amostra pelo eletrólito é significativo. Após 100  $\mu$ L, a magnitude de corrente média se mantém praticamente constante, sendo esse valor o escolhido por apresentar o maior ganho de sinal (intensidade de corrente) para o menor volume de amostra.



Figura 51: Influência da variação do volume injetado sobre a magnitude corrente de pico na injeção em triplicata de solução padrão de AF 1,0 x  $10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado  $[(Ni^{II}TRPyP)-\mu-O_2]_n$  em NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup>.  $E_{aplicado}$ : 0,50 V vs Ag/AgCl(KCl<sub>sat</sub>); Velocidade de injeção: 274  $\mu$ L·s<sup>-1</sup>.

Para avaliação do intervalo de linearidade, um conjunto de experimentos em triplicata, sob as condições otimizadas para BIA, ( $E_{aplicado} = 0,50$  V volume injetado = 100 µL·; velocidade de injeção = 274 µL·s<sup>-1</sup>) com o eletrodo de carbono vítreo modificado, foram realizadas injeções utilizando soluções padrão de ácido fólico com concentrações variando de 1,0 x 10<sup>-6</sup> a 1,0 x 10<sup>-3</sup> mol·L<sup>-1</sup> em NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup>. O amperograma e a curva analítica (em detalhe) obtidos nesse experimento são mostrados na Figura 52.



Figura 52: Resposta amperométrica de injeções em triplicata de solução padrão de AF com concentração variando de 1,0 x  $10^{-6}$  a 1,0 x  $10^{-3}$  mol·L<sup>-1</sup>.  $E_{aplicado}$ : 0,50 V vs Ag/AgCl<sub>(KClsat.)</sub>; Velocidade de injeção: 274  $\mu$ L·s<sup>-1</sup>.; Volume injetado: 100  $\mu$ L. Detalhe: curva de calibração.

Este estudo mostrou a existência de uma relação linear entre sinal de corrente e concentração de ácido fólico ao longo da faixa de  $1,0 \ge 10^{-6}$  a  $2,0 \ge 10^{-4}$  mol·L<sup>-1</sup> representada pela equação de reta I =  $(2,9 \pm 0,1) \ge 10^{-2}$  [AF] +  $(1,9 \pm 0,8) \ge 10^{-8}$  com R<sup>2</sup> = 0,987. Para valores de concentração acima dessa faixa, a relação entre corrente e concentração de ácido fólico desvia-se do comportamento linear. A partir do coeficiente angular (*a*) resultante e desvio padrão do branco (*sd*), foram estimados os limites de detecção (LD = 3 x sd/a) em 7,37 x  $10^{-7}$  mol·L<sup>-1</sup> e quantificação (LQ= 10 x sd/a) de 2,47 x  $10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup>. Fatores que dificultam o transporte de carga dentro do filme polimérico, como discutido anteriormente, podem ser a principal causa dos desvios de linearidade para concentrações mais elevadas. Uma vez que em amperometria se trabalha com valores fixos de potencial e o sobrepotencial para oxidação de ácido fólico fólico é deslocado para valores mais positivos, fica evidente que a magnitude de

corrente no potencial usado diminui, já que este potencial é relativamente menos favorável à oxidação de ácido fólico.

A repetibilidade das injeções foi avaliada através do desvio padrão relativo (DPR) para 30 injeções sucessivas de soluções de ácido fólico  $1,0 \ge 10^{-5} \mod L^{-1}$ . Os resultados para esses experimentos são apresentados no amperograma da Figura 53, no qual a corrente de pico média avaliada foi de 3,62  $\ge 10^{-7}$  A, apresentando um desvio padrão de 6,07  $\ge 10^{-9}$  A, resultando em um DPR de 1,67 %. Pelo perfil do sinal transiente foi analisada a frequência de amostragem (*f*), correspondente ao inverso do tempo de limpeza (*t*<sub>L</sub>) necessário para a corrente ir do seu valor máximo a 5% desse valor. De acordo com os resultados, *t*<sub>L</sub> corresponde a um intervalo de 10,0 s, estimando-se uma frequência de amostragem teórica máxima de aproximadamente 360 amostras h<sup>-1</sup>.



Figura 53: Resposta amperométrica para 30 injeções consecutivas de AF 1,0 x  $10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> realizadas para estudo de repetibilidade.  $E_{aplicado}$ : 0,50 V vs Ag/AgCl<sub>(KClsat.)</sub>; Velocidade de injeção: 274  $\mu$ L·s<sup>-1</sup>.; Volume injetado: 100  $\mu$ L. Detalhe: Sinal transiente da  $10^{a}$  injeção e o intervalo de tempo de limpeza ( $t_{L}$ ).

A Figura 54 representa a resposta amperométrica obtida com as amostras comerciais  $(S_1, S_2 \in S_3)$ , precedido e seguido por uma série de injeções em triplicata de soluções padrão de ácido fólico (a-f) em NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> sob as condições otimizadas. É possível observar um comportamento linear entre a corrente e a concentração do analito ao longo de um intervalo de concentração de 10-100 µmol·L<sup>-1</sup>, com uma curva de calibração apresentando equação de reta I =  $(2,88 \pm 0,01) \times 10^{-2} + (3,7 \pm 0,8) \times 10^{-8} (R^2 = 0,999)$ .



Figura 54: Resposta amperométrica para injeções em triplicada de 100  $\mu$ L de soluções padrão de AF nas concentrações de (a) 1,0 x 10<sup>-5</sup>; (b) 2,0 x 10<sup>-5</sup>; (c) 4,0 x 10<sup>-5</sup>; (d) 6,0 x 10<sup>-5</sup>; (e) 8,0 x 10<sup>-5</sup>; (f) 1,0 x 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> e amostras farmacêuticas comerciais (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> e S<sub>3</sub>). E<sub>aplicado</sub>: 0,50 V vs Ag/AgCl<sub>(KClsat.)</sub>; Velocidade de injeção: 274  $\mu$ L·s<sup>-1</sup>.; Volume injetado: 100  $\mu$ L. No detalhe: Curva de calibração.

A Tabela 2 mostra os resultados das análises para as três amostras comerciais na forma de comprimidos, realizada por BIA e por HPLC, método descrito pela Farmacopéia Brasileira. Os resultados obtidos pelos dois métodos foram comparados aplicando-se o teste *t* pareado, utilizado para dois métodos diferentes ( $t_{EXPERIMENTAL} = 1,222$  e  $t_{TABELADO} = 4,303$ ). Como os valores de  $t_{EXPERIMENTAL}$  obtidos são menores que o  $t_{TABELADO}$ , pode-se concluir que

os resultados obtidos na determinação de ácido fólico pelo método proposto e por cromatografia não apresentaram diferenças significativas, a um nível de confiança de 95%.

Tabela 2: Resultados da análise das amostras de ácido fólico em amostras farmacêuticas pelo método proposto e pelo método recomendado pela Farmacopeia Brasileira (Resultados expressos em média ± desvio padrão, em mg).

	<b>BIA-amperometria</b>	CLAE	Valor tabelado
Amostra S <sub>1</sub>	$(5,04 \pm 0,03)$	$(4,\!99\pm0,\!04)$	5,00
Amostra S <sub>2</sub>	$(1,\!99\pm0,\!01)$	$(2,03 \pm 0,02)$	2,00
Amostra S <sub>3</sub>	$(5,02 \pm 0,01)$	$(5,\!04\pm0,\!04)$	5,00

# 6. Conclusões

A modificação de eletrodo de carbono vítreo com filme polimérico de porfirina de níquel tetrarrutenada,  $[\mu-O_2-NiTPyP{Ru(bipy)_2Cl}_4]_n$ , foi aplicada no desenvolvimento de uma metodologia para a quantificação amperométrica de ácido fólico em amostras farmacêuticas. Além disso, também foi proposto um procedimento para a remoção de lactose das amostras, um interferente em potencial nas análises amperométricas, sendo que tal procedimento mostrou-se bastante eficiente. Dado o perfil voltamétrico do sinal de oxidação de ácido fólico, conclui-se que o processo é mediado por espécies Ni<sup>III</sup> presentes no filme porfirínico a partir de um mecanismo eletrocatalítico clássico. O eletrodo modificado foi associado a um sistema BIA com a finalidade de explorar o desempenho do sensor, de forma que essa combinação mostrouse bastante favorável para sua aplicação em controle de qualidade, possuindo baixo limite de detecção (7,37 x 10<sup>-7</sup> mol·L<sup>-1</sup>) e elevada frequência de amostragem (até 360 h<sup>-1</sup>).

CAPÍTULO V: Estudo da Atividade Nitrito-Redutase de Carreadores de Oxigênio Baseados em Hemoglobina (HBOCs) Envolvendo Redução Eletrocatalítica Mediada por Heme-Fe<sup>1</sup>

## 1. Introdução

## 1.1. Hemoglobina

A hemoglobina (Hb) é uma proteína com papel fundamental na oxigenação dos tecidos do corpo humano, possui peso molecular de 64 KDa e é constituída por quatro subunidades de cadeias polipeptídicas (duas  $\alpha$  e duas  $\beta$ ), formando um tetrâmero, com cada uma das subunidades contendo um componente prostético heme (protoporfirina IX complexada a Fe<sup>II</sup>), conforme ilustrado na Figura 55, que é o componente responsável pela ligação reversível da proteína com o oxigênio molecular, formando a oxihemoglobina (OxiHb). Adicionalmente, a hemoglobina pode ser considerada um sistema químico supramolecular natural, cujas atividades transportadora e catalítica são relacionadas com a interação entre o grupo heme e a cadeia proteica.



Figura 55: Estruturas da hemoglobina e do grupo prostético heme. Figura adaptada da referência [27].

A hemoglobina humana não possui uma única estrutura, podendo apresentar diversas variantes de ocorrência natural [146]. A forma mais comum de hemoglobina humana é a variante  $A_0$  (HbA<sub>0</sub>), que representa de 95-98% da hemoglobina encontrada em indivíduos

adultos, enquanto a variante  $A_2$ , corresponde de 2-3% da hemoglobina total. A hemoglobina  $A_2$  (HbA<sub>2</sub>), diferentemente da HbA<sub>0</sub>, possui duas cadeias proteicas  $\alpha$  e duas  $\delta$ . A função biológica dessa variante ainda não é muito bem conhecida, embora o aumento do seu nível normal no sangue esteja relacionado com algumas patologias [147].

Outra forma variante de hemoglobina é a do tipo S (HbS) que, embora sua diferença em relação ao HbA<sub>0</sub> seja muito sutil, pode acarretar em um processo anormal de transporte de oxigênio, por se aglutinar na forma de polímero e distorcer a forma normal das hemácias, causando a chamada anemia falciforme. A HbS também possui um conjunto de duas cadeias  $\alpha$  e duas  $\beta$ , entretanto, devido a uma mutação genética, ocorre a substituição de um único aminoácido na cadeia  $\beta$ : o ácido glutâmico na sexta posição da cadeia é substituído por valina [148].

### 1.2. Transporte de oxigênio e mecanismo cooperativo

O mecanismo de transporte de oxigênio pela hemoglobina está diretamente relacionado com as alterações conformacionais da proteína, de forma que ela apresenta, basicamente, dois tipos de estrutura quaternária: o estado "R" (relaxado), que tem maior afinidade pelo oxigênio, e estado "T" (tenso). Esses estados são relacionados com a disponibilidade do grupo prostético heme, que dependem principalmente da concentração de oxigênio.

A hemoglobina é considerada uma proteína alostérica, já que ela altera o seu estado conformacional quando se liga a seu substrato. Uma vez que o  $O_2$  se liga a um sítio ativo (heme) de uma das subunidades da hemoglobina, é induzida uma alteração conformacional em outra subunidade (sinalização), aumentando a sua afinidade por  $O_2$ , ou seja, a mudança da estrutura quaternária de "T" para "R" é induzida pelo próprio oxigênio. Esse processo é denominado mecanismo cooperativo [149, 150].

O grupo heme é ligado à cadeia proteica da hemoglobina através da coordenação do grupo imidazol, de um resíduo histidina, no sítio de coordenação axial do íon Fe<sup>II</sup>. Uma vez que o íon metálico, nesse estado de oxidação, é muito volumoso para a cavidade porfirínica, este fica posicionado 0,4 Å para fora do plano do anel (Figura 56a). Essa configuração caracteriza o estado quaternário "T". A coordenação do O<sub>2</sub> ocorre pelo sítio de coordenação disponível, também axial, de forma que o estado de oxidação do íon metálico é alterado para Fe<sup>III</sup>, diminuído seu raio e favorecendo seu posicionamento para dentro da cavidade porfirínica, de forma que o resíduo de histidina move-se com ele, consequentemente, a cadeia proteica também sofre alteração conformacional, propagando esse efeito para as outras subunidades e para os respectivos grupos prostéticos (sinalização), favorecendo a ligação destes com outras moléculas de O<sub>2</sub>, até a saturação total dos sítios, configurando o estado quaternário "R" [151]. A transição entre estados conformacionais "T" e "R" é ilustrada na Figura 56b.



Figura 56: (a) Mecanismo de ligação do grupo heme ao oxigênio molecular e sinalização na cadeia proteica; (b) variação conformacional do estado quaternário "T" (tenso) para o estado "R" (relaxado). Figura 2b retirada da referência [151].

### 1.3. Hemoglobina e a vasoatividade

Embora o papel principal da hemoglobina seja o transporte eficiente de oxigênio, essa proteína também exerce uma ação importante na vasodilatação e vasoconstrição dos vasos sanguíneos devido à sua interação com o óxido nítrico, NO.

O NO é um regulador crucial na homeostase vascular e do grau de constrição dos vasos sanguíneos sob condições basais: quando o NO atravessa o endotélio (a camada celular que reveste vasos sanguíneos) para o músculo liso vascular, este estimula diretamente a enzima guanilato ciclase, iniciando assim a formação de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), resultando no relaxamento da musculatura vascular (vasodilatação) [152].

O NO produzido pelo endotélio pode ser oxidado a nitrito pela ceruloplasmina plasmática ou pelo oxigênio dissolvido. O nitrito é então facilmente transportado pelo plasma para outras partes do corpo. Durante um curto intervalo de tempo em que ocorre a liberação de O<sub>2</sub> pela hemoglobina, o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> pode ser reduzido novamente a NO pela hemoglobina, agora não oxigenada, chamada de desoxihemoglobina (DesoxiHb). A redução do nitrito ocorre através de uma reação mediada por Fe<sup>II</sup>-heme, que é oxidado a Fe<sup>III</sup>-heme, formando a Metahemoglobina (MetaHb) [148, 153-158]. Dessa maneira, a hemoglobina realiza uma função indireta na vasoatividade, colaborando também para o transporte indireto, armazenamento e disponibilidade de NO para os outros tecidos. Entretanto, o óxido nítrico também é suscetível a se ligar irreversivelmente com a Fe<sup>II</sup>-desoxihemoglobina, formando o complexo ferro-nitrosil (HbFe<sup>II</sup>-NO), sendo facilmente inativado e, dessa forma, causando vasocontrição. As reações de redução de nitrito e formação do complexo são representadas nas reações químicas 1 e 2 a seguir:

$$NO_2^- + HbFe^{II} + H^+ \rightarrow NO + HbFe^{III} + OH^ k_1 = 0.25 \ mol \cdot L^{-1} \cdot s^{-1}$$
 (Reação 1)

NO +HbFe<sup>II</sup> 
$$\rightarrow$$
 HbFe<sup>II</sup>NO  $k_2 = 1 \times 10^7 \text{ mol} \cdot L^{-1} \cdot s^{-1}$  (Reação 2)

Em eritrócitos normais, a membrana celular atua como uma barreira natural, dificultando a entrada e saída de NO na célula e tornando processo de inativação de NO mais lento [159]. Como mostrado na Figura 57, a disponibilidade de NO depende da velocidade de reação da formação do complexo HbFe<sup>III</sup>-NO e do eficiente transporte e redução de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.



Figura 57: Mecanismo de vasorregulação através do transporte NO e suas interações com a hemoglobina.

# 1.4. Carreadores de Oxigênio Baseados em Hemoglobina (HBOCs)

Como alternativa ao transplante convencional de tecido sanguíneo envolvendo eritrócitos (células vermelhas), o desenvolvimento dos então denominados Carreadores de Oxigênio Baseados em Hemoglobina (HBOCs), tem se tornado um campo de pesquisa promissor, de forma que esses carreadores têm sido utilizados com sucesso em muitas aplicações médicas como substituinte ao sangue [160]. Os HBOCs são compostos baseados na modificação química da cadeia proteica da hemoglobina a fim de melhorar as propriedades relacionadas ao transporte de oxigênio, pela a estabilização do estado "R" em relação ao estado "T", uma vez que, no primeiro, os grupos heme estão mais estericamente disponíveis para se ligarem ao oxigênio molecular.

As aplicações de HBOCs têm se limitado a situações em que haja risco de vida, como isquemia, choque hemorrágico, que é a principal causa de morte em vítimas de politraumatismo, ou situações cirúrgicas que requerem sangue em caráter emergencial [161, 162]. Além disso, algumas outras vantagens podem ser atribuídas aos HBOCs em relação ao uso convencional de tecido sanguíneo [149, 150], tais como:

- Captação e transporte de oxigênio similar à hemoglobina natural;
- Compatibilidade universal: Uma vez que são baseados em Hb purificadas, HBOCs não possuem antígenos relacionados aos tipos sanguíneos;
- Disponibilidade: Não requer doador;
- Baixo risco de infecção: uma vez que não existe doador, a probabilidade de contágio por doenças infecciosas é praticamente nula;
- Maior período de armazenamento e e elevada estabilidade à temperatura ambiente.

Apesar dessas características interessantes, alguns aspectos relacionados à vasoatividade da hemoglobina e, consequentemente, de seus derivados, apresentam algumas limitações para o uso de HBOCs para aplicações terapêuticas, principalmente no que se refere às interações com óxido nítrico. Os HBOCs são utilizados como soluções livres, ou seja, não são confinados em células, facilitando a reação de NO com a desoxihemoglobina livre. Uma vez que a velocidade de formação de ferro-nitrosil para a hemoglobina livre é muito maior que a reação de redução de nitrito ( $k_2 >> k_1$ ), a etapa de redução de nitrito torna-se a etapa limitante para a disponibilidade de NO para a vasodilatação pela ação da gunilato ciclase. Dessa forma, a formação do complexo Fe<sup>II</sup>-NO e a consequente indisponibilidade de NO

podem causar problemas sérios relacionados ao aumento da pressão sanguínea devido ao aumento da vasoconstrição [163, 164]. Dessa forma, os HBOCs devem ser planejados de forma a minimizar esse efeito na vasoatividade.

Outro problema associado ao uso da hemoglobina livre é a sua dissociação espontânea em espécies diméricas  $\alpha\beta$  que, embora possuam baixa toxicidade e sejam facilmente metabolizados no fígado, perdem sua funcionalidade no sistema circulatório como carreador de oxigênio, embora sua vasoatividade seja mantida em certo nível [165]. Modificações químicas como o uso de agente de ligação cruzada ou reticulação (*cross-linking*) entre cadeias  $\alpha\alpha$  ou  $\beta\beta$  são utilizadas para minimizar esse problema [166].

Os procedimentos de estabilização do estado quaternário "R" também são válidos para diminuir a vasocontrição. Uma vez que, nessa conformação, a hemoglobina apresenta diminuição de potencial redox para os grupos heme, estes estão mais disponíveis para se ligarem e reagir com o nitrito, fazendo com que a reação de redução seja termodinamicamente mais favorável [167]. Acredita-se que a diminuição do potencial redox também tenha como efeito o aumento da velocidade de reação, já que, para a hemoglobina, a reação de redução de nitrito pode possuir velocidades bem diferentes, dependendo do estado conformacional em que ela se encontra [168].

Alternativas para a diminuição da vasoconstrição intrínseca aos HBOCs são baseadas na sua modificação estrutural, de forma a reduzir a facilidade de difusão entre os tecidos. Estratégias como o aumento do peso molecular da proteína pela inserção de cadeias poliméricas [169-171] ou encapsulação [160, 172, 173] possuem potencial para atenuar a inativação de NO nas regiões endoteliais. Entretanto, essas características só podem ser testadas em sistemas *in vivo*.

Outra abordagem que vem se mostrando eficiente é baseada na modificação de cadeias proteicas da hemoglobina com cadeias conjugadas de polietileno glicol (PEG), sendo ou não

previamente reticuladas com 3,5 dibromosalicil fumarato (BDSF) ou 3,5 tetrabromosalicil benzolsulfona (TBSS), com o objetivo de minimizar a vasocontrição pelo aumento da velocidade de conversão de  $NO_2^-$  em NO comparada à hemoglobina natural, pelo aumento de estabilização do estado "R" e pelo aumento do peso molecular total e atenuação da dissociação em espécies diméricas. Lui e Kluger sintetizaram diversos derivados PEGlados [154, 157, 165], dos quais três foram utilizados no presente estudo:

- *Hb-PEG5K<sub>2</sub>*: Hemoglobina não reticulada, conjugada com duas cadeias PEG (com peso molecular numérico médio, Mn, de 5000) via maleimida nos resíduos de cisteína na posição 93 (Cys93) das cadeias proteicas β (reação mostrada na Figura 59), PM = 74 kDa.
- *αα-Hb-PEG5K<sub>2</sub>*: Hemoglobina reticulada com BDSF entre os resíduos de lisina na posição 99 (Lys99) as cadeias α (reação mostrada na Figura 59) e conjugada com duas cadeias de PEG (Mn = 5000) via maleimida nos resíduos de cisteína na posição 93 (Cys93) das cadeias proteicas β (reação mostrada na Figura 59), PM = 74 kDa.
- *BT-PEG5K<sub>4</sub>*: Variante baseada em um bis-tetrâmero (duas unidades proteicas) com reticulação intertetrâmeros via TBSS entre os resíduos de lisina na posição 82 (Lys82) das cadeias β, conjugada com quatro cadeias PEG (Mn = 5000) via maleimida nos resíduos de cisteína na posição 93 (Cys93) das cadeias proteicas β (reações mostradas na Figura 60), PM = 148 kDa.



Figura 58: Reação de reticulação de Hb com DBSF



Figura 59: Reação de PEGlação de Hb e αα-Hb para a formação de Hb-PEG5K<sub>2</sub> e αα-Hb-PEG5K<sub>2</sub>



Figura 60: Reações de reticulação inter tetrâmeros e PEGlação de Hb para a formação de BT-Hb-PEG5K<sub>4</sub>.

#### 2. Objetivos

A cinética da reação de redução de nitrito por hemoglobina e HBOCs é geralmente avaliada por técnicas espectroscópicas baseadas na reação fisiológica mediada por Fe<sup>II</sup>-heme. Entretanto, esses procedimentos são laboriosos e requerem, em geral, 1 hora para obter curva de processo de reação [154, 157]. De forma mais conveniente, a reação de redução de nitrito pode ser facilmente realizada por via eletroquímica, por eletrocatálise com mediação de reação por Fe<sup>I</sup>-heme utilizando eletrodos modificados com hemoglobina ou derivados [174-176]. Tal reação é mais rápida que a reação mediada por Fe<sup>II</sup>, possuindo maiores valores de constantes cinéticas, que podem ser facilmente medidas através da corrente catalítica por cronoamperometria. Dessa forma, nesse capítulo será discutida a avaliação da atividade nitriro-redutase relativa das hemoglobinas PEGladas: Hb-PEG5K<sub>2</sub>,  $\alpha\alpha$ -Hb-PEG5K<sub>2</sub> e BT-Hb-

PEG5K<sub>4</sub>, bem como hemoglobinas de ocorrência natural (HbA<sub>0</sub>, HbA<sub>2</sub> e HbS), via reação mediada por Fe<sup>I</sup>-heme. Tal estudo foi conduzido utilizando voltametria cíclica para um estudo semiquantitativo, utilizando os potenciais de pico dos processos redox do grupo heme como parâmetro termodinâmico relacionado ao comportamento cinético. A técnica de cronoamperometria também foi utilizada para a aquisição das constantes cinéticas de reação.

#### 3. Parte experimental

#### 3.1. Reagentes e Soluções

Fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), fosfato de potássio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>), acetona, brometo de didodecildimetiltrimetilamônio (DDAB) e as hemoglobinas HbA<sub>0</sub>, HbA<sub>2</sub> e HbS foram adquiridas da Sigma-Aldrish (Oakville, ON). As hemoglobinas PEGladas testadas, Hb-PEG5K<sub>2</sub>,  $\alpha\alpha$ -Hb-PEG5K<sub>2</sub> e BT-Hb-PEG5K<sub>4</sub>, foram sintetizadas seguindo os procedimentos da literatura [157, 177, 178]. Todas as soluções foram preparadas utilizando água purificada em sistema Cascada LS (Pall Co., NY) (resistividade  $\geq$ 18,2 MΩ cm). As soluções de NaNO<sub>2</sub> 0,1 mol·L<sup>-1</sup> e das proteínas (1,0 x 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup>) foram preparadas em tampão fosfato pH 7 contendo NaBr 50 x 10<sup>-3</sup> mol·L<sup>-1</sup>.

## 3.2. Procedimentos

### 3.2.1. Preparo e modificação de eletrodos

A modificação de eletrodos de carbono vítreo com filme de hemoglobinas foi realizada de acordo com o procedimento descrito na literatura [176]. Antes da modificação os eletrodos foram submetidos a polimento em suspensão de alumina (0,05 μm) e então lavados e sonicados em uma mistura 50:50 de acetona e água durante 10 minutos. Volumes iguais de

solução de DDAB 1,0 x  $10^{-2}$  mol·L<sup>-1</sup> e hemoglobina (1,0 x  $10^{-4}$  mol·L<sup>-1</sup>) foram misturados, sendo 5 µL dessa mistura dispersada na superfície do eletrodo. Em seguida, o eletrodo modificado foi seco a temperatura ambiente.

# 3.2.2. Instrumentação e medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas de voltametria cíclica e cronoamperometria foram realizadas utilizando um potenciostato Metrohm Autolab PGSTAT320N (Metrohm Switzerland). A célula eletroquímica consistia em um arranjo convencional de três eletrodos, utilizando Ag/AgCl(KCl 3,0 mol·L<sup>-1</sup>) como eletrodo de referência e um fio de platina como contra eletrodo. O eletrodo de trabalho (carbono vítreo modificado) tinha área de 0,071 cm<sup>2</sup>. As medidas foram conduzidas em eletrólito composto por tampão fosfato pH 7 contendo NaBr 50 x  $10^{-3}$  mol·L<sup>-1</sup>, na ausência de oxigênio dissolvido, que foi removido por purga de nitrogênio por 5 minutos realizada antes de cada medida, de modo a evitar a formação de oxihemoglobina. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos com velocidade de varredura de 0,1 V·s<sup>-1</sup> de 0,10 V a -1,25 V e os cronoamperogramas foram obtidos em potencial constante de -1,10 V durante 60 segundos, sendo esse potencial modulado para -0,60 V para verificar possível contaminação por oxigênio.

# 4. Resultados e Discussões

# 4.1. Voltametria cíclica

Com a finalidade de avaliar os processos redox em cada um das estruturas, a técnica de voltametria cíclica foi empregada. A Figura 61 apresenta as respostas voltamétricas para os eletrodos modificados com filmes de hemoglobinas naturais (HbA<sub>0</sub>, HbA<sub>2</sub> e HbS) e PEGladas ( $\alpha\alpha$ -Hb-PEG5K<sub>2</sub>, BT-Hb-PEG5K<sub>4</sub> e Hb-PEG5K<sub>2</sub>). Nos voltamogramas cíclicos, os picos

situados na região de potenciais mais negativos são atribuídos à oxidação e redução do par heme-Fe<sup>II</sup>/heme-Fe<sup>I</sup>, enquanto os picos da região de potenciais menos negativos, ao par heme-Fe<sup>III</sup>/ heme-Fe<sup>II</sup>. Os valores de potencial de pico adquiridos através do software GPES e os respectivos valores de  $E_{1/2}$  são apresentados na Tabela 3.



Figura 61: Voltamogramas cíclicos para eletrodos modificados com filmes de Hbs com DDAB em tampão fosfato pH 7 contendo NaBr 50 x  $10^{-3}$  mol·L<sup>-1</sup> a velocidade de varredura de 0,1 V·s<sup>-1</sup>: (a) HbA<sub>0</sub>, (b) HbA<sub>2</sub>, (c) HbS, (d)  $\alpha\alpha$ -Hb-PEG5K<sub>2</sub>, (e) BT-Hb-PEG5K<sub>4</sub> e (f) Hb-PEG5K<sub>2</sub>.

Hemoglobina	Potencial de pico / V					
	Fe <sup>II</sup> /	'Fe <sup>III</sup>	<b>E</b> <sub>1/2</sub>	Fe <sup>I</sup> /	FE <sup>II</sup>	<b>E</b> <sub>1/2</sub>
	Oxi	Red		Oxi	Red	
HbA <sub>0</sub>	-0,122	-0,215	-0,169	-0,057	-1,135	-1,096
$HbA_2$	-0,123	-0,216	-0,170	-1,025	-1,095	-1,060
HbS	-0,080	-0,195	-0,138	-1,003	-0,075	-1,039
aa-Hb-PEG5K <sub>2</sub>	-0,120	-0,201	-0,161	-1,020	-1,085	-1,053
BT-Hb-PEG5K4	-0,103	-0,201	-0,152	-0,998	-1,078	-1,038
Hb-PEG5K <sub>2</sub>	-0,067	-0,159	-0,113	-0,950	-1,030	-0,990

Tabela 3: Valores de potenciais de picos para os processos Fe-heme para as diferentes hemoglobinas e compostos derivados

Através de uma análise global, tomando como referência os valores de  $E_{1/2}$  da Tabela 3, é possível perceber que os compostos PEGlados possuem, como esperado, potenciais redox com valores menos negativos em comparação com a HbA<sub>0</sub> e HbA<sub>2</sub>, uma vez que o processo de PEGlação promove a estabilização do estado "R", aumentando a disponibilidade dos grupos heme, sendo a variante Hb-PEG5K<sub>2</sub> apresentando os menores valores (em módulo) de  $E_{1/2}$ . Dentro desse grupo, esses valores podem ser explicados pela presença de reticulação nas variantes  $\alpha\alpha$ -Hb-PEG5K<sub>2</sub> e BT-Hb-PEG5K<sub>4</sub>. O acoplamento molecular diminui a afinidade das subunidades  $\alpha$ , no caso da  $\alpha\alpha$ -Hb-PEG5K<sub>2</sub> [179], analogamente, o mesmo pode ser esperado para a reticulação via subunidades  $\beta$  na BT-Hb-PEG5K<sub>4</sub>. É esperado que as constantes de velocidade para redução de nitrito nesses filmes sigam uma tendência de acordo com seus potenciais redox, isto é, quanto menos negativo o potencial, maior a velocidade de reação de redução de nitrito. A variações de potencial redox nas variantes naturais HbA<sub>0</sub> e HbA<sub>2</sub> podem estar relacionadas com a suas variações estruturais, uma vez que se distinguem em suas estruturas secundárias ( $\alpha_2\beta_2$  na HbA<sub>0</sub> e  $\alpha_2\delta_2$  na HbA<sub>2</sub>), interferindo, em certo grau, na disponibilidade dos grupo heme, embora seja difícil estabelecer a causa das discrepância entre as variações de E<sub>1/2</sub> para os diferentes processos. Os baixos valores de potencial obtidos para o filme HbS/DDAB, em relação ao filme com HbA<sub>0</sub>, estão de acordo com os valores previstos na literatura [148]. Acredita-se que substituição do ácido glutâmico (hidrofílico) por valina (hidrofóbico) nas cadeias  $\beta$  influencia significativamente a conformação da cadeia proteica e, consequentemente, na disponibilidade dos grupos heme, embora HbA<sub>0</sub> e HbS possuam equilíbrio de afinidade por oxigênio similares. Entretanto, é de conhecimento que a HbS possui uma atividade nitrito-redutase superior à HbA<sub>0</sub>.

A Figura 62 apresenta os voltamogramas para os diferentes filmes de Hb registrados na presença de NaNO<sub>2</sub> em concentrações de 1,0 x  $10^{-3}$  a 10 x  $10^{-3}$  mol·L<sup>-1</sup>, a fim de avaliar a resposta eletroquímica na redução de nitrito mediada por Fe<sup>I</sup>-heme.

A presença de nitrito no meio resulta na ocorrência de dois processos, caracterizados por um pico de redução irreversível em aproximadamente 0,82 V, seguido de uma onda catódica mais intensa que se estende até o final da varredura. Ambos os processos são atribuídos à redução eletrocatalítica mediada pelo grupo heme [176]. Embora a redução de nitrito seja fisiologicamente mediada por Fe<sup>II</sup>-heme, os picos referentes ao processo Fe<sup>III</sup>/Fe<sup>II</sup>-heme permanecem inalterados, uma vez que a velocidade de varredura utilizada (100 mV·s<sup>-1</sup>) é muito elevada para a observação desse processo.



Figura 62: Voltamogramas cíclicos para eletrodos modificados com filmes de Hbs com DDAB na presença de NaNO<sub>2</sub> em concentrações crescentes  $(1,0 \times 10^{-3} \text{ a } 10 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot L^{-1})$  em tampão fosfato pH 7 contendo NaBr 50 x  $10^{-3}$  mol· $L^{-1}$ ; velocidade de varredura de 0,1 V·s<sup>-1</sup>: (a) HbA<sub>0</sub>, (b) HbA<sub>2</sub>, (c) HbS, (d)  $\alpha\alpha$ -Hb-PEG5K<sub>2</sub>, (e) BT-Hb-PEG5K<sub>4</sub> e (f) Hb-PEG5K<sub>2</sub>.

A Figura 63 mostra a relação entre a intensidade de corrente amostrada em -1,1 V e a concentração de NaNO<sub>2</sub> para cada um dos seis filmes estudados.



Figura 63: Dependência da corrente de redução em -1,1 V em relação à concentração de  $NaNO_2$  para as diferentes filmes Hb/DDAB.

A relação entre corrente e concentração apresentada na Figura 63 mostra uma dependência não linear, indicando uma provável saturação da capacidade de oxidação do filme em concentrações mais elevadas. O filme com a espécie Hb-PEG5K<sub>2</sub> apresentou a maior variação em relação à concentração de nitrito, seguido da BT-Hb-PEG5K<sub>4</sub> e  $\alpha\alpha$ -Hb-PEG5K<sub>2</sub>, confirmando a tendência dos potenciais redox para o grupo heme apresentada na Tabela 3. A variante HbS apresentou uma resposta de corrente consideravelmente baixa, embora apresentasse um conjunto de potenciais redox com valores menores em relação a  $\alpha\alpha$ -Hb-PEG5K<sub>2</sub> e equiparáveis a BT-Hb-PEG5K<sub>4</sub>. Já as variantes HbA<sub>0</sub> e HbA<sub>2</sub> apresentaram respostas similares, com menores variações de corrente, em concordância com o valores de potencias registrados para seus processos redox. A saturação do filme e o comportamento não linear em relação à concentração na faixa estudada podem ser interpretados como perda de eficiência de catálise devido à produção de NO, que se liga irreversivelmente a Fe<sup>II</sup>-heme,

sendo esse efeito mais evidente nos filmes que apresentaram maior intensidades de corrente e, consequentemente, uma maior geração de NO.

# 4.2. Cronoamperometria

A cronoamperometria foi aplicada na investigação do processo eletroquímico de redução de nitrito nos eletrodos de carbono vítreo modificados com os diferentes filmes de Hb/DDB. A reação eletrocatalítica geral para as hemoglobinas pode ser definida segundo a reações químicas 3 e 4.

$$HbFe^{II} + e^{-} \Longrightarrow HbFe^{I}$$
 (Reação 3)

$$NO_2^- + HbFe^I + H^+ \rightarrow NO + HbFe^{II} + OH^-$$
 (Reação 4)

Onde  $k_{obs}$  é constante de velocidade para a reação de redução de nitrito mediada por Fe<sup>I</sup>-heme. Estes valores foram calculados com base nas curvas apresentadas, de acordo com a Equação 1 (Equação 10 do capitulo II) [180].

$$i_{CAT}/i_l = \pi^{1/2} \gamma^{1/2} = (\pi k_{obs} C_A^0 t)^{1/2}$$
 (Eq. 1)

Onde:  $I_{CAT} \acute{e}$  a corrente catalítica na presença de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>;  $i_l$  é a corrente na ausência de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>; C é a concentração de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> em solução e *t*, o tempo.

A partir dos valores de coeficiente angular, *a*, das curvas  $I_{CAT}/I_l vs t^{1/2}$ , foram plotadas novas curvas *a vs C* para a obtenção dos valores de k<sub>obs</sub>. As Figura 64 Figura 65 apresentam as curvas cronoamperométricas obtidas a potencial fixado em -1,1 V para as Hbs naturais e PEGladas, respectivamente, em diferentes concentrações de NaNO<sub>2</sub> (7,5 x  $10^{-4}$  a 6,0 x  $10^{-3}$  mol·L<sup>-1</sup>) e respectivas curvas  $I_{CAT}/I_L$  vs te a vs C.



Figura 64: Cronoamperogramas (E = -1,1 V vs Ag/AgCl(KCl 3,0 mol·L<sup>-1</sup>)), curvas I vs t<sup>1/2</sup> e a vs  $[NaNO_2]^{1/2}$  registradas para eletrodos de carbono vítreo modificado com filmes de Hb/DDAB em tampão fosfato pH 7 contendo NaBr 50 x 10<sup>-3</sup> mol·L<sup>-1</sup> em concentrações crescentes de NaNO<sub>2</sub> (7,5 x 10<sup>-4</sup> a 6,0 x 10<sup>-3</sup> mol·L<sup>-1</sup>). (a) HbA<sub>0</sub>, (b) HbA<sub>2</sub> e (c) HbS.



Figura 65: Cronoamperogramas (E = -1,1 V vs Ag/AgCl(KCl 3,0 mol·L<sup>-1</sup>)), curvas I vs t<sup>1/2</sup> e a vs [NaNO2]<sup>1/2</sup> registradas para eletrodos de carbono vítreo modificado com filmes de Hb/DDAB em tampão fosfato pH 7 contendo NaBr 50 x 10<sup>-3</sup> mol·L<sup>-1</sup> em concentrações crescentes de NaNO<sub>2</sub> (7,5 x 10<sup>-4</sup> a 6,0 x 10<sup>-3</sup> mol·L<sup>-1</sup>). (a)  $\alpha\alpha$ -Hb-PEG5K<sub>2</sub>, (b) BT-PEG5K<sub>4</sub> e (c) Hb-PEG5K<sub>2</sub>.

Como pode ser observado, a corrente sob potencial aplicado (-1.1 V) de redução de nitrito aumenta com a concentração, em proporções diferentes para cada filme, quando o potencial aplicado é alternado para -0,6 V, a intensidade de corrente retorna a valores de linha base, indicando a ausência de oxigênio dissolvido. Os valores de  $k_{obs}$  são apresentados na Tabela 4, bem como os valores das constantes de velocidade, k, para redução de nitrito mediada por Fe<sup>II</sup>-heme para HbA<sub>0</sub> e e Hbs PEGladas utilizando a metodologia por espectroscopia.

Hemoglobina	$k_{obs}/ mol \cdot L^{-1} \cdot s^{-1}$	<b>k / mol·L<sup>-1</sup>· s<sup>-1</sup></b> [154]
$A_{0}$	(18,1 ± 0,6)	(0,25 ± 0,02)
$A_2$	$(16, 0 \pm 0, 8)$	-
S	(50,5 ± 0,9)	-
aa-Hb-PEG5K <sub>2</sub>	(136 ± 5)	(1,4 ± 0,03)
BT-Hb-PEG5K4	(160 ± 5)	(1,8 ± 0,05)
Hb-PEG5K <sub>2</sub>	(335 ± 8)	$(2,5 \pm 0,03)$

Tabela 4: Valores de  $k_{obs}$  para reação de redução de nitrito usando eletrodos de carbono vítreo modificados com os filmes de Hb/DDAB e valores de k para a reação mediada por  $Fe^{II}$ -heme para HbA<sub>0</sub> as Hbs PEGladas.

Pelos resultados mostrados na Tabela 4, pode-se dizer que os resultados obtidos por cronoamperometria estão de acordo com aqueles obtidos pela medida de corrente de redução utilizando voltametria cíclica. Com exceção da HbS, os valores de contantes de velocidade, k<sub>obs</sub>, seguem uma tendência inversamente proporcional à tendência apresentada para potenciais dos processos redox do grupo heme (Tabela 3). Também é possível perceber um aumento significante na eficiência eletrocatalítica das Hbs com a modificação das cadeias proteicas com PEG, de forma que a espécie Hb-PEG5K<sub>2</sub> mostrou-se acima de 18 vezes mais rápida que a HbA<sub>0</sub>, apresentando elevada constante de velocidade, seguida de BT-Hb-PEG5K<sub>4</sub> e αα-Hb-PEG5K<sub>2</sub>, indicando que não somente a PEGlação influencia na conformação da proteína, mas também o processo de reticulação das cadeias proteicas. O comportamento da HbS não segue a tendência das outras espécies, já que apresentou valores de potenciais redox significativamente baixos, mas valores de k<sub>obs</sub> não comparáveis com as espécies PEGlada, sugerindo que, para HbS, outros fatores além da mudança de conformação da proteína mos potenciais redox.
#### 5. Conclusões

A voltametria cíclica foi aplicada com sucesso no monitoramento dos potenciais redox dos processos relativos aos grupos heme e avaliação qualitativa da velocidade de redução de nitrito mediada por Fe<sup>I</sup>-heme em hemoglobinas naturais e PEGladas imobilizadas em superfície de carbono vítreo através de filmes com DDAB. Além disso, a técnica cronoamperométrica mostrou ser bastante satisfatória para a obtenção das constantes de velocidade de redução de nitrito, de forma que a metodologia apresentada pode ser aplicada para futuras investigações da atividade nitrito-redutase de novos potenciais HBOCs.

O processo in vivo é baseado na reação mediada por Fe<sup>II</sup>-heme, entretanto, como ambas as reações acontecem nos mesmos sítios independentemente do seu estado de oxidação (I ou II), é razoável a hipótese que a reatividade é dependente do ambiente conformacional da proteína nas duas situações. A adição de cadeias de PEG na estrutura da hemoglobina altera a disponibilidade dos grupos heme, favorecendo o estado quaternário "R", aumentando sua reatividade com nitrito e, consequentemente, as velocidades de reação. Dentre as espécies PEGladas, Hb-PEG5K<sub>2</sub> apresentou os menores valores de potencial redox para o grupo heme e os maiores kobs, seguida da αα-Hb-PEG5K2 e do bis- tetrâmero BT-Hb-PEG5K4. Tais características são favoráveis para a aplicação como HBOC com baixa vasoconstrição. Entretanto, a falta de reticulação em estrutura da Hb-PEG5K<sub>2</sub> desfavorece a sua aplicabilidade clínica pelo seu potencial risco de dissociação em espécies diméricas in vivo. Em contrapartida, a reticulação intraproteína entre subunidades  $\alpha$  parece influenciar mais significativamente o estado conformacional da proteína do que a reticulação interproteínas entre subunidades β, dados os valores de potenciais redox mais negativos e kobs menores da espécie  $\alpha\alpha$ -Hb-PEG5K<sub>2</sub> em relação à BT-Hb-PEG5K<sub>4</sub>, de forma que esta última apresenta as melhores características para aplicação clínica, pois, além promover rápida reação com o nitrito e reticulação, também possui elevado peso molecular (148 kDa).

## Considerações Finais e Perspectivas Futuras

#### Caracterização e aplicação de eletrodo modificado com $[\mu-O_2-NiTPyP{Ru(bipy)_2Cl}_4]_n$

Os estudos de caracterização química do filme eletroquimicamente gerado a partir da porfirina tetrarrutenada de níquel em meio alcalino sugeriram a formação de um polímero de coordenação eletroquimicamente ativo, estruturado a partir de subunidades porfirínicas conectadas por pontes μ-peroxo entre os átomos de níquel. O mecanismo proposto para a formação do polímero de coordenação mostra participação dos dois principais sítios da molécula em ação conjunta: o complexo periférico contendo rutênio, responsável pela geração da espécie ativadora do processo de polimerização, radical hidroxil; e os centros porfirínicos contendo níquel, responsável pela coordenação entre moléculas adjacentes via pontes μ-peroxo ao longo do eixo de *stacking*, gerando uma estrutura unidimensional. Esse mecanismo ilustra bem a capacidade de subunidades moleculares para a geração de novas propriedades.

Entretanto, os estudos abordados nessa tese apenas foram direcionados à caracterização química do material porfirínico, havendo uma necessidade de complementação por um estudo de caracterização eletroquímica do filme, contemplando um melhor entendimento nos mecanismo de transporte de carga. A aplicação desse filme polimérico como sensor amperométrico na quantificação de ácido fólico vislumbra uma das potencialidades do filme. Dessa forma, a condução de estudos mais profundos das propriedades eletroquímicas do filme porfirínico pode abrir novas perspectivas para novas aplicações, analíticas ou de outra natureza. A continuidade desses estudos deverá ser conduzida com a utilização de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS).

Alguns experimentos utilizando soluções contendo as porfirinas  $[NiTPyP{Ru(bipy)_2Cl}_{4}] \in [CoTPyP{Ru(bipy)_2Cl}_{4}] em meio alcalino para a produção de filmes em eletrodos também foram realizados. Os filmes resultantes apresentaram$ 

comportamento eletroquímico bastante similar aos hidróxidos mistos contendo níquel e cobalto [181]. Os voltamogramas registrados após modificação em meio alcalino, em diferentes proporções entre as porfirinas revelam que incorporação de  $[CoTPyP{Ru(bipy)_2Cl}^+_4]$  à solução precursora desloca os picos de corrente característicos do filme para potencias menos positivos. Também foi possível observar a diminuição gradativa de corrente de pico e de  $\Delta E_{a,c}$  com o aumento da proporção da porfirina de cobalto.

A composição e estrutura desse tipo de filme ainda não foram suficientemente estudadas, mas existe a possibilidade de que o mecanismo de formação apresente as mesmas tendências que o filme formado unicamente pela porfirina de níquel. Estudos de caracterização química mais profundos devem ser conduzidos para obter informações mais precisas sobre a composição desses filmes mistos, e deverão ser conduzidos concomitantemente com a caracterização eletroquímica. Em ambos os casos, não é clara a causa do deslocamento dos picos de oxidação à medida que concentrações maiores de analito estão presentes em solução. As dificuldades de transporte de carga através dos filmes formados pode ser a principal causa desta dificuldade. Para tentar entender um pouco melhor este aspecto, a preparação de filmes utilizando número de ciclos de eletropolimerização diferentes poderá indicar se a espessura dos filmes poliméricos é a principal causa desta variação ou se há outros aspectos mais relevantes.

#### Eletrodos modificados com Hbs para redução de nitrito

O sistema envolvendo variantes naturais e sintéticas de hemoglobina, imobilizadas em eletrodos, foi utilizado nos estudos eletroquímicos para avaliação da cinética de redução de nitrito, mostrando-se eficiente e de rápida execução, sendo as metodologias apresentadas promissoras para aplicação na seleção de HBOCs candidatos a aplicações clínicas. Além disso, permitiu um maior entendimento da eletroquímica associada ao grupo heme, como ela

é dependente das condições estruturais da cadeia proteica e como isso afeta as funções biológicas da proteína, de forma que possam ser manipuladas a fim de aumentar a sua eficiência. Ainda permanecem algumas dúvidas em relação à origem dos baixos potenciais de pico mostrados pelos eletrodos modificados com HbS. Apesar de apresentar potenciais equiparáveis às variantes sintéticas (Hb-PEG5K<sub>2</sub>,  $\alpha\alpha$ -Hb-PEG5K<sub>2</sub> e BT-PEG5K<sub>4</sub>), sua eficiência na redução de nitrito não segue a mesma tendência, indicando que outros fatores, além dos estruturais, possam estar correlacionados com os potenciais redox dessa proteína. Dessa forma, estudos adicionais devem ser direcionados a elucidação desse problema. Estima-se que medidas de resistência de transferência de carga EIS e ensaios com Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD), para estudo da estrutura quaternária, possam ser interessantes para esse tipo de estudo.

# Referências Bibiográficas

- 1. FREY, H.-H., et al., Characterization of a Copper Detecting Amperometric Electrode. *Electroanalysis*, 1998. vol. 10, n° 7, p. 480-485.
- COSTA, C.D.O., et al., Electrochemical Determination of Oncocalyxone A using an Ironphthalocyanine/Iron-porphyrin Modified Glassy Carbon Electrode. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 2008. vol. 19, nº 4, p. 697-703.
- 3. GUPTA, V.K., et al., Porphyrins as carrier in PVC based membrane potentiometric sensors for nickel(II). *Analytica Chimica Acta*, 1997. vol. 355, p. 33-41.
- 4. JAIN, A.K., et al., Macrocycle Based Membrane Sensors for the Determination of Cobalt(II) Ions. *The Analyst*, 1997. vol. 122, n° 6, p. 583-586.
- CERA, E.D., DOYLE, M.L., and GILL, S.J., Alkaline Bohr effect of human hemoglobin Ao. *Journal of Molecular Biology*, 1988. vol. 200, nº 5, p. 593–599.
- 6. ZHENG, G., SCHAEFER, M., and KARPLUS, M., Hemoglobin Bohr Effects: Atomic Origin of the Histidine Residue Contributions. *Biochemistry*, 2013. vol. 52, n° 47, p. 8539–8555.
- WINNISCHOFER, H. Interfaces e Dispositivos Baseados em Porfirinas Supramoleculares, São Paulo, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2004. Tese de Doutorado
- 8. TOYAMA, M.M., et al., Highly conductive electrostatically assembled porphyrazine films. *Electrochemistry Communications*, 2000. vol. 2, p. 749–753.
- ROCHA, J.R.C.D., et al., Charge transfer at electrostatically assembled tetraruthenated porphyrin modified electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2002. vol. 526, p. 69 /76.
- ARAKI, K., WAGNER, M.J., and WRIGHTON, M.S., Layer-by-Layer Growth of Electrostatically Assembled Multilayer Porphyrin Films. *Langmuir*, 1996. vol. 12, n° 22, p. 5393-5398.
- 11. SHUAI, Z., WANG, L., and SONG, C., *Theory of Charge Transfer in Carbon Electronic Materials*, ed. Spriger. 2012, New York.
- MAYERA, I., et al., Supramolecular Conformational Effects in the Electrocatalytic Properties of Electrostatic Assembled Films of Meso(3- and 4-Pyridyl) Isomers of Tetraruthenated Porphyrins. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 2005. vol. 16, n<sup>o</sup> 3, p. 418-425.

- 13. SANTOS, W.J.R., et al., Amperometric sensor for nitrite using a glassy carbon electrode modified with alternating layers of iron(III) tetra-(N-methyl-4-pyridyl)-porphyrin and cobalt(II) tetrasulfonated phthalocyanine. *Talanta*, 2006. vol. 70, n° 3, p. 588-594.
- ANGNES, L., et al., Electrochemical detection of NADH and dopamine in flow analysis based on tetraruthenated porphyrin modified electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 1996. vol. 329, p. 91-96.
- DUARTE, J.C., et al., A highly sensitive amperometric sensor for oxygen based on iron(II) tetrasulfonated phthalocyanine and iron(III) tetra-(N-methyl-pyridyl)-porphyrin multilayers. *Analytica Chimica Acta*, 2008. vol. 612, nº 1, p. 29-36.
- 16. GRIVEAU, S., et al., Comparative study of electropolymerized cobalt porphyrin and phthalocyanine based films for the electrochemical activation of thiols. *Journal of Materials Chemistry*, 2002. vol. 12, n° 2, p. 225-232.
- CHEN, S.-M., CHEN, Y.-L., and THANGAMUTHU, R., Electropolymerization of iron tetra(o-aminophenyl)porphyrin from aqueous solution and the electrocatalytic behavior of modified electrode. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2007. vol. 11, n° 10, p. 1441-1448.
- 18. HUANG, S.-C. and LIN, C.-Y., Reductive electropolymerization of N-methyl-3pyridylethynyl-porphyrins. *Chemical Communications*, 2015. vol. 51, p. 519-521.
- ESTEVES, C.H.A., et al., New composite porphyrin-conductive polymer gas sensors for application in electronic noses. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014. vol. 193, p. 136-141.
- 20. WINNISCHOFER, H., et al., Conduction and photoelectrochemical properties of monomeric and electropolymerized tetraruthenated porphyrin films. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2005. vol. 4, nº 4, p. 359.
- LEVERENZ, A., SPEISER, B., and HANACK, M., Cyclic voltammetry of Na[PcCo(CN)2] Analysis of adsorption phenomena during electro-oxidation. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1992. vol. 323, p. 275-287.
- 22. COLLMAN, J.P., et al., Synthetic, Electrochemical, Optical, and Conductivity Studies of Coordination Polymers of Iron, Ruthenium, and Osmium Octaet hylporphyrin. *Journal of American Chemical Society*, 1987. vol. 109, p. 4606-4614.
- 23. GIRAUDEAU, A., et al., A simple way for the electropolymerization of porphyrins. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2010. vol. 638, nº 1, p. 70-75.

- 24. CHEN, C.-T. and SUSLICK, K.S., One-dimensional coordination polymers: Applications to material science. *Coordination Chemistry Reviews*, 1993. vol. 128, p. 293-322.
- 25. SUSLICK, K.S., et al., The materials chemistry of porphyrins and metalloporphyrins. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2000. vol. 4, n° 407–413.
- MURRAY, R.W., EWLNG, A.G., and DUST, R.A., Chemically Modified Electrodes: Molecular Design for Electroanalysis. *Analytical Chemistry*, 1987. vol. 59, n° 5, p. 379A– 390A.
- 27. DURTS, R.A., et al., Chemically Modified Electrodes: Recommended Terminology and Definitions. *Pure and Applied Chemistry*, 1997. vol. 69, n° 6, p. 1317-1323.
- RASSAEI, L., SILLANPÄÄ, M., and MARKEN, F., Modified carbon nanoparticle-chitosan film electrodes: Physisorption versus chemisorption. *Electrochimica Acta*, 2008. vol. 53, n° 19, p. 5732–5738.
- 29. RÜDIGER, O., et al., Oriented Immobilization of Desulfovibrio gigas Hydrogenase onto Carbon Electrodes by Covalent Bonds for Nonmediated Oxidation of H2. *Journal of American Chemical Society*, 2005. vol. 127, nº 43, p. 16008–16009.
- 30. BLANKESPOOR, R., et al., Dense Monolayers of Metal-Chelating Ligands Covalently Attached to Carbon Electrodes Electrochemically and Their Useful Application in Affinity Binding of Histidine-Tagged Proteins. *Langmuir*, 2005. vol. 21, n° 8, p. 3362–3375.
- HEINEMAN, W.R., WIECK, H.J., and YACYNYCH, A.M., Polymer film chemically modified electrode as a potentiometric sensor. *Analytical Chemistry*, 1980. vol. 52, n° 2, p. 345–346.
- 32. FREITAS, K.H.G. and FATIBELLO-FILHO, O., Simultaneous determination of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) in food samples using a carbon composite electrode modified with Cu3(PO4)2 immobilized in polyester resin. *Talanta*, 2010. vol. 81, n° 3, p. 1102–1108.
- ANDRIEUX, C.P. and SAVEANT, J.M., Heterogeneous (Chemically Modified Electrodes, Polymer Electrodes) vs. Homogeneous Catalysis of Electrochemical Reactions *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1978. vol. 100, p. 263-270.
- 34. FORSTER, R.J., KEYES, T.E., and VOS, J.G., *Interfacial Supramolecular Assemblies*. 2003, Chichester: Willey & Sons.
- 35. RUBINSTEIN, I., *Pysical Electrochemistry. Principles, Methods, and Applications.* 1995, New York: Marcel Dekker.

- MATSUDA, H., AOKI, K., and TOKUDA, K., Theory of electrode reactions of redox couples confined to electrode surfaces at monolayer levels: Part I. Expression of the current-potential relationship for simple redox reactions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1987. vol. 217, nº 1, p. 1–13.
- 37. ANDREWS, L.C., *Special Functions of Mathematics for Engineers*. 2.a ed, ed. O.U. Press. 1998, Bellingham.
- GOUTERMAN, M., Spectra of Porphyrins. *Journal of Molecular Spectrocopy*, 1961. vol. 6, p. 138-163.
- 39. CAL, L.R. Síntese de bisporfirinas contendo o espaçador 2,2'-bipiridina: modelos na elaboração de sensores luminescentes de íons metálicos, São Paulo Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2008. Dissertação de Mestrado.
- 40. YANAGISAWA, S., et al., Intermolecular Interaction as the Origin of Red Shifts in Absorption Spectra of Zinc-Phthalocyanine from First-Principles. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2013. vol. 117, n° 44, p. 11246-11253.
- HUNTER, C.A. and SANDERS, J.K.M., The Nature of π-π Interactions. *Journal of American Chemical Society*, 1990. vol. 112, p. 5525-5534.
- 42. SMITH, E. and DENT, G., *Modern Raman Spectroscopy A Practical Approach*. 2005, Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- 43. ANDO, R.A. Espectroscopia Vibrcional, Raman Ressonante e Eletrônica de Nitroderivados de Sistemas Conjugados, São Pulo, Instituto de Química, Universisdade de São Paulo, 2005. Dissertação de Mestrado.
- RODRIGUES, A.D.G. and GALZERANI, J.C., Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 2012. vol. 34, nº 4, p. 4309-1-4309-9.
- 45. LARKIN, P.J., *Infrared and Raman Spectroscopy; Principles and Spectral Interpretation*. 2011, Waltham: Elsevier.
- 46. WEIL, J.A. and BOLTON, J.R., *Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical.* 2.a ed. 2007, Hoboken: John Willey & Sons, Inc.
- 47. BUETTNER, G.R., Spin trapping of the hydroxyl radical, in CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research, R.A. Greenwald, Editor. 1985, CRC Press: Boca Raton. p. 151-156.
- 48. BUETTNER, G.R., Spin trapping: ESR parameters of spin adducts. *Free Radical Biology & Medicine*, 1987. vol. 3, p. 259-303.

- BUETTNER, G.R. and MASON, R.P., Spin-Trapping Methods for Detecting Superoxide and Hydroxyl Free Radicals In Vitro and In Vivo, in Critical Reviews of Oxidative Stress and Aging: Advances in Basic Science, Diagnostics and Intervention, R.G.C.a.H. Rodriguez, Editor. 2003, World Scientific: New Jersey, London, Singapore, Hong Kong. p. 27-38.
- 50. QUINTINO, M.D.S.M. Desenvolvimento de Sensores Eletroquímicos Associados a Batch Injection Analysis (BIA) para Aplicações Analíticas, São Paulo, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2003. Tese de Doutorado
- 51. VIDOTTI, M., TORRESI, R., and TORRESI, S.I.C.D., Eletrodos Modificados por Hidróxido de Níquel: Um estudo de Previsão Sobre suas Propriedades Estruturais e Eletroquímicas Visando suas Aplicações em Eletroqcatálise, Eletrocromismo e Baterias Secundárias. *Química Nova*, 2010. vol. 33, nº 10, p. 2176-2186.
- 52. BRIGGS, G.W.D. and WYNNE-JONES, W.F.K., The Nickel Hydroxide Electrode; The Effects of Ageing—I X-Ray Diffraction Study of The Electrode Process. *Electrochimica Acta*, 1961. vol. 7, n° 3, p. 241-248.
- 53. KAMATH, P.V. and SUBBANNA, G.N., Electroless Nickel Hydroxide: Synthesis and Characterization. *Journal of Applied Electrochemistry*, 1992. vol. 22, n° 5, p. 478-482.
- 54. KIM, M.-S. and KIM, K.-B., A Study on the Phase Transformation of Electrochemically Precipitated Nickel Hydroxides Using an Electrochemical Quartz Crystal Microbalance. *Journal of Electrochemical Society*, 1998. vol. 145, n° 2, p. 507-511.
- 55. WEHRENS-DIJKSMA, M. and NOTTEN, P.H.L., Electrochemical Quartz Microbalance characterization of Ni(OH)2-based thin film electrodes. *Electrochimica Acta*, 2006. vol. 51, nº 18, p. 3609-3621.
- 56. ISSAHARY, D.A., et al., Electrocatalytic Oxidations on Chemically Modified Electrodes prepared by Anodic Deposition of a Nickel Complex with a Tetra-aza macrocyclic Ligand. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1982.
- 57. CATALDI, T.R.I., CENTONZE, D., and RICCIARDI, G., Electrodede Modification With a Poly(NiII-Tetramerhyldibenzo-tetraaza[14]annulene) Film. Electrochemical behavior and Redox Catalysis in Alkaline Solutions. I. *Electroanalysis*, 1995. vol. 7, p. 312-318.
- CISZEWSKI, A. and MILCZAREK, G., Electrocatalytic oxidation of alcohols on glassy carbon electrodes electrochemically modified by conductive polymeric nickel(II) tetrakis(3methoxy-4-hydroxyphenyl) porphyrin film. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1996. vol. 413, p. 137-142.

- 59. ROSLONEK, G. and TARASZEWSKA, J., Electrocatalytic oxidation of alcohols on glassy carbon electrodes electrochemically modified with nickel tetraazamacrocyclic complexes: mechanism of film formation. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1992. vol. 325, p. 285-300.
- 60. URETA-ZAÑARTU, M.S., et al., Electrooxidation of methanol and ethylene glycol on gold and on gold modified with an electrodeposited polyNiTSPc film. *Electrochimica Acta*, 2007. vol. 52, n° 28, p. 7857-7864.
- 61. GHOLIVAND, M.B. and AZADBAKHT, A., A nano-structured Ni(II)-chelidamic acid modified gold nanoparticle self-assembled electrode for electrocatalytic oxidation and determination of methanol. *Materials Science and Engineering: C*, 2012. vol. 32, n° 7, p. 1955-1962.
- CATALDI, T.R.I., et al., Study of Nickel-based Chemically Modified Electrode Obtained by Electrodeposition of NiII-Tetramethyl-Dibenzo-Tetraaza[14] Annulene Complex. Redox Catalysis and Carbohydrated in alkaline Solutions. II. *Electroanalysis*, 1995. vol. 7, p. 435-440.
- 63. PONTIÉ, M., et al., Electrochemical nitric oxide microsensors: sensitivity and selectivityvcharacterisation. *Analytica Chimica Acta*, 2000. vol. 441, p. 175–185.
- 64. PONTIE, M., LECTURE, H., and BEDIOUI, F., Improvement in the performance of a nickel complex-based electrochemical sensor for the detection of nitric oxide in solution. *Sensors and Actuators B*, 1999. vol. 56, p. 1-5.
- 65. TRÉVIN, S., BEDIOUI, F., and DEVYNCK, J., New electropolymerized nickel porphyrin films. Application to the detection of nitric oxide in aqueous solution. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1996. vol. 408, p. 261-265.
- 66. AZAD, U.P. and GANESAN, V., Determination of hydrazine by polyNi(II) complex modified electrodes with a wide linear calibration range. *Electrochimica Acta*, 2011. vol. 56, nº 16, p. 5766-5770.
- 67. GANESAN, V. and RMARAJ, R., Electrocatalytic oxidation of hydrogen peroxide by poli(NiII teta) modified electrode. *Journal of Applied Electrochemistry*, 2001. vol. 31, p. 285-290.
- 68. GOUX, A.L., et al., Nickel Tetraaminophthalocyanine Based Films for the Electrocatalytic Activation of Dopamine. *Electroanalysis*, 2003. vol. 15, n<sup>o</sup> 11, p. 696-674.
- 69. AGBOOLA, B. and NYOKONG, T., Electrocatalytic oxidation of chlorophenols by electropolymerised nickel(II) tetrakis benzylmercapto and dodecylmercapto

metallophthalocyanines complexes on gold electrodes. *Electrochimica Acta*, 2007. vol. 52, n° 15, p. 5039-5045.

- 70. BERRÍOS, C., et al., Electro-oxidation of chlorophenols at glassy carbon electrodes modified with polyNi(II)complexes. *Electrochimica Acta*, 2009. vol. 54, n° 26, p. 6417-6425.
- 71. OBIRAI, J., BEDIOUI, F., and NYOKONG, T., Electro-oxidation of phenol and its derivates on poly-Ni(OH)TPhPyPc modified vitreous carbon electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2005. vol. 576, p. 323-332.
- 72. KHENE, S., LOBB, K., and NYOKONG, T., Interaction between nickel hydroxy phthalocyanine derivatives with p-chlorophenol: Linking electrochemistry experiments with theory. *Electrochimica Acta*, 2010. vol. 56, n° 2, p. 706-716.
- 73. CHAUKE, V., MATEMADOMBO, F., and NYOKONG, T., Remarkable sensitivity for detection of bisphenol A on a gold electrode modified with nickel tetraamino phthalocyanine containing Ni–O–Ni bridges. *Journal of Hazardous Materials*, 2010. vol. 178, n° 1-3, p. 180-186.
- 74. KHENE, S. and NYOKONG, T., Single walled carbon nanotubes functionalized with nickel phthalocyanines: effects of point of substitution and nature of functionalization on the electrooxidation of 4-chlorophenol. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2012. vol. 16, n° 01, p. 130-139.
- 75. AGBOOLA, B.O., OZOEMENA, K.I., and NYOKONG, T., Electrochemical properties of benzylmercapto and dodecylmercapto tetra substituted nickel phthalocyanine complexes: Electrocatalytic oxidation of nitrite. *Electrochimica Acta*, 2006. vol. 51, p. 6470.
- 76. TARASZEWSKA, J. and ROSLONEK, G., Electrocatalytic Oxidation of Methanol on a Glassy Carbon Electrode Modified by Nickel Hydroxide Formed by Ex Situ Chemical Precipitation. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1994. vol. 364, p. 209-213.
- 77. BUKOWSKA, J., ROSLENEK, G., and TARASZEWSKA, J., In-Situ Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Study of Gold Electrodes Modified with Nickel Tetraazamacrocyclic complex. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1996. vol. 403, p. 47-52.
- 78. PORRAS GUTIERREZ, A., et al., Hybrid Materials from Carbon Nanotubes, Nickel Tetrasulfonated Phthalocyanine and Thin Polymer Layers for the Selective Electrochemical Activation of Nitric Oxide in Solution. *Electroanalysis*, 2009. vol. 21, n° 21, p. 2303-2310.
- 79. ALTAMAR, L., et al., Electroreduction of chloroacetic acids (mono-, di- and tri-) at polyNi(II)-tetrasulfonated phthalocyanine gold modified electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2010. vol. 146, nº 1, p. 103-110.

- MUGADZA, T. and NYOKONG, T., Facile electrocatalytic oxidation of diuron on polymerized nickel hydroxo tetraamino-phthalocyanine modified glassy carbon electrodes. *Talanta*, 2010. vol. 81, nº 4-5, p. 1373-1379.
- 81. TREVIN, S., et al., Electropolymerized nickel macrocyclic complex-based films: design and electrocatalytic application. *Journal of Material Chemistry*, 1997. vol. 7, n° 6, p. 923–928.
- BERRÍOS, C., URETA-ZAÑARTU, M.S., and GUTIÉRREZ, C., Impedance study of electropolymerized films of polyNi(II)-macrocycles. *Electrochimica Acta*, 2007. vol. 53, nº 2, p. 792-802.
- AZAD, U.P. and GANESAN, V., Influence of Metal Nanoparticles on the Electrocatalytic Oxidation of Glucose by Poly(NiIIteta) Modified Electrodes. *Electroanalysis*, 2010. vol. 22, n<sup>o</sup> 5, p. 575-583.
- PÉREZ-MORALES, M., et al., Anodic Electrodeposition of NiTSPP from Aqueous Basic Media. *Langmuir*, 2005. vol. 21, p. 5468-5474.
- 85. PÉREZ-MORALES, M., et al., Mediator and catalytic effects of porphyrin modified electrodes on redox LB films. *Electrochimica Acta*, 2006. vol. 51, n° 18, p. 3714-3718.
- BERRÍOS, C., et al., Study by XPS and UV-Visible and DRIFT Spectroscopies of Electropolymerized Films of Substituted Ni(II)-p-Phenylporphyrins and -Phthalocyanines. *Journal of Phyisical Chemistry B*, 2008. vol. 112, p. 12644–12649.
- AUGUSTO, O., in CRC Handbook of Biomedicine of Free Radicals and Antioxidants, C. Press, Editor. 1989, J Miguel: Boca Raton.
- ARAKI, K. and TOMA, H.E., Spectroelectrochemistry and Electrocatalytic Properties of a Tetraruthenated Nickel Porphyrin. *Journal of Chemical Research, Synopses*, 1994 n° 7, p. 290.
- 89. PEDROTTI, J.J., ANGNES, L., and GUTZ, I.R., Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions. *Electroanalysis*, 2005. vol. 8, n° 7, p. 673–675.
- ARAKI, K., et al., Electrochemistry of a tetraruthenated cobalt porphyrin and its use in modified electrodes as sensors of reducing analytes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1995. vol. 397, p. 205-210.
- AZEVEDO, C.M.N., et al., Electrostatically Assembled Films for Improving the Properties of Tetraruthenated Porphyrin Modified Electrodes. *Electroanalysis*, 1998. vol. 10, n° 7, p. 467-471.

- 92. THIES, S., et al., Coordination-Induced Spin Crossover (CISCO) through Axial Bonding of Substituted Pyridines to Nickel-Porphyrins: σ-Donor versus π-Acceptor Effects. *Chemistry - A European Journal*, 2010. vol. 16, n° 33, p. 10074-10083.
- 93. MOTTLEY, C., CONNOR, H.D., and MASON, R.P., [170] Oxygen Hyperfine Structure for the Hydroxyl and Superoxide Radicals Adducts of the Spin Traps DMPO, PBN and 4-POBN. *Biochemical and Biophysical Research Comunucations*, 1986. vol. 141, p. 622-628.
- 94. CREUTZ, C. and SUTIN, N., Reaction of tris(bipyridine)ruthenium(III) with hydroxide and its application in a solar energy storage system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1975. vol. 72, n° 8, p. 2858-2862.
- 95. QUAYLE, W.H. and LUNSFORD, J.H., Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(III) in Zeolite Y: Characterization and Reduction on Exposure to Water. *Inorganic Chemitry*, 1982. vol. 21, p. 97-103.
- 96. GHOSH, P.K., et al., Thermal and Light-Induced Reduction of Ru(bipy)3 Aqueous Solution. *Journal of American Chemical Society*, 1984. vol. 106, p. 4772-4183.
- 97. DAS, S.K. and DUTTA, P.K., Intrazeolitic Photoreactions of Ru(bpy)33+ with Methyl Viologen. *Langmuir*, 1998. vol. 14, p. 5121-5126.
- QUAINO, P.M. and SCHMICKLER, W., Oxygen-Terminated Diamond Electrodes in Alkaline Media: Structure and OH Generation. *ChemElectroChem*, 2014. vol. 1, n° 5, p. 933-939.
- BARD, A., PARSONS, R., and JORDAN, J., Standard Potentials in Aqueous Solutions. 1985, New York: Marcel Dekker.
- HAWLEY, M.D. and FELDBERG, S.W., Nuances of the ECE Mechanism. I. Development of the Theoretical Relationships for Chronoamperometry. *The Journal of Physical Chemistry*, 1966. vol. 70, nº 11, p. 3459-3464.
- 101. CORIO, P., RUBIM, J.C., and AROCA, R., Contribution of the Herzberg-Teller Mechanism to the Surface-Enhanced Raman Scattering of Iron Phthalocyanine Adsorbed on a Silver Electrode. *Langmuir*, 1998. vol. 14, n° 15, p. 4162–4168.
- 102. AYDIN, M., DFT and Raman spectroscopy of porphyrin derivatives: Tetraphenylporphine (TPP). *Vibrational Spectroscopy*, 2013. vol. 68, p. 141-152.
- 103. JIANG, J., et al., Vibrational spectroscopy of phthalocyanine and naphthalocyanine in sandwich-type (na)phthalocyaninato and porphyrinato rare earth complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 2006. vol. 250, nº 3-4, p. 424-448.

- 104. LI, X.-Y., et al., Consistent Porphyrin Force Field. 1. Normal-Mode Analysis for Nickel Porphine and Nickel Tetraphenyiporphine from Resonance Raman and Infrared Spectra and Isotope Shifts. *The Journal of Physical Chemistry*, 1990. vol. 94, n° 31-47.
- 105. BLOM, N., ODO, J., and NAKAMOTO, K., Resonance Raman Studies of Metal Tetrakis(4-N-methylpyr9dyi)porphine: Band Assignments, Structure-Sensitive Bands, and Species Equilibria. *Journal of Phylicial Chemistry*, 1986. vol. 90, p. 2847-2852.
- 106. YEO, B.S. and BELL, A.T., In Situ Raman Study of Nickel Oxide and Gold-Supported Nickel Oxide Catalysts for the Electrochemical Evolution of Oxygen. *Journal of Phyisical Chemistry C*, 2012. vol. 116, nº 15, p. 8394–8400.
- 107. LO, Y.L. and HWANG, B.J., In Situ Raman Studies on Cathodically Deposited Nickel Hydroxide Films and Electroless Ni-P Electrodes in 1 M KOH Solution. *Langmuir*, 1998. vol. 14, nº 4, p. 944-950.
- WANG, J. and TAHA, Z., Batch Injection Analysis. *Analytical Chemistry*, 1991. vol. 63, p. 1053-1056.
- WANG, J. and ANGNES, L., Batch Injection Spectroscopy. *Analytical Letters*, 1993. vol. 26, p. 2329-2339.
- 110. WANG, J., RAYSON, G.D., and Z. TAHA, Batch Injection Analysis Using Fiber-Optic Fluorometric Detection. *Applied Spectrocopy*, 1992. vol. 46, p. 107-110.
- BARBOSA, R.M., et al., Electrochemical Studies of Zinc in Zinc-Insulin Solution. *Analyst*, 1996. vol. 121, p. 1789-1793.
- 112. BRETT, C.M.A., BRETT, A.M.O., and TUGULEU, L., Batch Injection Analysis with Adsorptive Stripping Voltammetry for the Determination of Traces of Nickel and Cobalt. *Electroanalysis*, 1995. vol. 8, nº 7, p. 639-642.
- 113. BRETT, C.M.A., et al., Nafion-coated mercury thin film electrodes for batch-injection analysis with anodic stripping voltammetry *Talanta*, 1996. vol. 43, p. 2015-2022.
- 114. FERREIRA, L.M.C., FELIX, F.S., and ANGNES, L., Fast Determination of Ciclopirox in Pharmaceutical Products by Amperometry in Flow and Batch Injection Systems. *Electroanalysis*, 2012. vol. 24, nº 4, p. 961-966.
- 115. MARTINS, P.R., et al., Influence of cobalt content on nanostructured alpha-phase-nickel hydroxide modified electrodes for electrocatalytic oxidation of isoniazid. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014. vol. 192, p. 601-606.

- 116. FELIX, F.S., et al., Quantification of terbinafine in pharmaceutical tablets using capillary electrophoresis with contactless conductivity detection and batch injection analysis with amperometric detection. *Talanta*, 2012. vol. 101, p. 220-225.
- WANG, J., Injection Analysis- From Flow-Injection Analysis to Batch-Injection Analysis. *Microchemical Journal*, 1992. vol. 45, p. 219-224.
- 118. BRETT, C.M.A. and BRETT, A.M.O., *Electrochemitry. Principlies, Methods and Applications*. 1993, Coimbra.
- 119. QUINTINO, M.S.M. and ANGNES, L., Batch Injection Analysis: An Almost Unexplored Powerful Tool. *Electroanalysis*, 2004. vol. 16, n° 7, p. 513-523.
- SANTOS, W.T.P.D., et al., Uso da Pressão Gerada por uma Coluna de Água para Controle de Vazão em Sistemas de Análise em Fluxo. *Química Nova*, 2007. vol. 30, nº 7, p. 1754-1758.
- MATOS, R.C., et al., Propulsor Pneumático Versátil e Isenso de Pulsação para Sistemas de Análise em Fluxo. *Química Nova*, 2001. vol. 24, nº 6, p. 795-798.
- 122. SANTOS, W.T.P.D., et al., Análise por Injeção em Fluxo com Detecção Amperométrica de Múltiplos Pulsos: Potencialidades e Aplicações. *Química Nova*, 2011. vol. 34, nº 10, p. 1753-1761.
- 123. DA SILVA, R.A.B., et al., Batch injection analysis with amperometric detection: application for simultaneous analysis using a single working electrode. *Analytical Methods*, 2011. vol. 3, nº 12, p. 2804.
- 124. STEFANO, J.S., et al., Fast Determination of Naproxen in Pharmaceutical Formulations by Batch Injection Analysis with Pulsed Amperometric Detection. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 2012. vol. 23, nº 10, p. 1834-1838.
- 125. GIMENES, D.T., et al., Determination of propranolol and hydrochlorothiazide by batch injection analysis with amperometric detection and capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Analytical Methods*, 2014. vol. 6, n° 10, p. 3261.
- 126. PEREIRA, P.F., et al., Fast and simultaneous determination of nimesulide and paracetamol by batch injection analysis with amperometric detection on bare boron-doped diamond electrode. *Diamond and Related Materials*, 2013. vol. 39, p. 41-46.
- 127. DAS, U.N., Folic acid and polyunsaturated fatty acids improve cognitive function and prevent depression, dementia, and Alzheimer's disease—But how and why? *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2008. vol. 78, n° 1, p. 11-19.
- 128. QUINLIVAN, E.P., et al., Importance of both folic acid and vitamin B12 in reduction of risk of vascular disease. *The Lancet*, 2002. vol. 359, n° 9302, p. 227-228.

- CLARKE, R., et al., Effects of Lowering Homocysteine Levels With B Vitamins on Cardiovascular Disease, Cancer, and Cause-Specific Mortality. *Archives of Internal Medicine*, 2010. vol. 170, nº 18, p. 1622-1631.
- STEEGERS-THEUNISSEN, R.P., et al., Periconceptional Maternal Folic Acid Use of 400 mg per Day Is Related to Increased Methylation of the IGF2 Gene in the Very Young Child. *PLOS ONE*, 2009. vol. 4, nº 11, p. 1-5.
- MRC, V.S.R.G., Prevention of neural tube defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. *The Lancet*, 1991. vol. 338, nº 8760, p. 131-137.
- 132. ALAM, A.-M., et al., Europium-Enoxacin Complex as Fluorescence Probe for the Determination of Folic Acid in Pharmaceutical and Biological Samples. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2012. vol. 33, n° 9, p. 3055-3060.
- GHASEMI, J. and VOSOUGH, M., Simultaneous Spectrophotometric Determination of Folic Acid, Thiamin, Riboflavin, and Pyridoxal Using Partial Least-Squares Regression Method. Spectroscopy Letters, 2002. vol. 35, nº 2, p. 153-169.
- ANDRISANO, V., et al., Analytical methods for the determination of folic acid in a polymeric micellar carrier. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003. vol. 32, n° 4-5, p. 983-989.
- 135. NAGARAJA, P., VASANTHA, R.A., and YATHIRAJAN, H.S., Spectrophotometric determination of folic acid in pharmaceutical preparations by coupling reactions with iminodibenzyl or 3-aminophenol or sodium molybdate–pyrocatechol. *Analytical Biochemistry*, 2002. vol. 307, p. 316-321.
- 136. XIAO, F., et al., Single-walled carbon nanotube-ionic liquid paste electrode for the sensitive voltammetric determination of folic acid. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2008. vol. 134, nº 2, p. 895-901.
- OJANI, R., RAOOF, J.-B., and ZAMANI, S., Electrocatalytic Oxidation of Folic Acid on Carbon Paste Electrode Modified by Nickel Ions Dispersed into Poly(o-anisidine) Film. *Electroanalysis*, 2009. vol. 21, nº 24, p. 2634-2639.
- 138. MAZLOUM-ARDAKANI, M., et al., Electrochemical sensor for simultaneous determination of norepinephrine, paracetamol and folic acid by a nanostructured mesoporous material. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012. vol. 171-172, p. 380-386.
- 139. MAJIDI, M.R., et al., Voltammetric Determination of Folic Acid with a Overoxidized Polypyrrole Film Modified Sol-Gel Carbon Ceramic Electrode. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 2011. vol. 16, nº 7, p. 486-495.

- 140. BHANDARI, D., KERTESZ, V., and VAN BERKEL, G.J., Rapid quantitation of ascorbic and folic acids in SRM 3280 multivitamin/multielement tablets using flow-injection tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2013. vol. 27, n° 1, p. 163-168.
- 141. Farmacopeia Brasileira. 5 ed. 2010, Brasília.
- 142. QUINTINO, M.D.S.M. Desenvolvimento de Sensores Eletroquímicos Associados a Batch Injection Analysis (BIA) para Aplicaçãoes Analíticas, São Paulo, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2003. Tese de Doutorado
- 143. ABRUÑA, H.D., Coordination Chemistry in Two Dimensions: Chemically Modified Electrodes. *Coordination Chemistry Reviews*, 1988. vol. 86, p. 135-189.
- BUGG, C.E., Calcium Binding to Carbohydrates. Crystal Structure of a Hydrated Calcium Bromide Complex of Lactose. *Journal of American Chemical Society*, 1973. vol. 95, n° 3, p. 908-913.
- 145. NICKERSON, T.A., Lactose Chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1979.
   vol. 27, n° 4, p. 672-677.
- THOM, C.S., et al., Hemoglobin Variants: Biochemical Properties and Clinical Correlates. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2013. vol. 3, nº 3, p. a011858-a011858.
- 147. OU, Z., et al., Elevated Hemoglobin A2 as maker of β-Thalassemia Trait in Pregnant Women.
   *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2011. vol. 223, p. 223-226.
- 148. GRUBINA, R., et al., Nitrite Reductase Activity of Hemoglobin S (Sickle) Provides Insight into Contributions of Heme Redox Potential Versus Ligand Affinity. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. vol. 283, nº 6, p. 3628-3638.
- 149. WHITE, D.K., CANNON, J.B., and TRAYLOR, T.G., A Kinetic Model for R- and T-State Hemoglobin. Flash Photolysis of Heme-Imidazole-Carbon Monoxide Mixtures. *Journal of the American Chemical Society*, 1979. vol. 101, n° 9, p. 2443-2454.
- JON GEIBEL, J.C., CAMPBELL, D., and TRAYLOR, T.G., Model Compounds for R-State and T-State Hemoglobins. *Journal of the American Chemical Society*, 1978. vol. 100, n° 11, p. 3575-3584.
- 151. BERG, J.M., TYMOCZKO, J.L., and STRYER, L., *Biochemistry*. 5 ed. 2002, New York: W H Freemn.
- CERQUEIRA, N.F. and YOSHIDA, W.B., Óxido Nítrico. Revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 2002. vol. 17, nº 6, p. 417-423.

- 153. HEINECKE, J.L., et al., Nitrite Reduction Mediated by Heme Models. Routes to NO and HNO? *Journal of the American Chemical Society*, 2013. vol. 135, n° 10, p. 4007-4017.
- LUI, F.E. and KLUGER, R., Enhancing Nitrite Reductase Activity of Modified Hemoglobin: Bis-tetramers and Their PEGylated Derivatives. *Biochemistry*, 2009. vol. 48, n° 50, p. 11912-11919.
- 155. GLADWIN, M.T. and KIM-SHAPIRO, D.B., The functional nitrite reductase activity of the heme-globins. *Blood*, 2008. vol. 112, n° 7, p. 2636-2647.
- 156. CHEN, K., et al., Nitric oxide from nitrite reduction by hemoglobin in the plasma and erythrocytes. *Nitric Oxide*, 2008. vol. 18, n° 1, p. 47-60.
- LUI, F.E., DONG, P., and KLUGER, R., Polyethylene Glycol Conjugation Enhances the Nitrite Reductase Activity of Native and Cross-Linked Hemoglobin. *Biochemistry*, 2008. vol. 47, p. 10773–10780.
- 158. RONG, Z., et al., Modulating hemoglobin nitrite reductase activity through allostery: A mathematical model. *Nitric Oxide*, 2013. vol. 35, p. 193-198.
- 159. AZAROV, I., et al., Nitric Oxide Scavenging by Red Blood Cells as a Function of Hematocrit and Oxygenation. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. vol. 280, n° 47, p. 39024-39032.
- SAKAI, H., et al., Review of Hemoglobin-Vesicles as Artificial Oxygen Carriers. Artificial Organs, 2009. vol. 33, nº 2, p. 139-145.
- SLOAN, E.P., et al., Emergency Resuscitation of Patients Enrolled in the US Diaspirin Crosslinked Hemoglobin (DCLHb) Clinical Efficacy Trial. *Prehospital and Disaster Medicine*, 2014. vol. 30, nº 01, p. 54-61.
- 162. SLOAN, E.P., et al., Diaspirin Cross-Linked Hemoglobin (DCLHb) in the Treatment of Severe Teaumatic Hemorrhagic Shok. A Randomized Controlled Efficacy Trial. *Journal of the American Medical Association*, 1999. vol. 282, nº 19, p. 1857-1864.
- 163. ROHLFS, R.J., et al., Arterial Blood Pressure Responses to Cell-free Hemoglobin Solutions and the Reaction with Nitric Oxide. *The Journal o Biological Chemistry*, 1998. vol. 273, n° 20, p. 12128-12134.
- 164. TSAI, A.G., et al., Dissociation of local nitric oxide concentration and vasoconstriction in the presence of cell-free hemoglobin oxygen carriers. *Blood*, 2006. vol. 108, n° 10, p. 3603-3610.
- 165. LUI, F.E. and KLUGER, R., Reviving Artificial Blood: Meeting the Challenge of Dealing with NO Scavenging by Hemoglobin. *ChemBioChem*, 2010. vol. 11, n<sup>o</sup> 13, p. 1816–1824.

- 166. SNYDER, S.R., et al., HbXL99 alpha: a hemoglobin derivative that is cross-linked between the alpha subunits is useful as a blood substitute. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987. vol. 84, p. 7280-7284.
- 167. HUANG, Z., Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. *Journal of Clinical Investigation*, 2005. vol. 115, n° 8, p. 2099-2107.
- 168. GLADWIN, M.T., et al., Nitrite as a vascular endocrine nitric oxide reservoir that contributes to hypoxic signaling, cytoprotection, and vasodilation. *American Journal of Heart and Ciculatory Physiology*, 2006. vol. 291, n° 5, p. H2026–H2035.
- GREENBURG, A.G. and KIM, H., Hemoglobin-based oxygen carriers. *Critical Care*, 2004.
   vol. 8, n<sup>o</sup> Suppl 2, p. S61-S64.
- 170. KIM, H.W. and G., G., Artificial oxygen carriers as red blood cell substitutes: a selected review and current status. *Artificial Organs*, 2004. vol. 28, n° 9, p. 813-828.
- 171. WINSLOW, R.M., Cell-free oxygen carriers: Scientific foundations, clinical development, and new directions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Proteins and Proteomics*, 2008. vol. 1784, nº 10, p. 1382-1386.
- 172. CABRALES, P. and TSAI, A.G., Will fixing the vasoactivity caused by hemoglobin-based oxygen carriers be enough? *Critical Care Medicine*, 2009. vol. 37, n° 6, p. 2125-2126.
- 173. RAMEEZ, S., ALOSTA, H., and PALMER, A.F., Biocompatible and Biodegradable Polymersome Encapsulated Hemoglobin: A Potential Oxygen Carrier. *Bioconjugate Chemistry*, 2008. vol. 19, n° 5, p. 1025-1032.
- YU, A.-M., ZHANG, H.-L., and CHEN, H.-Y., Electrocatalytic Reduction and Determination of Nitric Oxide at a Hemoglobin Modified Electrode. *Analytical Letters*, 1997. vol. 30, n° 5, p. 1013-1023.
- MAJIDI, M.R., SAADATIRAD, A., and ALIPOUR, E., Pencil Lead Electrode Modified with Hemoglobin Film as a Novel Biosensor for Nitrite Determination. *Electroanalysis*, 2013. vol. 25, nº 7, p. 1742-1750.
- 176. MIMICA, D., ZAGAL, J.H., and BEDIOUI, F., Electroreduction of nitrite by hemin, myoglobin and hemoglobin in surfactant films. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2001. vol. 497, n° 1-2, p. 106-113.
- 177. VANDERGRIFF, K.D., et al., Kinetics of NO and O2 binding to a maleimide poly(ethylene glycol)- conjugated human haemoglobin. *Biochemical Journal*, 2004. vol. 382, p. 183–189.
- 178. HU, D. and KLUGER, R., Functional Cross-Linked Hemoglobin Bis-tetramers: Geometry and Cooperativity. *Biochemistry*, 2008. vol. 47, p. 12551–12561.

- ZHAO, M., et al., Allosteric kinetics and equilibria of triligated, cross-linked hemoglobin. *Biophysical Journal*, 1993. vol. 64, nº 5, p. 1520–1532.
- 180. GALUS, Z., Fundamentals of electrochemical analysis, ed. E. Horwood. 1976, New York.
- 181. MARTINS, P.R., et al., Highly stabilized alpha-NiCo(OH)2 nanomaterials for high performance device application. *Journal of Power Sources*, 2012. vol. 218, p. 1-4.
- HOHENBERG, P., Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review*, 1964. vol. 136, n° 3B, p. B864-B871.
- 183. BECKE, A.D., Density-functional thermochemistry. V. Systematic optimization of exchangecorrelation functionals. *The Journal of Chemical Physics*, 1997. vol. 107, n° 20, p. 8554.
- BECKE, A.D., Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics*, 1993. vol. 98, nº 7, p. 5648.
- HILL, E., A Problem in the Quantum Mechanics of Crystals. *Physical Review*, 1931. vol. 37, nº 7, p. 785-794.
- 186. ARAKI, K. Propriedades Supramoleculares de Porfirinas Polinucleares, São Paulo, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 1994. Tese de Doutorado

### **ANEXO** A

# Modelagem molecular para simulação dos espectros Raman: Detalhes Computacionais

As simulações dos espectros Raman foram realizadas no Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia (LQSN). O software Gaussian 09 W (Gassian Inc.,Wallingford, CT, USA) foi utilizado par a modelagem molecular. O cálculo de otimização da geometria para o estado fundamental e espectro vibracional para as espécies alvo foi realizado empregando a Teoria de Densidade Funcional (DFT) [182] e funcional híbrido B3LYP [183] (funcional de permuta do gradiente corrigido de Becke) [184] em combinação com o funcional de correlação de Lee-Yang-Parr com três parâmetros [185]). Foram empregados para os cálculos o conjunto de bases The 6-311G++(d,p) para os átomos de C. N e H e o conjunto de bases LANL2DZ para o átomo de Ni, com seus respectivos pseudopotenciais para a espera interna. As atribuições para os softwares Gaussview 05 (Gassian Inc.,Wallingford, CT, USA) e Gabedit 2.4.0. Os espectros Raman teóricos foram calculados para as espécies para [NiP], [NiP(OH)]<sup>-1</sup> e [NiP(O<sub>2</sub>)]<sup>-1</sup>, como provável componentes monoméricos do polímero porfirínico e são apresentados na Figura A1.





[NiPOH]<sup>-1</sup>





Figura A1: Espectros Raman teóricos calculados por DFT para (a) [NiP], (b)  $[NiP(OH)]^{-1}$  e  $[NiP(O_2)]^{-1}$  e suas resectivas estruturas no topo. Os grupos py- $[Ru(bipy)_2Cl]$ + não são apresentados mas foram considerados nos cálculos.

# SÚMULA CURRICULAR

### DADOS PESSOAIS

Nome: Luís Marcos Cerdeira Ferreira Local e data de nascimento: Juiz de Fora, 28 de agosto de 1984 email: cerdeira@iq.usp.br

## **EDUCAÇÃO**

- Colégio Tiradentes da Polícia Militar de Minas Gerais, Juiz de Fora, MG, 2002
- Universidade Federal de Juiz de Fora, juiz de Fora, MG, 2008.
   Bacharelado e Licenciatura em Química
- Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2011

Mestrado em Ciências (Química)

## OCUPAÇÃO

- Bolsista PDSE, CAPES, University of Toronto Scarborough Campus (UTSC), Toronto, Canadá - setembro/2014 a agosto/2015
- Bolsista de Doutorado, CNPq, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil agosto/2011 a agosto/2014
- Bolsista de Mestrado, CNPq, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil março/2009 a fevereiro/2011
- Bolsista Iniciação Científica PIBIC, CNPq, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) agosto/2008 a dezembro/2008
- Bolsista Iniciação Científica BIC, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), agosto/2007 a julho/2008

# PUBLICAÇÕES ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS:

FERREIRA, L. M. C.; GRASSESCHI, D.; SANTOS, M. S. F.; MARTINS, P. R.; GUTZ, I. G. R.; FERREIRA, A. M. C.; ARAKI, K.; TOMA, H. E.; ANGNES, L. Unveiling the Structure of Polytetraruthenated Nickel Porphyrin by Raman Spectroelectrochemistry. Langmuir, v. 31, p. 4351-4360, 2015.

FERREIRA, L. M. C. ; MARTINS, P. R. ; ARAKI, K. ; TOMA, H. E.; ANGNES, L. . Amperometric Folic Acid Quantification Using a Supramolecular Tetraruthenated Nickel Porphyrin μ-Peroxo-Bridged Matrix Modified Electrode Associated to Batch Injection Analysis. Electroanalysis (New York, N.Y.), v. 27, p. 2322-2328, 2015.

MARTINS, P. R.; FERREIRA, L. M. C ; ARAKI, K.; ANGNES, L. . Influence of cobalt content on nanostructured alpha-phase-nickel hydroxide modified electrodes for electrocatalytic oxidation of isoniazid. Sensors and Actuators. B, Chemical, v. 192, p. 601-606, 2014.

FELIX, F. S.; FERREIRA, L. M. C.; VIEIRA, F.; TRINDADE, G. M.; FERREIRA, V. S. S. A.; ANGNES, L.. Amperometric determination of promethazine in tablets using electrochemically reduced graphene oxide modified electrode. New Journal of Chemistry (1987), v. 39, p. 696-702, 2014.

FERREIRA, L. M. C.; DA COSTA, E. T.; DO LAGO, C. L.; ANGNES, L. *Miniaturized flow* system based on enzyme modified PMMA microreactor for amperometric determination of glucose. Biosensors & Bioelectronics, v. 47, p. 539-544, 2013.

FERREIRA, L. M. C.; FELIX, F. S.; ANGNES, L. Fast Determination of Ciclopirox in *Pharmaceutical Products by Amperometry in Flow and Batch Injection Systems*. Electroanalysis (New York, N.Y.), v. 24, p. 961-966, 2012.

FELIX, F. S.; FERREIRA, L. M. C.; ROSSINI, P. O.; DO LAGO, C. L.; ANGNES, L. Quantification of terbinafine in pharmaceutical tablets using capillary electrophoresis with

contactless conductivity detection and batch injection analysis with amperometric detection. Talanta (Oxford), v. 101, p. 220-225, 2012.

### **RESUMOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS:**

FERREIRA, L. M. C.; ANGNES, L.; KERMAN, K. *KINETIC STUDY OF NITRITE ELECTROREDUCTION USING HEMOGLOBIN MODIFIED ELECTRODES*. 5th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry, Parry Sound-Canadá, 2015.

FERREIRA, L. M. C.; SANTOS, M. S. F.; ANGNES, L. *AMPEROMETRIC FOLIC ACID QUANTIFICATION USING A SUPRAMOLECULAR TETRARUTHENATED NICKEL PORPHYRIN μ-OXO MATRIX MODIFIED ELECTRODE ASSOCIATED TO BATCH INJECTION ANALYSIS.* PITTCON Conference & Expo, 2014, Chicago-USA, 2014.

ANGNES, L.; FELIX, F. S.; FERREIRA, L. M. C.; CAMPOS, O. S.; VIEIRA, F. ; TRINDADE, G. M.; FERREIRA, V. S. S. A. *APPLICATION OF ELECTROCHEMICALLY REDUCED GRAPHENE OXIDE MODIFIED ELECTRODE IN AMPEROMETRIC ANALYSIS OF PROMETHAZINE*. XXIII International Materials Research Congress, Cancun-México, 2014.

MARTINS, P. R.; FERREIRA, L. M. C.; ARAKI, K.; ANGNES, L. *ELETRODOS MODIFICADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ALFA-NiCo(OH)*<sub>2</sub> *PARA DETERMINAÇÃO DE ISONIAZIDA*. XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Campos do Jordão, 2013.

FERREIRA, L. M. C.; ANGNES, L. ; ARAKI, K. ; TOMA, H. E. . *AMINO ACIDS OXIDATION CATALYZED BY POLYMERIZED TETRARUTHENATED NICKEL- PORPHYRIN*. In: 63rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Praga – República Tcheca, 2012.

FERREIRA, L. M. C.; FELIX, F. S.; ANGNES, L. *BIA-AMPEROMETRIC DETERMINATION OF TERBINAFINE IN TABLETS*. 63rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Praga - República Tcheca, 2012.

FERREIRA, L. M. C. ; FELIX, F. S. ; ANGNES, L. . *FAST DETERMINATION OF CICLOPIROX IN PHARMACEUTICAL PRODUCTS BY AMPEROMETRY IN FLOW AND BATCH INJECTION SYSTEMS*. Eletrochemistry towards high performance systems: the use of nanomaterials, São Paulo. 2011.

FREITAS, K. H. G.; FERREIRA, L. M. C.; FATIBELLO-FILHO, O. *DETERMINAÇÃO DE QUERCETINA EM CHÁS POR SWV UTILIZANDO UM ELETRODO COMPÓSITO DE CARBONO MODIFICADO COM Cu*<sub>3</sub>( $PO_4$ )<sub>2</sub>. 33a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, 2010.

FERREIRA, L. M. C.; ANGNES, L. *IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA EM SUPERFÍCIE FUNCIONALIZADA DE PMMA EM MICRORREATOR ACOPLADO A FIA PARA O MONITORAMENTO DE GLICOSE*. In: 33a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia. 33a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010.

FERREIRA, L. M. C.; ANGNES, L. *DETERMINAÇÃO DE GLICOSE EM REFRIGERANTES UTILIZANDO SISTEMA EM FLUXO MINIATURIZADO COM REATOR DE PMMA MODIFICADO COM GLICOSE OXIDASE*. IV Congresso Iberoamericano de Química Analítica. X Encuentro Nacional de Química Analítica y Ambiental, Concón-Chile, 2010.

FERREIRA, L. M. C.; SPERANDIO, G. H. ; MATOS, M. A. C ; MATOS, R. C. *QUANTIFICAÇÃO DE COBRE E CHUMBO POR REDISSOLUÇÃO POTENCIOMÉTRICA A CORRENTE CONSTANTE EM LEITE USANDO ELETRODOS DE FILME DE Hg.* 150. Encontro Nacional de Química Analítica e 30. Congresso Iberoamericano de Química Analítica, Salvador. 2009.

DELAGE, D. T.; FERREIRA, L. M. C.; CASTRO, P. S; MATOS, R. C. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE Cu, Pb E Cd POR REDISSOLUÇÃO POTENCIOMÉTRICA (PSA) EM AMOSTRAS DE MEL. 31a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia., 2008. FERREIRA, L. M. C. ; DELAGE, D. T. ; MATOS, R. C. DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA MONITORAMENTO DE ESPÉCIES QUÍMICAS EM ÁGUA DE CHUVA NA CIDADE DE JUIZ DE FORA. XIV Seminário de Iniciação Científica e o IV Seminário de Iniciação Científica Júnior, 2008, Juiz de Fora, 2008.

VALENTIM, R. G. A.; DELAGE, D. T.; FERREIRA, L. M. C.; ARAUJO, M. T. S; MATOS,
M. A. C.; MATOS, R. C. ANÁLISE DE CÁTIONS EM GEL CLAREADOR (H2O2 35 %)
USANDO ELETROFORESE CAPILAR EM ZONA APÓS CLAREAMENTO DENTAL: UM
ESTUDO IN VITRO. 140. Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa. 140, 2007.