Universidade de São Paulo

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

CAROLINE SANZ GOMES

DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS DE OURO MODIFICADOS COM CAMADAS AUTO-ARRANJADAS DE TIÓIS PARA FORMAÇÃO *IN SITU* DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

Versão Corrigida

São Paulo

Data de Depósito na SPG

11/11/2015

CAROLINE SANZ GOMES

DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS DE OURO MODIFICADOS COM CAMADAS AUTO-ARRANJADAS DE TIÓIS PARA FORMAÇÃO *IN SITU* DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre em Química

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Silvia Helena Pires Serrano

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Nome: Caroline Sanz Gomes

Título: Desenvolvimento de eletrodos de ouro modificados com camadas auto-arranjadas de tióis para formação *in situ* de nano partículas de ouro

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre em Química

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.ª Dr.ª Silvia Helena Pires Serrano

Instituição: Instituto de Química - Universidade de São Paulo

Assinatura:

Prof. Dr.: Instituição:

Julgamento: Assinatura:

Prof. Dr.: Instituição:

Julgamento: Assinatura:

“It’s all getting to be too much for me. I feel I’m out of my depth. I’m scared. I’m scared I’m going to do something stupid.”

“And if you do something stupid, what then?”

“Aren’t you scared of falling?”

“It’s sometimes a mistake to climb; it is always a mistake never even to make the attempt.”

“What are you saying? That I ought to go back? Not walk out? Is that what you’re saying? You’re just a dream. Listen, I’ve made up my mind.”

“If you do not climb you will not fall. This is true. But is that bad to fail, that hard to fall?”

"Sometimes you wake up. Sometimes the fall kills you. And sometimes, when you fall, you fly."

Conversa entre o Sonho e Todd Faber.

Neil Gaiman em *Fables and Reflections*, vol. 6, 1993.

Dedico esta dissertação a meus pais, Eliane e José Antonio, sempre com paciência e apoio, servindo de inspiração e me permitindo ter liberdade para seguir meus sonhos. Também dedico aos meus padrinhos, Eliseu e Rosângela, que me auxiliaram nesta jornada de inúmeras formas.

Agradecimentos

à meus pais, Eliane e José Antônio, pelo ensinamento e auxílio na formação da pessoa que sou hoje, pelo exemplo e pela motivação, e principalmente pela paciência nestes difíceis últimos anos.

à Prof.ª Dr.ª Silvia Helena Pires Serrano, que desde minha entrada, é meu exemplo profissional e pessoal, e que me aceitou e permitiu crescer dentro de seu laboratório, sempre a disposição quando necessário.

à meu amigo Raphael Bacil, que me acompanhou em todos esses 12 anos de amor pela química, mesmo que à distância, e que me motivou a encarar meus medos, auxiliando minha na entrada na USP e no laboratório.

ao Dr. Rafael Buoro, que, assim como minha orientadora, serviu como exemplo para que eu buscasse minha vocação, sempre disposto a ajudar quando necessário.

aos meus colegas de laboratório, Othon (Quixeranúbis) e Coronel, que me ajudaram tanto nos problemas referentes à pesquisa, como também proporcionando um ambiente alegre de trabalho, sempre com um sorriso no rosto.

aos iniciantes, Laís e Maylla, sempre proporcionando risadas nas horas certas e apoio quando necessário, e a técnica Cristina, que sem sua ajuda e boa disposição esta jornada não seria a mesma.

aos Profs. Drs. Thiago Paixão, Jorge Masini e Lúcio Angnes, pela participação quase que instantânea no exame de qualificação, e também, novamente ao Prof. Dr. Lúcio Angnes por fornecer os eletrodos de diamante dopado com boro para os estudos realizados.

à todos os outros que participaram desta evolução de alguma forma, seja diretamente ou indiretamente.

às instituições FAPESP, CNPQ e CAPES.

Desenvolvimento de eletrodos de ouro modificados com camadas auto-arranjadas de tióis para formação *in situ* de nano partículas de ouro

Resumo

Eletrodos de ouro foram utilizados para preparação de eletrodos modificados com monocamadas auto arranjadas de tióis. A limpeza do substrato metálico é fundamental para que a arquitetura molecular superficial possa ser efetuada com boa estabilidade e reprodutibilidade, além de fornecer dados utilizados no cálculo de área ativa, necessários na normalização dos valores de recobrimento superficial obtidos nas determinações de dessorção do agente modificador interno, o ácido 3-mercaptopropiônico. Os eletrodos modificados consistiram no recobrimento de transdutores de ouro com ácido 3-mercaptopropiônico através da imersão do eletrodo de **Au** em solução 25 $mmolL^{-1}$ deste composto e, em seguida, com moléculas de cisteína, através da imersão do eletrodo de **Au/3-MPA** em solução 0,1 $molL^{-1}$ deste composto, originando um sensor do tipo **Au/3-MPA/CSH**. As moléculas de cisteína foram utilizadas como agente redutor para obtenção de nanopartículas de **Au** na superfície do eletrodo modificado, através da aplicação de 20 µL de solução de $HAuCl_4$. Após a confirmação da ausência do par tiólico superficial responsável pela redução das nanopartículas, o eletrodo **Au/3-MPA/CSH/AuNp** foi utilizado na determinação de peróxido de hidrogênio em soluções de concentrações crescentes em tampão fosfato 0,1 $molL^{-1}$ pH 7,2.

Palavras-chave: eletrodo modificado, monocamadas auto-arranjadas, nanopartículas.

Development of self-assembled monolayers of thiols on gold electrodes and aplication on the formation *in situ* of gold nanoparticles

Abstract

Gold electrodes were used for surface modification through the incorporation of self-assembled monolayers of thiols. Pre-treatment of the metal substrate is essential for achieving good stability and reproducibility of the molecular architecture in the surface developed, and provides data used in the calculation of the active area, used to normalize surface coating values, which were obtained throughout the desorption measurements of 3-mercaptopropionic acid. The modification consisted on coating gold probes with 3-mercaptopropionic acid by dipping the **Au** electrode in 25 mmolL^{-1} solution of this compound, in which were, later, anchored cysteine molecules, by dipping of the **Au/3-MPA** electrode in 0.1 molL^{-1} solution of this compound, resulting in a **Au/3-MPA/CSH** sensor. Cysteine molecules were used as a reducing agent to obtain gold nanoparticles on the surface of the modified electrode through application of 20 µL of $HAuCl_4$. After confirming the absence of the thiol redox couple responsible for the reduction of gold nanoparticles, the **Au/3-MPA/CSH/AuNp** electrode was used to determine hydrogen peroxide in phosphate buffer 0.1 molL^{-1} pH 7.2.

Keywords: modified electrode, self-assebled monolayers, nanoparticles.

Sumário

Sumário 11

1. Introdução 17

1.1 Eletrodos quimicamente modificados 17

1.2 Eletrodos modificados com camadas auto-arranjadas 20

1.2.1 Superfície eletródica 24

1.3 Eletrodos modificados com nanopartículas 25

1.4 Eletrodos de diamante dopado com boro 28

1.5 Analitos de interesse 29

2. Objetivos 32

3. Materiais e Métodos 33

3.1 Reagentes e soluções 33

3.2 Célula eletroquímica 34

3.3 Equipamentos 35

3.4 Eletrodo modificado de EAu/3-MPA/CSH/AuNp 35

3.4.1 Pré-tratamento do eletrodo de ouro 35

3.4.2 Formação da camada auto-arranjada de 3-MPA sobre o eletrodo de ouro 36

3.4.3 Ancoramento da cisteína sobre o eletrodo de ouro recoberto com 3-MPA 37

3.4.4 Ativação eletroquímica do eletrodo Au/3-MPA/CSH 37

3.4.5 Formação de nanopartículas de ouro à partir das moléculas de cisteína ancorada na superfície do eletrodo Au/3-MPA/CSH 38

3.4.6 Fluxograma do procedimento experimental 39

3.4.7 Redução de peróxido de hidrogênio 40

3.5 Cálculo da área ativa do eletrodo de ouro 40

3.6 Cálculo do recobrimento superficial do eletrodo de ouro com 3-MPA. 41

3.7 Eletrodo de diamante dopado com boro 42

3.7.1 Limpeza do eletrodo 42

3.7.2 Tratamentos de Superfície 43

3.7.3 Determinação dos compostos indólicos por técnicas voltamétricas 44

4. Resultados e Discussão 46

4.1 Eletrodo modificado de Au/3-MPA/CSH/AuNp 46

4.1.1 Pré-tratamento eletroquímico do eletrodo de ouro em H_2SO_4 46

4.1.2 Otimização das condições experimentais para o recobrimento do eletrodo Au/3-MPA – Avaliação da reprodutibilidade do processo de Adsorção/Dessorção de 3-MPA 49

4.1.3 Ancoramento da cisteína e ativação eletroquímica 57

4.1.4 Efeito da lavagem superficial do eletrodo Au/3-MPA/CSH 65

4.1.5 Utilização da superfície do eletrodo de Au/3-MPA/CSH para redução, "in situ", de ouro com formação de nanopartículas 67

4.1.6 Redução de peróxido de hidrogênio 69

4.2 Eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB) 71

4.2.1 Determinação de compostos indólicos 71

5. Conclusão 75

6. Perspectivas futuras 79

7. Bibliografia 80

Lista de Figuras

Figura 1 - Figura ilustrativa referente à interação de alcanotióis no retículo de um eletrodo de ouro em uma camada auto-arranjada. Os átomos de enxofre estão representados em branco e os átomos que constituem o eletrodo de ouro estão representados em amarelo – Figura própria. 23

Figura 2 - Fluxograma do procedimento experimental adotado na construção do eletrodo de **Au/3-MPA/CSH/AuNp**. Entre cada uma das etapas citadas, o eletrodo foi lavado com água e etanol..... 39

Figura 3 - Voltamograma cíclico de limpeza eletroquímica em H_2SO_4, no qual a área em destaque representa a dessorção de oxigênio presente na forma de óxido de ouro..... 41

Figura 4 - Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodos de **Au** em solução 0,1molL^{-1} de H_2SO_4 para o Eletrodo 1 (▬▬) e o Eletrodo 2 (▬ ▬). 47

Figura 5 - Voltamogramas cíclicos (10° ciclo) obtidos com o eletrodo de **Au** em solução 0,5 molL^{-1} de H_2SO_4 usando o eletrodo de ouro após tratamento com solução "piranha", previamente polido em suspensão de alumina (0,1µm e 1 µm). 52

Figura 6 - Voltamogramas cíclicos (1° ciclo) obtidos em solução 0,5 molL^{-1} de KOH após a imersão do eletrodo de **Au** em soluções etanólicas com concentrações distintas. 52

Figura 7 - Curva de recobrimento superficial ($\Gamma 3 - \mathrm{MPA}$)) para o eletrodo de **EAu/3-MPA** ao variar as concentrações da solução de imersão de 3-MPA. ... 53

Figura 8 - Voltamogramas cíclicos (10° ciclo) obtidos com o eletrodo de **Au** em solução 0,5 molL^{-1} de H_2SO_4 usando o eletrodo de ouro após tratamento com

solução "piranha", previamente polido em suspensão de alumina (0,1µm e 1 µm). 55

Figura 9 - Voltamogramas cíclicos (1° ciclo) obtidos com o eletrodo de **Au/3-MPA** em solução 0,5 molL^{-1} de KOH após a imersão do eletrodo de ouro em solução etanólica 25 mmolL^{-1} de 3-MPA por tempos distintos. 56

Figura 10 - Curva de recobrimento superficial ($\Gamma 3 - \mathrm{MPA}$) para o eletrodo **EAu/3-MPA** como função do tempo de imersão em solução 25 mmolL^{-1} de 3-MPA. . 57

Figura 11 - Voltamogramas cíclicos (1° e 100° ciclo) da ativação eletroquímica do eletrodo **Au/3-MPA/CSH** obtido em solução tampão fosfato 0,1molL^{-1} pH 7,2. 58

Figura 12 - Voltamogramas cíclicos (100 ciclos) da ativação eletroquímica do eletrodo **Au/3-MPA/CSH** em solução tampão fosfato 0,1molL^{-1} pH 7,2..... 60

Figura 13 - Voltamogramas cíclicos (100 ciclos) da ativação eletroquímica do eletrodo **Au/3-MPA/CSH** em solução tampão fosfato 0,1molL^{-1} pH 7,2..... 60

Figura 14 - Voltamogramas cíclicos (100° ciclo) da ativação eletroquímica do eletrodo **Au/3-MPA/CSH** em solução tampão fosfato 0,1molL^{-1} pH 7,2..... 61

Figura 15 - Voltamogramas cíclicos (100 ciclos) da ativação eletroquímica do eletrodo **Au/3-MPA/CSH** em solução tampão fosfato 0,1molL^{-1} pH 7,2..... 62

Figura 16 - Voltamogramas cíclicos (100 ciclos) da ativação eletroquímica do eletrodo **Au/3-MPA/CSH** em solução tampão fosfato 0,1molL^{-1} pH 7,2..... 63

Figura 17 - Voltamogramas cíclicos (100° ciclo) da ativação eletroquímica do eletrodo **Au/3-MPA/CSH** em solução tampão fosfato 0,1molL^{-1} pH 7,2..... 63

Figura 18 - Voltamogramas cíclicos (100° ciclo) da ativação eletroquímica do eletrodo **Au/3-MPA/CSH** em solução tampão fosfato 0,1molL^{-1} pH 7,2..... 65

Figura 19 - Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo modificado **Au/3-MPA/CSH** em solução tampão fosfato 0,1molL-1 pH 7,2, após lavagem com (▬▬) água e (▬▬) tampão acetato/ácido acético 0,1molL^{-1} pH 4,7. 66

Figura 20 - Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de (▬▬) **Au/3-MPA/CSH** e o eletrodo de (▬ ▬) **Au/3-MPA/CSH/AuNpT** em solução tampão fosfato 0,1molL^{-1} pH 7,2. 68

Figura 21 - Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de (▬▬) **Au/3-MPA/CSH** e o eletrodo de (▬ ▬) **Au/3-MPA/CSH/AuNp** em solução tampão fosfato 0,1molL^{-1} pH 7,2. 69

Figura 22 - Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de **Au** limpo e pré-tratado em solução tampão fosfato 0,1 molL^{-1}, pH 7,2, contendo concentrações crescentes de peróxido de hidrogênio (100, 200, 300 e 400 µmolL^{-1})..... 70

Figura 23 - Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de **Au/3-MPA/CSH/AuNp**, em solução tampão fosfato 0,1 molL^{-1}, pH 7,2, contendo concentrações crescentes de peróxido de hidrogênio (100, 200, 300 e 400 µmolL^{-1}). 70

Figura 24 - Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de **DDB** após diferentes tratamentos de superfície, obtidos em solução tampão fosfato 0,1molL^{-1} pH 7,2 contendo (A) indol, (B) L-triptofano e (C) serotonina. 72

Figura 25 - Voltamogramas de onda quadrada dos eletrodos de **DDB** após diferentes tratamentos de superfície, obtidos em tampão fosfato 0,1 molL^{-1} pH 7,2 contendo soluções de concentração 100µmolL^{-1} de (1) indol, (2) L-triptofano e (3) serotonina. 74

1. Introdução

1.1 Eletrodos quimicamente modificados

O desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados tem sido alvo de pesquisas devido à versatilidade de preparação, efeitos catalíticos e alta gama possível de aplicações (FOSS JR.; MARTIN, 1994; MURRAY; GOODENOUGH; ALBERY, 1981), além da minimização de problemas comumente associados aos sensores eletroquímicos tradicionais, tais como efeitos de adsorção e bloqueio superficial, além de falta de sensibilidade e seletividade (FREIRE *et al.*, 2003). Outra vantagem destes dispositivos é a possível mimetização de eventos presentes em sistemas biológicos, o que amplia a compreensão acerca dos mecanismos de inúmeros processos químicos e bioquímicos (CERDÁ *et al.*, 2015). O estudo dos mecanismos de transferência eletrônica na superfície eletródica, somado aos fatores previamente citados, impulsiona até os tempos atuais o desenvolvimento de diferentes arquiteturas moleculares sobre eletrodos sólidos.

A modificação de eletrodos foi primeiramente abordada há mais de três décadas, e desde então estes dispositivos tem sido construídos utilizando diversos métodos de preparo, tais como, recobrimento com filmes poliméricos (OYAMA; ANSON, 1979), moléculas inorgânicas (FITCH, 1990; ROLISON, 1990), formação de filmes de Langmuir-Blodgett (FASCI, 1992), adsorção

química (BROWN; ANSON, 1977; MURRAY, 1980), entre outros. Dentre as diversas possibilidades para modificação de superfícies eletródicas, aquelas que utilizam o conceito de adsorção química são, geralmente, as mais simples (COLLARD; FOX, 1991). Embora vários dos métodos citados acima tenham sido abordados anteriormente à introdução do conceito de eletrodos modificados, este termo é mais utilizado quando existe uma correlação clara entre o procedimento superficial de modificação do eletrodo e sua aplicação final. Espécies como o ferroceno, além de proteínas como o citocromo-c, complexos metálicos e enzimas como peroxidase e superóxido dismutase, que são estruturas supramoleculares, podem atuar como mediadores eletrônicos entre o analito e a superfície do eletrodo, e por isso, tem sido muito utilizadas.

O recobrimento da superfície de eletrodos com filmes poliméricos teve grande destaque, principalmente devido à versatilidade, reprodutibilidade, e praticidade na construção de eletrodos modificados. A elaboração de compostos poliméricos funcionalizados com moléculas eletroativas ou, até mesmo iônicas, pode promover um elemento de reconhecimento especifico por meio do grupo redox presente no agente modificador ou ainda um aumento na condutividade eletrônica na superfície do eletrodo. Filmes poliméricos inertes também podem proporcionar uma barreira mecânica a fim de minimizar a lixiviação do material modificador do eletrodo. Um dos compostos mais utilizados na fixação mecânica do agente modificador de superfície é o Nafion®, que tem a capacidade de estabelecer um equilíbrio de troca iônica na interface eletrodo/solução (SZENTIRMAY; MARTIN, 1984), além de apresentar seletividade por exclusão de carga.

A utilização de materiais inorgânicos na construção de eletrodos é preferencialmente escolhida quando os sensores devem ser utilizados em ambientes fisicamente e/ou quimicamente agressivos, devido a maior resistência mecânica da camada modificadora. Muitas vezes, a presença de um centro metálico no reagente modificador é importante, devido à possibilidade de estabelecer interação seletiva com o analito. O $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$, conhecido por azul da Prússia, é um agente modificador de destaque no preparo de sensores eletroquímicos que promovem a redução eletrocatalítica de oxigênio a água, ou ainda a interação com diversos analitos de interesse biológico (ITAYA; SHOJI; UCHIDA, 1984).

O recobrimento de eletrodos com substâncias biológicas impulsionou a utilização do conceito de adsorção química como método de modificação de transdutores convencionais (GORTON et al., 1984). A interação acontece devido a atração causada pela densidade eletrônica do agente modificador com a superfície eletródica. A interação de diversos compostos aromáticos em eletrodos de carbono, no qual a densidade de elétrons π é compartilhada entre o eletrodo e o agente modificador pode exemplificar este tipo de método de modificação (BROWN; ANSON, 1977), ainda que os primeiros estudos tenham sido realizados empregando superfícies de platina (LANE; HUBBARD, 1973). A formação de uma monocamada do modificador sobre a superfície eletrodica é um fator limitante para a quantidade de material do agente modificador presente, condição esta em que se obtém a maior taxa de recobrimento superficial possível. O contrário é observado na utilização de filmes poliméricos como método de recobrimento, os quais normalmente são incorporados na forma de multicamadas, promovendo um aumento na espessura do filme e

consequentemente, um aumento no tempo de resposta do sensor. O modelo de monocamada foi introduzido por Langmuir-Blodgett (FASCI, 1992), e ilustra a adsorção de moléculas orgânicas anfifílicas em um substrato sólido. Apesar de este método ter sido amplamente utilizado, as moléculas, quimicamente adsorvidas, aos poucos se difundem para a solução durante as investigações eletroquímicas, com este fenômeno podendo governar a "reversibilidade" e a "irreversibilidade" do processo do eletrodo.

Na formação de filmes por ligação química, a interação entre os agentes modificadores e a superfície do eletrodo é resultante de um compartilhamento de elétrons, podendo este ser termodinamicamente favorável ou obtido mediante potencial aplicado. A formação de uma ligação covalente entre as espécies favorece a transferência de carga heterogênea ao longo do sensor, possibilitando assim limites de detecção e quantificação menores, porém o processo de modificação exige um tempo maior de contato entre a solução contendo o agente modificador e o substrato sólido (eletrodo ou transdutor).

Diversos agentes modificadores e superfícies metálicas podem ser utilizados na formação espontânea de camadas auto-arranjadas, método de modificação baseado no conceito de ligação química, o qual tem sido amplamente estudado nos últimos anos (DUBOIS; NUZZO, 1992).

1.2 Eletrodos modificados com camadas auto-arranjadas

A formação de camadas auto-arranjadas na superfície de um transdutor comum ganhou destaque devido à alta organização da camada formada decorrente da espontaneidade no processo termodinâmico, e à simplicidade do mesmo (LEE, 1990). O agente modificador é escolhido com a finalidade de promover seletividade no reconhecimento de um analito ou um grupo de analitos, dependendo do grupo funcional presente na extremidade livre do agente modificador. As aplicações destes dispositivos variam, desde a quantificação de espécies de interesse biológico (RAHMAN; ASIRI, 2015), biomimetização (CALVELO; VÁZQUEZ; GARCÍA-FANDIÑO, 2015), à estudos que avaliam a velocidade de transferência eletrônica na superfície do eletrodo modificado (FREIRE et al., 2003), entre outros.

Este tipo de modificação promove a formação de filmes com alta regularidade e devido, principalmente, às interações entre as cadeias laterais das moléculas do agente modificador. A interação lateral pode ocorrer entre grupos funcionais presentes na extensão da cadeia, do agente modificador ou até mesmo, entre as cadeias alifática de diversos tamanhos. Já a natureza da modificação advém da formação de uma ligação covalente entre o agente modificador e o transdutor embora, em alguns casos, a adsorção química pode originar a formação de filmes auto-arranjados (PRIME; WHITESIDES, 1993).

Eletrodos ou transdutores constituídos por metais nobres como o ouro, paládio, platina e prata apresentam alta afinidade por agentes modificadores contendo grupos doadores de pares eletrônicos, tais como grupos tiólicos e aminas. Durante o processo de ligação química envolvendo transdutor de ouro e compostos tiólicos, a seguinte reação deve ser considerada:

$$R\text{-}SH + M \rightleftharpoons R\text{-}S\text{-}M + H^{+} + 1e^{-}$$ **Reação 1**

Além disto, eletrodos constituídos por estes metais apresentam uma superfície susceptível a diversos tipos de funcionalização (RAGHEB; GEDDES, 1990). Estas superfícies também apresentam uma ampla janela de potencial e baixa corrente de fundo (CHEN; LI, 2006). Do ponto de vista biológico, os grupos tiólicos atuam como sinalizadores celulares (MORAN; GUTTERIDGE; QUINLAN, 2001; SEN, 1998) e sinalizadores redox do meio biológico (ARRIGO, 1999), já que se encontram na composição de diversos peptídeos, promovendo o enovelamento de determinadas proteínas, ocasionado pela formação de pontes de dissulfeto entre aminoácidos (FILOMENI; ROTILIO; CIRIOLO, 2002; WEDEMEYER et al., 2000).

A alta afinidade por átomos de ouro deve-se ao fato do processo de adsorção ser termodinamicamente favorável, com liberação de 40 a 50 kcal/mol (FORD; MASENS; CORTIE, 2006). A modificação de eletrodos de ouro pela formação de monocamadas auto-arranjadas de tióis se destaca, mais devido à facilidade de preparação e a versatilidade de construção da arquitetura superficial do que a reprodutibilidade do processo em si. A utilização desta abordagem na construção de eletrodos modificados permite o ancoramento de macromoléculas importantes como DNA (STEEL; HERNE; TARLOV, 1998), enzimas (DONG; LI, 1997; GOODING; HIBBERT, 1999), proteínas e aminoácidos (BOND et al., 1990) e até mesmo metais, na forma de

nanopartículas (XU; HAN, 2004) ou complexos (MASKUS; ABRUÑA, 1996) sobre a monocamada construída.

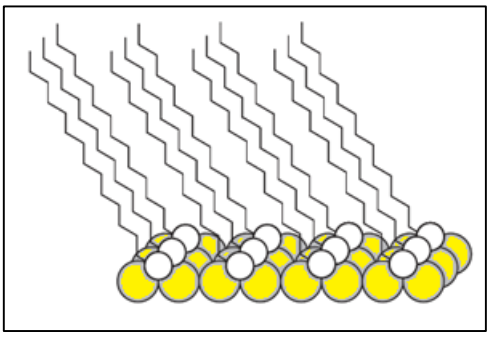


Figura 1 - Figura ilustrativa referente à interação de alcanotióis no retículo de um eletrodo de ouro em uma camada auto-arranjada. Os átomos de enxofre estão representados em branco e os átomos que constituem o eletrodo de ouro estão representados em amarelo – Figura própria.

Dentre esta classe de compostos sulfonados, os alcanotióis com uma extremidade funcionalizada (-NH_2, -COOH) ganharam destaque porque esta extremidade pode ser utilizada na obtenção um “design” específico de superfície (SAWAGUCHI; SATO; MIZUTANI, 2001). Deve-se atentar que a sensibilidade do eletrodo modificado a certos analitos pode diminuir, dependendo da cinética de transferência de carga heterogênea no eletrodo, que, normalmente, é dependente tanto do tamanho da cadeia carbônica saturada na monocamada de tiol, quanto da presença de outros grupos funcionais presentes na mesma. O ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA) é um tiol de cadeira curta, com três unidades de carbono, e um grupamento carboxílico terminal, que pode ser utilizado no ancoramento de proteínas como citocromo-c (ALLEN et al., 1984; SONG et al., 1993) e outras moléculas biológicas (ŁUCZAK, 2009).

A caracterização da funcionalidade e reatividade superficial da camada modificadora pode ser efetuada por meio de técnicas voltamétricas (GODÍNEZ; CASTRO; KAIFER, 1996; SATO; MIZUTANI, 1998), técnicas capacitivas (KAKIUCHI et al., 2000), medidas em balanças de quartzo (SUGIHARA; SHIMAZU; UOSAKI, 2000), STM (*Scanneling Tunneling Microscopy*) (GIZ; DUONG; TAO, 1999) e AFM (*Atomic Force Microscopy*) (HU; BARD, 1997).

Quando se utilizam eletrodos metálicos para desenvolvimento de eletrodos modificados com camadas auto-arranjadas de tióis, a resposta eletroquímica é altamente dependente da estabilidade e reprodutibilidade da condição superficial do metal. Sendo assim, o pré-tratamento de eletrodos de ouro deve proporcionar a obtenção de uma superfície homogênea para o ancoramento de tióis e o empacotamento das camadas auto-arranjadas formadas (CARVALHAL; FREIRE; KUBOTA, 2005).

1.2.1 Superfície eletródica

O empacotamento de agentes modificadores depende diretamente da homogeneidade da superfície do eletrodo e, normalmente, defeitos na monocamada afetam o comportamento eletroquímico do dispositivo (LI et al., 2014). A rugosidade é um parâmetro importante na construção de camadas auto-arranjadas, já que influencia diretamente a reprodutibilidade das medidas e o empacotamento dos agentes modificadores. A heterogeneidade do eletrodo esta associada tanto à utilização de eletrodos de ouro policristalinos, os quais possuem planos cristalográficos distintos disponíveis, quanto à presença de

moléculas adsorvidas ou óxidos do material do eletrodo, pois em ambos os casos a adsorção do agente modificador pode ocorrer com energias distintas, resultando em um filme menos organizado. A fim de minimizar as imperfeições na morfologia dos filmes formados e, concomitantemente aumentar a organização das moléculas modificadoras, é necessário efetuar um procedimento de pré-tratamento da superfície do eletrodo.

Um maior recobrimento de tióis de cadeia carbônica longa, na forma de camadas auto-arranjadas, pode ser atingido ao realizar o pré-tratamento de eletrodos de ouro com água régia, solução piranha ou até mesmo com polimento mecânico (FENG et al., 2011). Normalmente, superfícies mais reprodutíveis são resultantes de uma somatória de efeitos obtidos com os tratamentos químicos e eletroquímicos, o que minimiza a heterogeneidade do eletrodo (CARVALHAL; FREIRE; KUBOTA, 2005). O estudo da reprodutibilidade destes eletrodos pode ser realizado através da obtenção de diversos parâmetros, dentre os quais a área real (área ativa) da superfície eletródica ganha destaque. A literatura recomenda que tal parâmetro seja estudado através de capacitância superficial, adsorção de hidrogênio ou oxigênio (FISICA; MILANO, 1991). É possível que o cálculo da área ativa seja realizado através dos dados fornecidos no pré-tratamento eletroquímico de eletrodos de ouro, o qual promove a formação de óxidos de ouro superficiais, e a posterior redução dos mesmos (HOOGVLIET et al., 2000).

1.3 Eletrodos modificados com nanopartículas

Outros sistemas que têm apresentado grandes aplicações são aqueles em que os dispositivos são preparados utilizando nanomateriais, principalmente as nanopartículas metálicas. Efeitos benéficos tais como o aumento da velocidade de transferência de carga na interface eletrodo/solução, efeito eletrocatalítico e aumento de área ativa do dispositivo já foram relatados (WELCH; COMPTON, 2006). As nanopartículas apresentam propriedades óticas, magnéticas, eletrônicas e químicas singulares, diferenciadas do material macroestruturado ou “bulk” e têm sido utilizadas em dispositivos eletroquímicos visando, principalmente, a determinação de moléculas de grande interesse biológico: tem-se ganho em sensibilidade e seletividade, em relação às respostas obtidas com eletrodos convencionais (ALI et al., 2014; IKEGAMI et al., 2011). Evidentemente, parâmetros como tamanho, formato e distribuição das nanopartículas são fatores determinantes no favorecimento dos processos de superfície.

As propriedades catalíticas de certas nanopartículas podem resultar na diminuição no potencial no qual ocorre uma certa reação química, aumentando a reversibilidade do sistema em relação às respostas observadas com macroeletrodos (WELCH; COMPTON, 2006). A modificação de eletrodos com nanopartículas de ouro tornou possível a separação dos picos de oxidação da dopamina e ácido ascórbico (RAJ; OKAJIMA; OHSAKA, 2003). Os efeitos catalíticos podem ser também resultantes da combinação entre as nanopartículas e o meio em que estas se encontram incorporadas. Um aumento na sensibilidade de um eletrodo modificado para determinação de dopamina e hidroquinona, foi observado em um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro, sintetizadas e incorporadas no transdutor com albumina

(MISCORIA; BARRERA; RIVAS, 2005). Este aumento na sensibilidade pode ser atrelado à maior dispersão das nanopartículas presentes superfície modificada, ocasionando uma melhora na velocidade de transferência de carga heterogênea.

O desenvolvimento de biossensores utilizando nanopartículas de ouro também ganha destaque, devido à possibilidade de transferência de carga direta entre moléculas biológicas e o macroeletrodo, evitando, assim, a necessidade de um mediador (PINGARRÓN; YÁÑEZ-SEDEÑO; GONZÁLEZ-CORTÉS, 2008). Processos redox de espécies como H_2O_2, O_2 e NADH também são catalisados por eletrodos modificados com nanopartículas de ouro (RASHID et al., 2006).

Os precursores mais comumente utilizados no preparo de nanopartículas de ouro (~20 nm) são o cloreto de ouro ($AuCl_3$) e o ácido tetracloroáurico ($HAuCl_4$), reagentes utilizados em um dos métodos de síntese mais simples, chamado de Turkevich (KIMLING et al., 2006; LEE; PARK, 2011), em que o citrato de sódio age, semelhantemente, como agente redutor e dispersante. Agentes redutores como hidroxifenóis também promovem, dependendo da acidez do meio, a redução do ouro presente nos compostos acima citados, possibilitando uma fabricação controlada da morfologia das nanopartículas de ouro sintetizadas (SIRAJUDDIN et al., 2010). Uma outra forma de promover a formação de nanopartículas de ouro é através da utilização de solução tampão MES (ácido 2-morfolinoetanosulfônico) e HEPES (ácido 4 - (2 - hidroxietil) piperazina - 1 - etano - sulfônico), mesmo que estas possuam maior dimensão em relação às obtidas com o método de Turkevich (HABIB; TABATA; WU, 2005).

1.4 Eletrodos de diamante dopado com boro

Transdutores eletroquímicos possuem características que permitem sua utilização em diversas determinações, dependendo da espécie e o sistema a serem analisados. Para cada medida, a escolha do material eletródico é de extrema importância a fim de evitar interações indesejadas, além de manter resultados comparáveis e reprodutíveis.

Eletrodos de carbono ganham destaque pelas vantagens apresentadas em relação a outros eletrodos convencionais, possuindo uma boa faixa de potencial de trabalho e superfícies mais reprodutíveis, além de serem, em termos de custo, facilmente adquiridos. Ainda assim, sua utilização em sistemas com analitos orgânicos é desfavorável, devido à possível adsorção química destas moléculas, evitando a renovação superficial e causando bloqueio de resposta eletroquímica (BRETT; BRETT; TUGULEA, 1996). Tendo em vista estas dificuldades apresentadas pelo eletrodo de carbono vítreo, a utilização de superfícies de diamante ganham destaque, ainda que, a principio, formem uma barreira isolante no transporte de carga do eletrodo. A fim de contornar tal propriedade, foram desenvolvidos filmes de diamante dopados com boro, os quais, presentes nos interstícios cristalográficos do diamante, promovem uma maior condutibilidade ao longo do material eletródico (RITA DE CÁSSIA MENDES DE BARROS, 2007).

O eletrodo de diamante dopado com boro (**EDDB**) apresenta corrente de fundo menor em comparação a outros eletrodos à base de carbono, pode ser utilizado em aplicações que necessitam de uma janela de potencial ampla em

soluções aquosas (até 3,5V), além de estabilidade química por longos períodos. Fatores como o nível de dopagem de boro, a presença de impurezas (carbonos sp^2) e os grupos presentes na superfície do eletrodo afetam diretamente suas propriedades.

O pré-tratamento dos eletrodos de diamante dopados com boro permite a modificação dos grupos funcionais superficiais, promovendo superfícies de caráter hidrofóbico ou hidrofílico (LOURENÇÃO et al., 2010).

O pré-tratamento eletroquímico catódico confere ao eletrodo uma superfície com terminações de hidrogênio devido à varredura de potencial no sentido negativo. O contrário é observado na superfície dos eletrodos submetidos ao pré-tratamento eletroquímico anódico, aos quais são conferidas terminações oxigenadas, devido à varredura de potencial no sentido positivo.

O pré-tratamento térmico, dependendo da presença ou ausência de O_2 na atmosfera no qual for realizado, confere ao eletrodo mudanças nas terminações superficiais, podendo estas obter um caráter hidrofílico (terminações hidrogenadas) ou hidrofóbico (terminações oxigenadas).

A comparação entre os resultados apresentados por diferentes eletrodos, na resposta de um mesmo analito, possibilita a maior compreensão de um sistema, fator este que motiva a utilização do **EDDB** nas medidas comparativas a serem realizadas neste trabalho.

1.5 Analitos de interesse

O estresse oxidativo, caracterizado por um aumento na produção de espécies reativas oxidantes, do inglês, RNS (*reactive nytrogen species*) e ROS (*reactive oxigen species*), causa danos significativos à componentes biológicos de extrema importância, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Com a finalidade de combater estes efeitos, a presença de um sistema antioxidante constituído por um conjunto de vias enzimáticas e não-enzimáticas que promovem a eliminação dos radicais livres do meio intracelular, é necessária (JACOB, 1995). Os grupos tiólicos presentes em moléculas como a cisteína e a glutationa, abundantes no interior celular e envolvidas na regulação do potencial, são capazes de inibir os efeitos de certos radicais livres, o que os torna fundamentais no controle dos efeitos do estresse oxidativo.

O peróxido de hidrogênio, espécie reativa de oxigênio presente no meio intracelular, é amplamente estudado e quantificado por técnicas eletroquímicas, principalmente nas quais são utilizados compostos com grupos tiólicos superficiais (POMPELLA et al., 2003). Embora, no meio celular, este atue como agente oxidante, seu caráter é dependente do valor de pH do meio, conforme as **Reações 2** e **3**.

$H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2H_2O$ (agente oxidante) **Reação 2**

$H_2O_2 + 2OH^- \rightarrow O_2 + H_2O + 2e^-$ (agente redutor) **Reação 3**

Assim como o peróxido de hidrogênio, os compostos indólicos são encontrados no meio biológico e também atuam como sinalizadores

intracelulares, além mesmo de, como fármacos, possuírem propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antioxidantes, alvos de alto interesse científico. A investigação do comportamento redox de espécies biológicas através de técnicas eletroquímicas permite a obtenção de informações relevantes sobre os mecanismos de atuação desta classe de compostos, principalmente devido à semelhança entre os produtos de reação obtidos eletroquimicamente e via enzimática. Os processos de oxidação de derivados indólicos como triptofano, um aminoácido precursor, e serotonina, um neurotransmissor, foram estudados em eletrodos de carbono, ouro, platina e diamante dopado com boro (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011).

2. Objetivos

a. Preparar eletrodos de ouro modificados com camadas auto-arranjadas de ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA) e ancorar, sobre o 3-MPA, moléculas de cisteína.

b. Desenvolver e otimizar metodologia para utilizar esta superfície como superfície redutora para a formação de nanopartículas de **Au**.

c. Avaliar a possibilidade de aplicação destes sensores para redução de peróxido de hidrogênio e caracterização eletroquímica de compostos indólicos. Comparação destes resultados com aqueles obtidos em eletrodos de diamante dopado com boro.

3. Materiais e Métodos

3.1 Reagentes e soluções

As soluções aquosas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,5 $molL^{-1}$ foram preparadas pela diluição do reagente comercial 97,5% em água deionizada. As soluções aquosas de ácido clorídrico (HCl) 0,1 $molL^{-1}$ foram preparadas pela diluição do reagente comercial 37% em água deionizada. As soluções aquosas de ácido nítrico (HNO_3) 1,0 $molL^{-1}$ foram preparadas pela diluição do reagente comercial 65% em água deionizada. As soluções aquosas de hidróxido de potássio (KOH) 0,5 $molL^{-1}$ foram preparadas pela dissolução da quantidade apropriada do reagente em água deionizada. As soluções aquosas de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 $molL^{-1}$ foram preparadas pela dissolução da quantidade apropriada do reagente em água deionizada. A solução denominada "piranha" foi preparada a partir de um reagente comercial de ácido sulfúrico 97,5% e uma solução comercial de peróxido de hidrogênio 30%, ambos da Merck, em uma proporção de 1:1.

A solução tampão fosfato 0,1 $molL^{-1}$ pH 7,2 foi preparado pela dissolução de quantidades apropriadas de fosfato dissódico (Na_2HPO_4) e fosfato monossódico (NaH_2PO_4) da Sigma-Aldrich em água deionizada. As soluções aquosas de ácido morfolinoetanossulfônico (MES) foram preparadas utilizando o padrão Sigma-Aldrich. Estas soluções foram neutralizadas com solução NaOH,

para a preparação do tampão MES 0,2 $molL^{-1}$, pH 6,2, de modo a obter proporções iguais do ácido e de seu respectivo sal.

As soluções estoque de cisteína (CSH) na concentração de 0,1 $molL^{-1}$ foram preparadas pela dissolução de quantidade apropriada de cloridrato de L-cisteína anidra 98% Sigma-Aldrich em tampão MES 0,2 $molL^{-1}$. A solução etanólica estoque de ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA) de 0,1 $molL^{-1}$ foi preparada pela diluição do padrão do composto líquido 98%, em etanol anidro da Sigma-Aldrich.

A solução estoque 10 $mmolL^{-1}$ de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi preparada a partir da diluição de solução padrão 30% da Merck em água deionizada.

As soluções aquosas estoque de indol, triptofano e serotonina foram preparadas a partir da quantidade apropriada dos respectivos compostos na concentração de 100 $\mu molL^{-1}$.

Todos os reagentes foram de grau analítico, as soluções preparadas com água deionizada e utilizadas logo após o preparo.

3.2 Célula eletroquímica

As medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula eletroquímica constituída de um copo de vidro com capacidade volumétrica de 20 mL para solução de eletrólito de suporte. Foi utilizado um sistema eletroquímico

convencional de três eletrodos, sendo o eletrodo de trabalho (ET) um eletrodo de ouro (da marca Metrohm, com área geométrica = 0,071 cm²) para as medidas referentes ao eletrodo com camadas auto-arranjadas, e um eletrodo de diamante dopado com boro para medidas comparativas posteriores. Os eletrodos de Ag/AgCl, $KCl_{(sat)}$ e um fio de platina foram utilizados como eletrodo de referência (ER) e eletrodo auxiliar (EA), respectivamente.

Todos os reagentes foram de grau analítico e as soluções preparadas com água deionizada.

3.3 Equipamentos

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada obtida de um deionizador de osmose reversa GEHAKA modelo OS10LX. Um pH-metro modelo 654 acoplado a um eletrodo de vidro, ambos da METROHM, foram utilizados para as medições de pH. As medições voltamétricas foram efetuadas usando um potenciostato µAutoLab type III, interfaceado a um computador utilizando o software NOVA, versão 1.11.

3.4 Eletrodo modificado de EAu/3-MPA/CSH/AuNp

3.4.1 Pré-tratamento do eletrodo de ouro

O eletrodo foi polido durante 1 minuto com suspensões de alumina com granulometria de 0,3 e 1,0 µm sobre uma superfície de feltro. Em seguida, o eletrodo foi imerso em solução "piranha" ($H_2SO_{4(c)}$ + H_2O_2 30%, 1:1 v/v) por 5 minutos e, finalmente, imerso em etanol anidro por 10 minutos. Na sequência, foram obtidos voltamogramas cíclicos (10 ciclos) em solução 0,5 $molL^{-1}$ de H_2SO_4, no intervalo de potencial de -0,2V a 1,6V com velocidade de varredura de 100 mVs^{-1}. O eletrodo foi lavado com água e etanol entre todas as etapas acima descritas.

3.4.2 Formação da camada auto-arranjada de 3-MPA sobre o eletrodo de ouro

A formação de camadas auto-arranjadas de tióis sobre a superfície de um eletrodo de ouro foi efetuada pela imersão do eletrodo em solução do agente modificador, 3-MPA. Os parâmetros como tempo de imersão e concentração da solução etanólica de 3-MPA foram estudados a fim de otimizar as condições de formação da camada auto-arranjada de 3-MPA sobre um eletrodo de ouro. Estudos de dessorção eletroquímica em solução aquosa de KOH 0,5 $molL^{-1}$, no intervalo de potencial de 0,0V a -1,3V com uma velocidade de varredura de 10 mVs^{-1} foram utilizados para avaliar a reprodutibilidade da formação da camada auto-arranjada de 3-MPA. A quantidade de 3-MPA ancorada na superfície do eletrodo de ouro foi determinada usando a área dos picos de dessorção registrados nos voltamogramas obtidos. O eletrodo assim modificado foi denominado **EAu/3-MPA**. O procedimento de dessorção eletroquímica acima

descrito foi adotado com a finalidade de estudar as condições ideais para ancoramento do 3-MPA sobre a superfície do eletrodo de ouro. Durante a construção do eletrodo **Au/3-MPA/CSH/AuNp**, tal procedimento não foi adotado pois promove a dessorção do 3-MPA, impedindo o ancoramento das moléculas de cisteína.

3.4.3 Ancoramento da cisteína sobre o eletrodo de ouro recoberto com 3-MPA

O ancoramento de moléculas de cisteína sobre a superfície do eletrodo **Au/3-MPA** foi efetuado pela imersão do mesmo em solução de cisteína (concentrações variáveis) em tampão MES 0,2 $molL^{-1}$. Parâmetros como tempo de imersão e concentração da solução de cisteína foram variados com o objetivo de determinar a maior saturação superficial dos sítios de ligação presentes na molécula de 3-MPA. Após este processo o eletrodo modificado foi lavado com água deionizada e denominado **EAu/3-MPA/CSH**.

3.4.4 Ativação eletroquímica do eletrodo **Au/3-MPA/CSH**

Para a ativação eletroquímica do **EAu/3-MPA/CSH**, o eletrodo foi transferido para uma célula eletroquímica contendo solução tampão fosfato 0,1 $molL^{-1}$ pH 7,2, como eletrólito de suporte. Após a imersão dos eletrodos de referência e auxiliar, foram efetuados voltamogramas cíclicos no intervalo de

potencial de -0,2V a 0,3V com velocidade de varredura de 20 mVs^{-1}, até estabilização das correntes de pico do par redox tiólico na superfície do eletrodo (≈ 100 ciclos).

3.4.5 Formação de nanopartículas de ouro à partir das moléculas de cisteína ancorada na superfície do eletrodo **Au/3-MPA/CSH**

Para construção do eletrodo modificado de **Au/3-MPA/CSH/AuNp**, aplicou-se 20 µL de solução aquosa 1 $mmolL^{-1}$ de $HAuCl_4$, preparada em solução tampão pH 4,7, na superfície do eletrodo de **Au/3-MPA/CSH**, a fim de avaliar se os grupos tiólicos (-SH) das moléculas de cisteína imobilizadas no eletrodo **Au/3-MPA** eram capazes de promover a redução de ouro em solução na forma de nanopartículas. O procedimento de construção do eletrodo modificado de **Au/3-MPA/CSH/AuNpT** foi distinto, no qual aplicou-se 20 µL de solução de nanopartículas de ouro preparadas utilizando o método de Turkevich (KIMLING et al., 2006), a fim de promover o ancoramento direto destas nos grupos tiólicos superficiais do eletrodo de **Au/3-MPA/CSH**.

3.4.5.1 Síntese de nanopartículas de ouro utilizando o método de Turkevich

Adicionou-se 2 mL de uma solução 0,1% de $C_6H_5Na_3O_7$ (citrato de sódio) à 1 mL de uma solução 3,4 $mmolL^{-1}$ de $HAuCl_4$ preparada em solução 0,1 $molL^{-}$

^{1} de HCl. O pH da solução foi ajustado para 6,0 com solução 0,1 $molL^{-1}$ de hidróxido de sódio, e seu volume foi completado até 20 mL. A solução foi aquecida até a ebulição, durante 15 minutos sob constante agitação. A coloração da solução, previamente transparente, adotou uma coloração vermelha (indicativo do tamanho das nanopartículas de ouro formadas).

3.4.6 Fluxograma do procedimento experimental

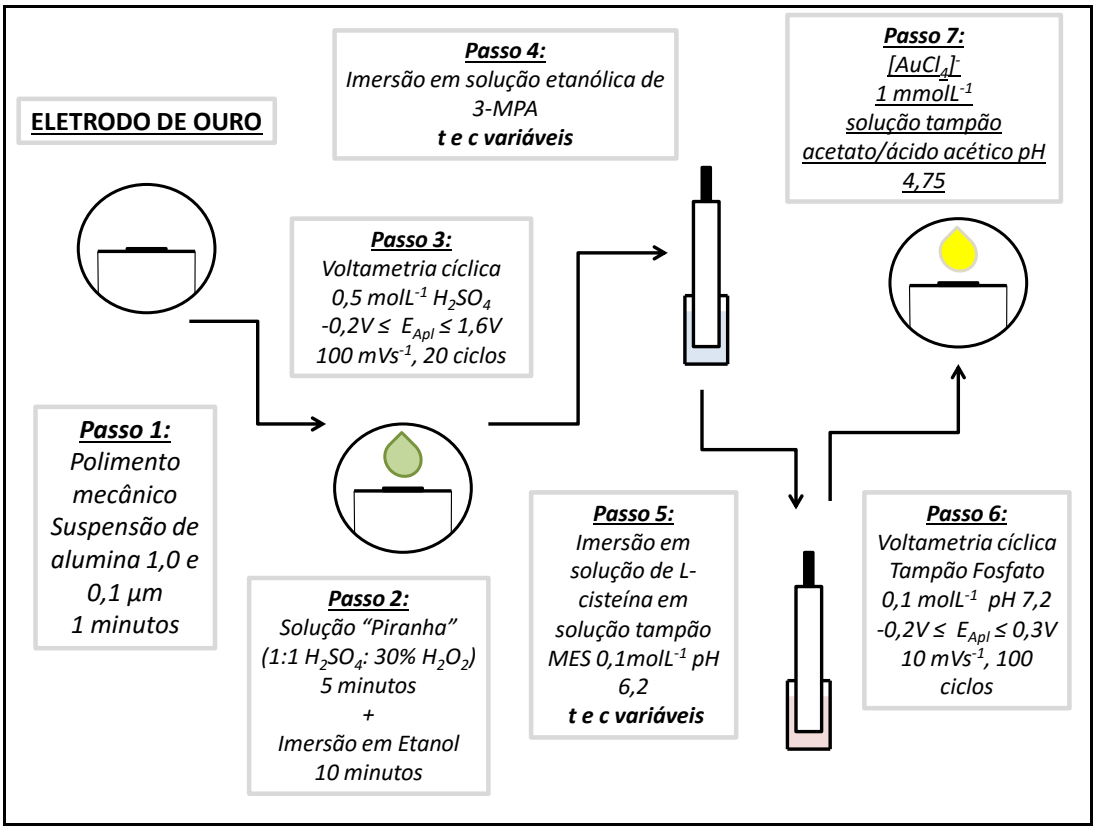


Figura 2 - Fluxograma do procedimento experimental adotado na construção do eletrodo de **Au/3-MPA/CSH/AuNp**. Entre cada uma das etapas citadas, o eletrodo foi lavado com água e etanol.

3.4.7 Redução de peróxido de hidrogênio

O eletrodo **Au/3-MPA/CSH/AuNp** e demais eletrodos foram transferidos para uma célula eletroquímica contendo solução tampão fosfato 0,1 molL^{-1} pH 7,2, como eletrólito suporte e, em seguida, procedeu-se a obtenção do voltamograma cíclico no intervalo de -0,2V a 0,3V com velocidade de varredura de 10 mVs^{-1}. Em seguida, obtiveram-se voltamogramas cíclicos nas mesmas condições, mas após adição de volumes adequados de solução 1 mmolL^{-1} de peróxido de hidrogênio de modo a obter concentrações de 100, 200, 300 e 400 µmolL^{-1} na célula eletroquímica.

3.5 Cálculo da área ativa do eletrodo de ouro

O cálculo da área ativa (A_r) foi feito usando-se a razão entre a carga referente ao processo de redução observado nos voltamogramas de pré-tratamento do eletrodo de ouro em solução 0,5 molL^{-1} de H_2SO_4, Q_m, (vide seção 3.4.1 - *Materiais e Métodos*) e um valor empírico referente à quantidade de carga, equivalente a 390 µCcm^{-1}, do mesmo processo em um eletrodo de ouro com 1 cm^2 de área real, **Figura 3**, conforme indicado na **Equação 1**.

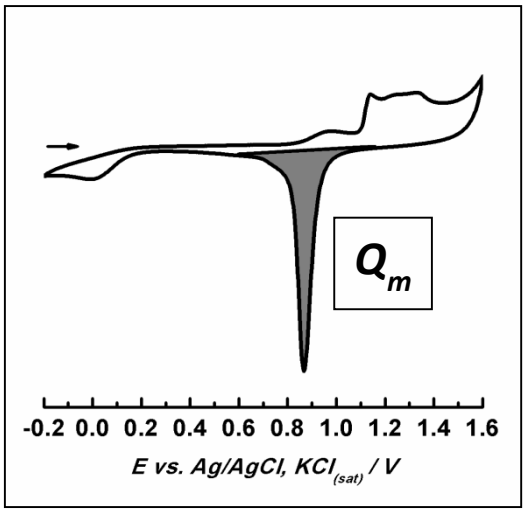


Figura 3 - Voltamograma cíclico de limpeza eletroquímica em H_2SO_4, no qual a área em destaque representa a dessorção de oxigênio presente na forma de óxido de ouro.

$$A_r = {}^{Q_m}/_{K_c}$$ **Equação 1**

em que:

A_r : área real ou área ativa (cm²);

Q_m : carga referente à integração do pico de redução (C);

K_c : carga referente à integração do pico de redução para eletrodo de ouro com 1 cm^2 de área ativa (390 μCcm^{-1}), (BENITES et al., 2014).

3.6 Cálculo do recobrimento superficial do eletrodo de ouro com 3-MPA

O recobrimento superficial ($\Gamma_{3-\mathrm{MPA}}$) foi calculado usando a carga referente ao pico voltamétrico referente à dessorção do 3-MPA (**Ep,c1**) em solução 0,5 molL^{-1} de KOH (vide seção 3.4.2 - *Materiais e Métodos*), usando a equação:

$$\Gamma_{3-\mathrm{MPA}} = {}^{\mathrm{Q}}/_{\mathrm{nFA}} \qquad \textbf{Equação 2}$$

em que:

Q: carga do pico (C);

n: número de elétrons (n = 1);

F: constante de Faraday (F = 96485 C);

A: área ativa do eletrodo (cm^2);

3.7 Eletrodo de diamante dopado com boro

3.7.1 Limpeza do eletrodo

Para o procedimento de limpeza, o eletrodo de diamante dopado com boro e demais eletrodos foram transferidos para uma célula eletroquímica contendo solução de ácido nítrico 1,0 molL^{-1}, e, em seguida, foram efetuados 20

voltamogramas cíclicos no intervalo de potencial de -2,5V a 3,0V com velocidade de varredura de 100 mVs^{-1} (BUORO et al., 2014).

3.7.2 Tratamentos de Superfície

3.7.2.1 Tratamento catódico (c-EDDB)

Após a limpeza do eletrodo, este e os demais eletrodos foram transferidos para uma célula eletroquímica contendo solução de ácido sulfúrico 1,0 $molL^{-1}$, como eletrólito suporte e, 10 voltamogramas cíclicos no intervalo de potencial de 0,0V a -2,5V com velocidade de varredura de 100 mVs^{-1} foram efetuados. Em seguida, o eletrodo de trabalho foi lavado com água e etanol (BUORO et al., 2014).

3.7.2.2 Tratamento anódico (a-EDDB)

Após a limpeza do eletrodo, este e os demais eletrodos foram transferidos para uma célula eletroquímica contendo solução de ácido sulfúrico 1,0 $molL^{-1}$, como eletrólito suporte e, 10 voltamogramas cíclicos no intervalo de potencial de 0,0V a 2,5V com velocidade de varredura de 100 mVs^{-1} foram efetuados. Em seguida, o eletrodo de trabalho foi lavado com água e etanol (BUORO et al., 2014).

3.7.2.3 Tratamento térmico (o-EDDB)

Após a limpeza do eletrodo, este foi submetido à 400°C em um forno por 4 horas sob vazão de ar constante de 5 $Lmin^{-1}$. Em seguida, o eletrodo de trabalho foi lavado com água e etanol (LOURENÇÃO et al., 2010).

3.7.3 Determinação dos compostos indólicos por técnicas voltamétricas

O eletrodo de diamante dopado com boro (**EDDB**), foi denominado **a-EDDB** (tratamento anódico), **c-EDDB** (tratamento catódico) e **o-EDDB** (tratamento térmico). Após cada tratamento de superfície, o **EDDB** foi transferido para uma célula eletroquímica contendo 100 $\mu molL^{-1}$ do analito (os analitos estudados foram o indol, a serotonina e o triptofano) em célula em solução tampão fosfato 0,1 $molL^{-1}$ pH 7,2, como eletrólito suporte.

Em seguida, procedeu-se a obtenção de voltamogramas cíclicos (3 ciclos) no intervalo de 0,0V a 1,2V para cada tratamento e para cada analito, com velocidade de varredura de 100 mVs^{-1}. As voltametrias de onda quadrada foram conduzidas em uma célula eletroquímica contendo 100 $\mu molL^{-1}$ do analito (os analitos estudados foram o indol, a serotonina e o triptofano) em célula em solução tampão fosfato 0,1 $molL^{-1}$ pH 7,2, como eletrólito suporte, a uma frequência de 25 Hz, e amplitude de pulso de 30 mV, em uma janela de potencial

de 0,6V a 1,2V, no caso do indol e triptofano, e em uma janela de potencial de 0,2V a 1,2V, no caso da serotonina.

4. Resultados e Discussão

4.1 Eletrodo modificado de Au/3-MPA/CSH/AuNp

4.1.1 Pré-tratamento eletroquímico do eletrodo de ouro em H_2SO_4

A **Figura 4** apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos com dois eletrodos de ouro, denominados aqui, **Eletrodo 1** e **Eletrodo 2**, em solução de H_2SO_4 0,5 molL^{-1}. Ambos os eletrodos são policristalinos, possuem mesma área geométrica e foram obtidos do mesmo fabricante (Metrohm).

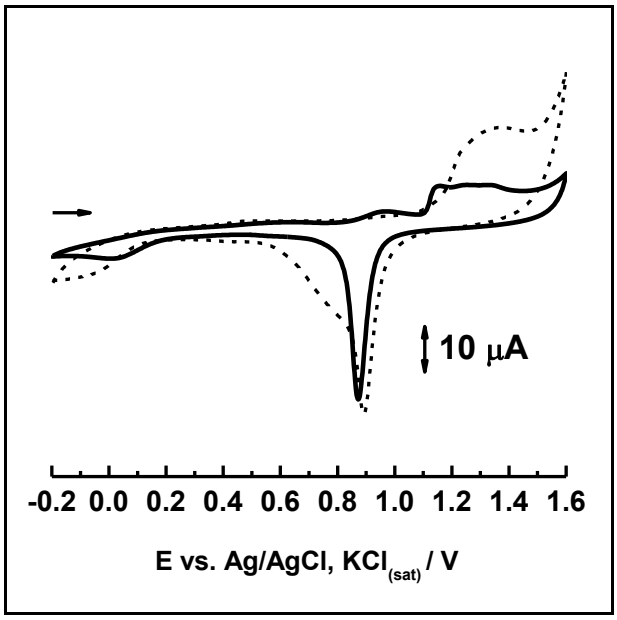


Figura 4 - Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodos de **Au** em solução 0,1molL^{-1} de H_2SO_4 para o Eletrodo 1 (▬▬) e o Eletrodo 2 (▬ ▬).

Parâmetros experimentais: ν = 0,100 mVs^{-1}; -0,2V ≤ E_{apl} ≤ 1,6V.

O **Eletrodo 1** apresentou um processo de redução em 0,9V, contrário ao **Eletrodo 2**, que apresentou processos de redução em dois potenciais distintos, 0,7V e 0,9V. Como ambos os eletrodos são comercialmente semelhantes, a diferença de comportamento pode ser resultante do plano cristalográfico superficial disponível neste eletrodo. Além disto, o posterior ancoramento superficial do 3-MPA no **Eletrodo 2** não foi possível (dados não apresentados). Em ambos eletrodos, o processo de oxidação ocorre em um amplo intervalo de potencial, indicativo da formação dos óxidos de ouro de diversas valências na superfície eletródica. Evidentemente, o processo de redução é altamente dependente da valência do ouro nos diferentes óxidos formados e pode ser indicativo da homogeneidade da estrutura superficial final do eletrodo pré-tratado. Neste caso em particular, observou-se que tanto o processo de oxidação, quanto o de redução no **Eletrodo 2**, ocorre em diversas etapas, dados

estes que indicaram que a superfície do **Eletrodo 2** é menos homogênea do que a superfície do **Eletrodo 1**.

Na construção de eletrodos modificados por camadas auto-arranjadas, o pré-tratamento do eletrodo de ouro tem a finalidade de promover uma homogeneização prévia da superfície eletródica para o posterior ancoramento de moléculas de interesse. O procedimento envolveu três etapas: polimento mecânico, tratamento químico e tratamento eletroquímico. O polimento mecânico de eletrodos metálicos foi realizado com suspensões de materiais relativamente duros a fim de promover um aumento uniforme da rugosidade superficial. Soluções de alumina em diferentes granulometrias foram utilizadas no polimento mecânico de eletrodos de ouro, enquanto suspensões de diamante, aparentemente, não promoveram um polimento significativo. No entanto, a utilização de alumina acaba por deixar a superfície do eletrodo contaminada com esta suspensão, prejudicando a reprodutibilidade dos resultados obtidos. O tratamento químico feito aqui foi a lavagem da superfície do eletrodo com uma solução altamente oxidante, no caso a solução "piranha" (1:1 de H_2SO_4 / H_2O_2 30%), a fim de eliminar moléculas orgânicas que pudessem estar adsorvidas na superfície metálica, porém como a utilização desta solução também promove a formação de óxidos superficiais, realizou-se posteriormente, o tratamento eletroquímico. Este último, que consistiu na ciclagem do eletrodo de trabalho em solução de H_2SO_4 0,5 $molL^{-1}$, teve como objetivo a eliminação dos óxidos superficiais formados durante o tratamento químico, por redução do metal.

Através dos voltamogramas cíclicos obtidos durante os pré-tratamentos efetuados, foi possível obter a carga do pico de redução do ouro, e calcular a

área ativa do eletrodo (vide seção 3.5 - *Materiais e Métodos*). Esta carga, corresponde à dessorção da monocamada de oxigênio presente na forma de óxidos superficiais. Este valor foi dividido pelo valor da carga, equivalente a 390 μCcm^{-2}, necessária para promover a dessorção de uma monocamada de oxigênio presente em um eletrodo de ouro com 1 cm^2 de área ativa (BENITES et al., 2014).

Este procedimento foi indispensável, já que a área ativa do eletrodo variava muito entre medidas consecutivas, apesar de se efetuar exatamente o mesmo tratamento superficial do eletrodo. Em última instância, a área ativa do eletrodo de ouro irá determinar a quantidade de 3-MPA superficialmente imobilizada e se a superfície do metal estará ou não totalmente recoberta pelo composto tiólico. Evidentemente, esta etapa afetará diretamente a próxima etapa de arquitetura molecular da superfície do ouro, ou seja, a etapa de imobilização da cisteína. Deste modo, ao dividir o valor experimental da carga superficial de redução do metal, Q_m, por 390 μCcm^{-1}, normalizaram-se os resultados obtidos.

4.1.2 Otimização das condições experimentais para o recobrimento do eletrodo Au/3-MPA – Avaliação da reprodutibilidade do processo de Adsorção/Dessorção de 3-MPA

O recobrimento superficial (Γ), ou grau de saturação, da superfície eletródica, é um parâmetro importante na construção de eletrodos modificados

por monocamadas auto-arranjadas. Através destes valores, pode-se verificar se a superfície está completamente recoberta, a fim de minimizar interações da cisteína com a superfície eletródica não modificada.

A adsorção de tióis na superfície de um eletrodo de ouro é pela formação de uma ligação covalente termodinamicamente favorável entre o enxofre presente no tiol e o ouro metálico. A **Reação 1** (vide seção 1.2.1 - *Introdução*) mostra este processo.

Uma das melhores abordagens a fim de obter informações acerca da quantidade de matéria do agente modificador sobre a superfície eletródica é através do processo de dessorção eletroquímica.

Na obtenção da arquitetura molecular que se deseja, (**EAu/3-MPA/CSH/AuNp)**, a dessorção redutiva do 3-MPA sobre a superfície de ouro teve a finalidade de avaliar qual deveria ser a concentração da solução de 3-MPA para obtenção de um recobrimento total da superfície do eletrodo de ouro. Ainda assim, deve-se atentar que um excesso de moléculas de 3-MPA, que não estejam ligadas ao ouro, pode ser tão prejudicial quanto a exposição da superfície eletródica à cisteína, que pode resultar na formação de múltiplas camadas e não de uma monocamada de cisteína sobre o 3-MPA.

As **Reações 4** e **5** descrevem o processo de dessorção do 3-MPA em meio ácido e alcalino. Do ponto de vista experimental, os dados de dessorção são obtidos por voltametria cíclica do eletrodo de ouro recoberto com 3-MPA, **EAu/3-MPA**, em solução de KOH 0,5 $molL^{-1}$.

$R\text{-}S\text{-}M + 1e^- \rightleftharpoons R\text{-}S^- + M$ (meio alcalino) **Reação 4**

$R\text{-}S\text{-}M + H^+ + 1e^- \rightleftharpoons R\text{-}SH + M$ (meio ácido) **Reação 5**

A dessorção redutiva em meio alcalino origina uma superfície carregada negativamente ($R\text{-}S^-$), que devido ao alto grau de solvatação, não é reoxidada e reincorporado na superfície eletródica.

Antes de cada recobrimento do eletrodo com 3-MPA, o eletrodo foi tratado como descrito na parte experimental e foram obtidos os voltamogramas cíclicos em H_2SO_4 0,5 $molL^{-1}$ para redução da camada de óxido do metal. A **Figura 5** mostra os voltamogramas cíclicos obtidos durante os pré-tratamentos do eletrodo de ouro em H_2SO_4, para 3 conjuntos diferentes de dados. Após o **Tratamento 1**, o eletrodo foi imerso em uma solução 5 $mmolL^{-1}$ de 3-MPA; após o **Tratamento 2**, em solução 10 $mmolL^{-1}$ de 3-MPA e após o **Tratamento 3**, em solução 25 $mmolL^{-1}$ de 3-MPA, após os quais, os voltamogramas de dessorção do 3-MPA em solução 0,5 $molL^{-1}$ KOH foram obtidos, **Figura 6**.

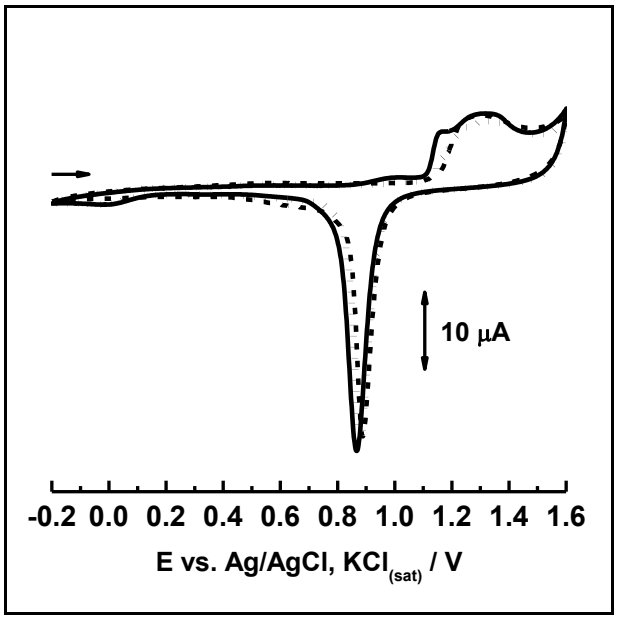


Figura 5 - Voltamogramas cíclicos (10° ciclo) obtidos com o eletrodo de **Au** em solução 0,5 $molL^{-1}$ de H_2SO_4 usando o eletrodo de ouro após tratamento com solução "piranha", previamente polido em suspensão de alumina (0,1µm e 1 µm).

Parâmetros experimentais: ν = 100 mVs^{-1}; -0,2V ≤ E_{Apl} ≤ 1,6V.

(▬ ▬) Tratamento 1, (●●●) Tratamento 2 e (▬▬) Tratamento 3.

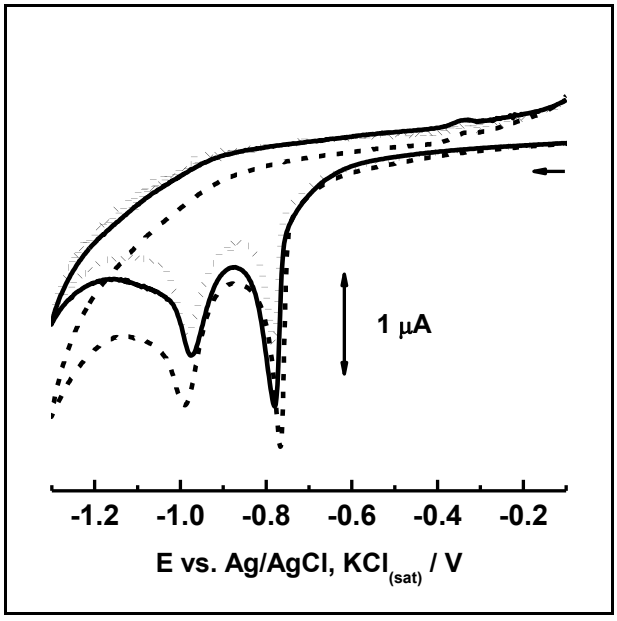


Figura 6 - Voltamogramas cíclicos (1° ciclo) obtidos em solução 0,5 $molL^{-1}$ de KOH após a imersão do eletrodo de **Au** em soluções etanólicas com concentrações distintas.

Parâmetros experimentais: ν = 50 mVs^{-1}; -0.1V ≤ E_{Apl} ≤ -1,3V.

(▬ ▬) 5 $mmolL^{-1}$, (●●●) 10 $mmolL^{-1}$ e (▬▬) 25 $mmolL^{-1}$.

O recobrimento superficial para cada concentração de 3-MPA utilizada foi calculado de acordo com a **Equação 2** (vide seção 3.6 - *Materiais e Métodos*), levando em consideração a área ativa normalizada, obtida a partir dos dados apresentados na **Figura 6**.

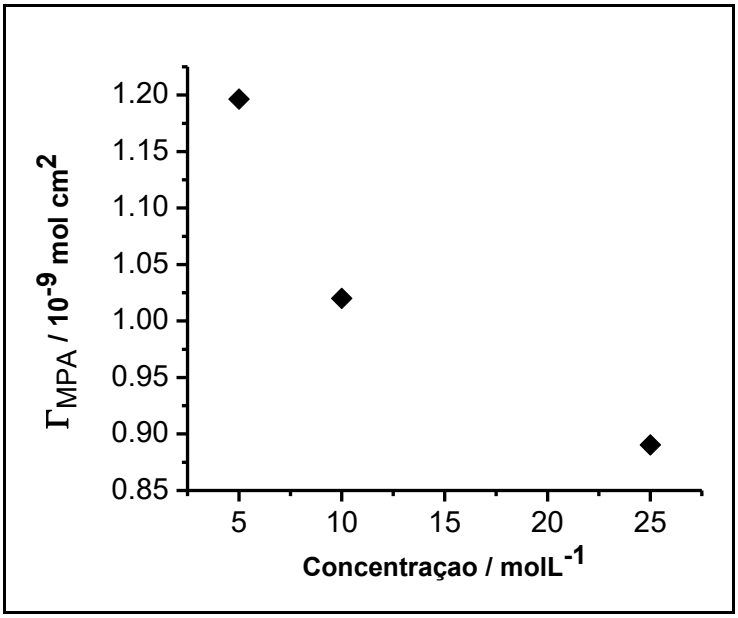


Figura 7 - Curva de recobrimento superficial (Γ_{3-MPA})) para o eletrodo de **EAu/3-MPA** ao variar as concentrações da solução de imersão de 3-MPA.

Como pode ser observado pelos dados apresentados na **Figura 7**, não há correlação entre a carga de dessorção obtida para o pico **Ep,c$_2$**. Estes resultados estão associados à existência de dois processos de redução, que ocorrem em diferentes potenciais, -0,78V (**Ep,c$_1$**) e -0,98V (**Ep,c$_2$**), provavelmente devido a diferentes energias de dessorção, que refletem formas diferentes de organização

das moléculas de 3-MPA sobre a superfície do eletrodo de ouro. É de se esperar que o processo detectado em **Ep,c_1** esteja associado à dessorção das moléculas que estão desorganizadas na superfície do eletrodo, ocorrendo portanto a potenciais menos negativos. Ao contrário, o processo detectado em **Ep,c_2**, reflete a dessorção das moléculas que se encontram de forma organizada, cujas cadeias laterais propiciam uma maior interação entre si e, justamente por este motivo, o processo foi observado a potenciais mais negativos.

De acordo com os valores obtidos, não foi possível escolher uma concentração ideal a ser utilizada, pois os resultados para experimentos em triplicatas (dados não mostrados), não foram reprodutíveis. Por outro lado, de acordo com os voltamogramas obtidos, é possível notar que a quantidade de moléculas referentes aos defeitos na monocamada (**Ep,c_1**) é alta, e este é um fator que pode atrapalhar a continuidade da construção do eletrodo proposto. Sendo assim, foram realizadas medidas a fim de investigar como minimizar a produção de defeitos durante a etapa de adsorção do 3-MPA.

A formação de monocamadas auto-organizadas é altamente dependente do tempo de imersão do eletrodo na solução do agente modificador. Sendo assim, usando ainda as curvas de dessorção, avaliou-se o efeito do tempo de imersão do eletrodo de ouro em solução em uma solução com concentração fixa de 3-MPA. A **Figura 8** mostra os voltamogramas cíclicos obtidos após três pré-tratamentos consecutivos do eletrodo de ouro em solução de H_2SO_4 0,5 $molL^{-1}$, os quais foram, então, imersos em soluções de 3-MPA de concentração 25 $mmolL^{-1}$ por tempos distintos: **Tratamento 1**: 1 hora, **Tratamento 2**: 2 horas e **Tratamento 3**: 4 horas. Em seguida, a curva de dessorção foi obtida, **Figura 9**.

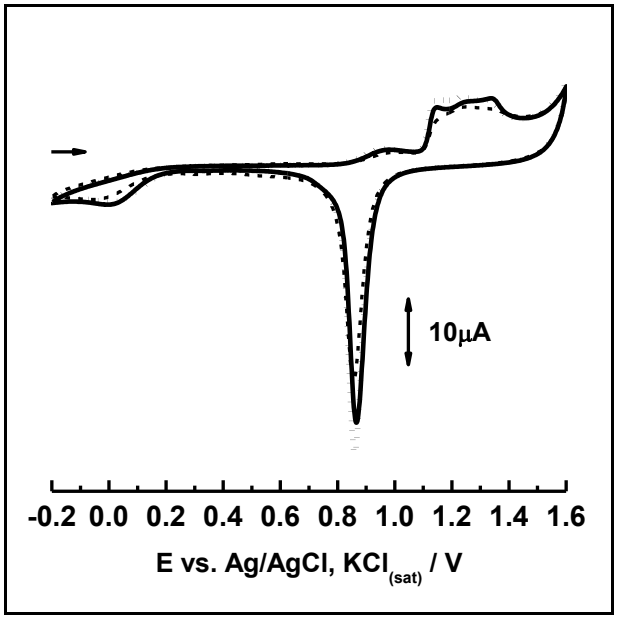


Figura 8 - Voltamogramas cíclicos (10° ciclo) obtidos com o eletrodo de **Au** em solução 0,5 $molL^{-1}$ de H_2SO_4 usando o eletrodo de ouro após tratamento com solução "piranha", previamente polido em suspensão de alumina (0,1µm e 1 µm).

Parâmetros experimentais: ν = 100 mVs^{-1}, -0,2V ≤ E_{Apl} ≤ 1,6V.

(▬ ▬) Tratamento 1, (●●●) Tratamento 2 e (▬▬) Tratamento 3.

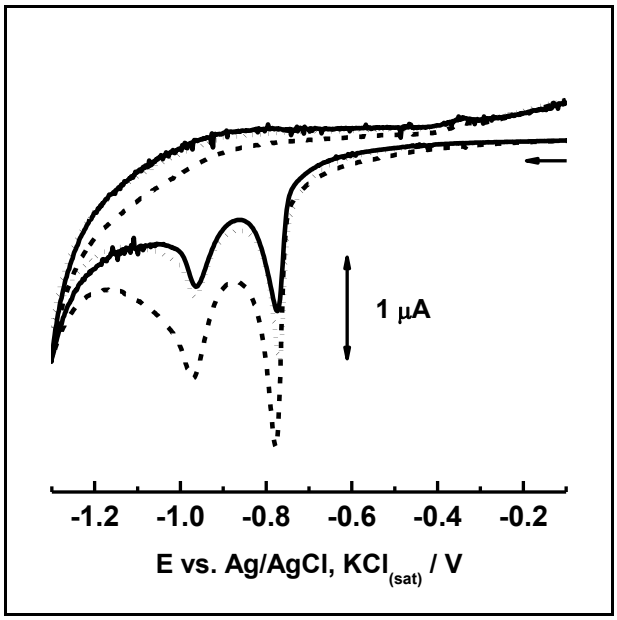


Figura 9 - Voltamogramas cíclicos (1° ciclo) obtidos com o eletrodo de **Au/3-MPA** em solução 0,5 $molL^{-1}$ de KOH após a imersão do eletrodo de ouro em solução etanólica 25 $mmolL^{-1}$ de 3-MPA por tempos distintos.

Parâmetros experimentais: ν = 50 mVs^{-1}, -0,1V ≤ E_{Apl} ≤ -1,3V.

(▬ ▬) 1 hora, (●●●) 2 horas e (▬▬) 4 horas.

Os dados apresentados na **Figura 9** permitem concluir que, quanto maior o tempo de imersão do eletrodo de ouro em uma solução de 3-MPA, menor é a quantidade superficial de moléculas desorganizadas, já que a corrente em **Ep,c$_1$**, diminuiu drasticamente. Este resultado está em concordância com dados observados na literatura (FISICA; MILANO, 1991).

A **Figura 10** apresenta o recobrimento superficial ($\Gamma_{3-\mathrm{MPA}}$) referente ao processo **Ep,c$_1$** de dessorção das moléculas desorganizadas na superfície do eletrodo de ouro. Apesar da menor quantidade superficial deste material ter sido observada para tempos de imersão 4 horas, optou-se por utilizar o tempo de 2 horas para esta etapa, já que, tempos superiores não são compatíveis com a intenção de utilizar um tempo mínimo para a construção do eletrodo modificado proposto.

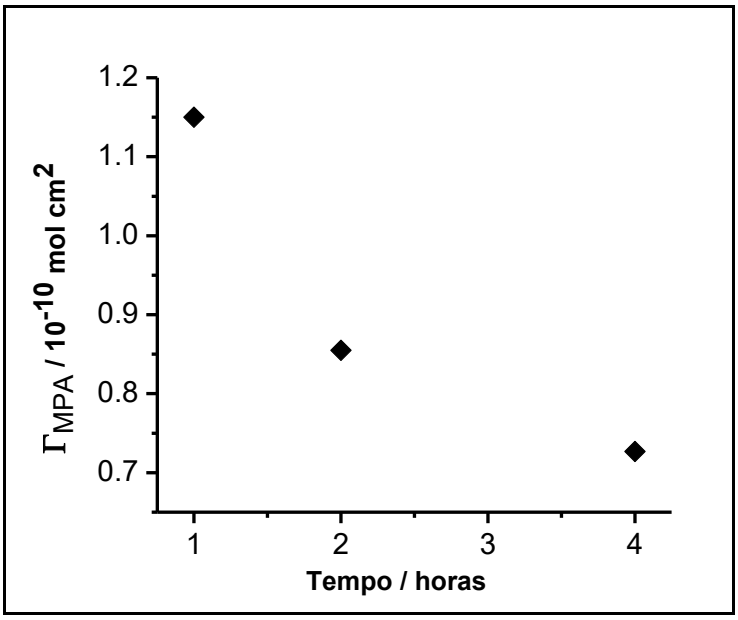


Figura 10 - Curva de recobrimento superficial (Γ_{3-MPA}) para o eletrodo **EAu/3-MPA** como função do tempo de imersão em solução 25 mmolL^{-1} de 3-MPA.

Como não foi possível obter um valor de concentração de 3-MPA ideal na construção do eletrodo modificado, a concentração de 25 mmolL^{-1} foi adotada para continuidade do trabalho.

4.1.3 Ancoramento da cisteína e ativação eletroquímica

O processo de ancoramento de cisteína é altamente dependente do pH, já que se baseia na interação eletrostática originada entre a forma desprotonada do grupo carboxílico superficial presente no 3-MPA e a forma protonada do grupo amina presente na cisteína. Sendo assim, o ancoramento deve ser realizado em um valor de pH intermediário entre os valores de pKa do grupo carboxílico (pKa = 5,49) e do grupo amina (pKa = 10,78). O tampão MES 0,2 molL^{-1} foi utilizado por possuir um valor de pKa = 6,15, proporcionando, então, um meio ideal para

o ancoramento da cisteína, uma vez que o mesmo, diferentemente dos tampões fosfato e acetato/ácido acético, não tem propriedades de complexação de metais em geral.

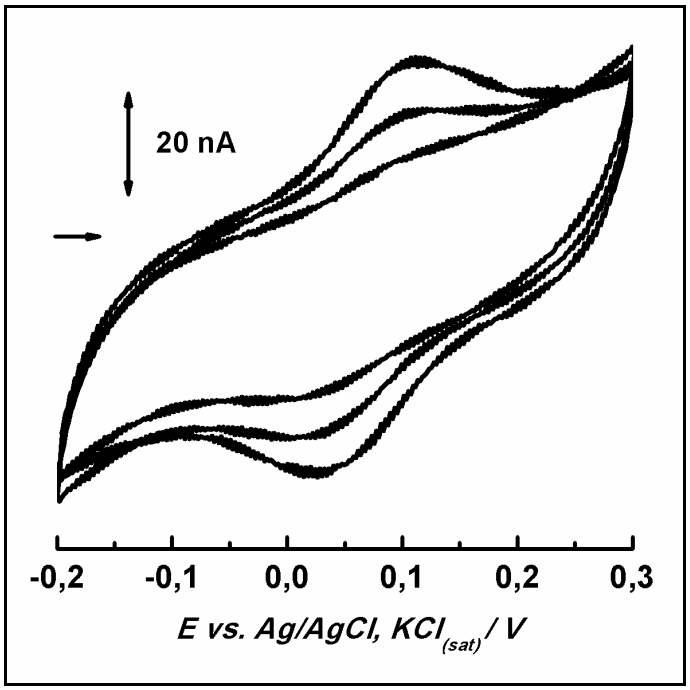


Figura 11 - Voltamogramas cíclicos (1°, 50° e 100° ciclo) da ativação eletroquímica do eletrodo **Au/3-MPA/CSH** obtido em solução tampão fosfato 0,1molL^{-1} pH 7,2.

Parâmetros experimentais: ν = 20 mVs^{-1}, -0,2V ≤ E_{Apl} ≤ 0,3V.

Os dados apresentados na **Figura 11** mostram que somente após vários ciclos, respostas significativas de corrente para o par redox RSSR/RSH foram observadas. A ausência de sinal nos primeiros ciclos, pode ser atribuída à dificuldade no transporte de carga na superfície do eletrodo, ocasionada pela distância entre as moléculas de 3-MPA e cisteína eletrostaticamente ligadas. Sendo assim, adotou-se a ciclagem em tampão fosfato, a baixas velocidades de varredura, como um procedimento de ativação eletroquímica, a fim de diminuir a

distância entre as moléculas e promover um aumento no transporte de carga na camada modificadora (OLIVEIRA; SERRANO, 2014). Não se sabe se, após o procedimento de ativação, a interação entre ambas as moléculas continua sendo de caráter eletrostático ou se há a formação de uma ligação amídica com a eliminação de uma molécula de água.

A **Figura 11** ilustra o 1° e o 100° ciclo do processo de ativação eletroquímica, sendo, então, visível, que com o aumento do número de ciclos, o par redox presente fica mais evidente.

A fim de otimizar o processo de ancoramento da cisteína na superfície do 3-MPA, parâmetros como tempo de imersão e concentração da solução de cisteína são cruciais. No entanto, avaliou-se previamente, se a concentração de 3-MPA, usada na primeira etapa de preparação do eletrodo, teria influência na resposta eletroquímica do par redox RSSR/RSH. Fixou-se em 1 hora, o tempo de imersão do eletrodo de ouro em soluções de concentrações variáveis (10 e 25 $mmolL^{-1}$) de 3-MPA, mantendo o tempo de imersão em solução 25$mmolL^{-1}$ de cisteína fixo em 1 hora.

As **Figuras 12, 13** mostram os voltamogramas cíclicos obtidos em tampão fosfato, pH 7,2, durante os processos de ativação eletroquímica para as duas modificações usando as concentrações 10 e 25 $mmolL^{-1}$ de 3-MPA, enquanto a **Figura 14** mostra o 100° ciclo de cada procedimento.

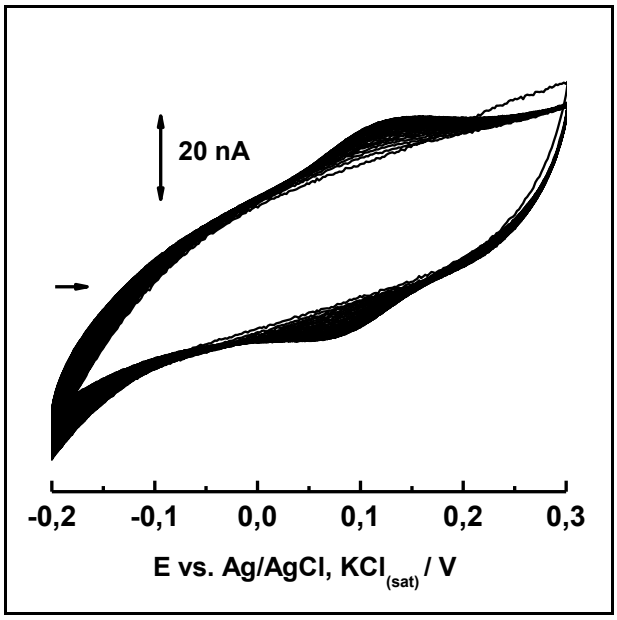


Figura 12 - Voltamogramas cíclicos (100 ciclos) da ativação eletroquímica do eletrodo **Au/3-MPA/CSH** em solução tampão fosfato 0,1molL^{-1} pH 7,2.

Parâmetros experimentais: ν = 20 mVs^{-1}, -0,2V ≤ E_{Apl} ≤ 0,3V.

Preparo do eletrodo **Au/3-MPA/CSH**: [3-MPA]: 10 mmolL^{-1}.

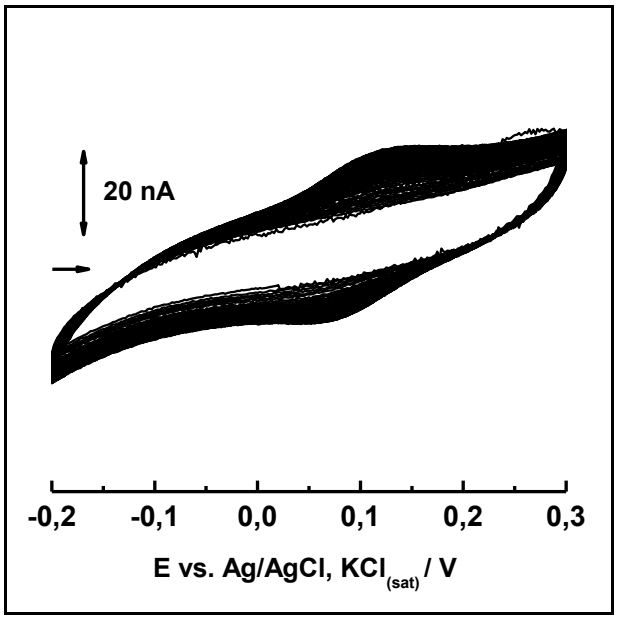


Figura 13 - Voltamogramas cíclicos (100 ciclos) da ativação eletroquímica do eletrodo **Au/3-MPA/CSH** em solução tampão fosfato 0,1molL^{-1} pH 7,2.

Parâmetros experimentais: ν = 20 mVs^{-1}, -0,2V ≤ E_{Apl} ≤ 0,3V.

Preparo do eletrodo **Au/3-MPA/CSH**: [3-MPA]: 25 mmolL^{-1}.

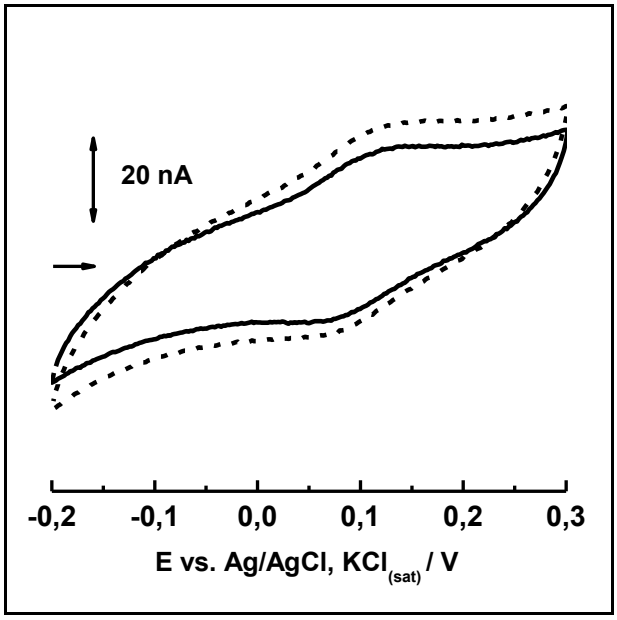


Figura 14 - Voltamogramas cíclicos (100° ciclo) da ativação eletroquímica do eletrodo **Au/3-MPA/CSH** em solução tampão fosfato 0,1molL^{-1} pH 7,2.

Parâmetros experimentais: ν = 20 mVs^{-1}, -0,2V ≤ E_{Apl} ≤ 0,3V.

Preparo do eletrodo de **Au/3-MPA/AuNp**: [3-MPA]: (▬ ▬) 10 mmolL^{-1} e (▬▬) 25 mmolL^{-1}.

Como decorre dos resultados apresentados, mudanças significativas não foram observadas para o par redox tiólico, seja em termos de potencial de pico ou de corrente de pico, o que indica que a concentração de 3-MPA que serve como plataforma para o ancoramento da cisteína não é um parâmetro limitante, desde que se utilize uma concentração mínima de 3-MPA para garantir o recobrimento completo da superfície eletródica.

O segundo parâmetro estudado na construção do eletrodo de **Au/3-MPA/CSH** foi o tempo de imersão da solução de cisteína. As **Figuras 15** e **16** mostram os voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de **Au/3-MPA/CSH** durante o procedimento de ativação eletroquímica de dois eletrodos modificados construídos com tempos de imersão de 1 hora e 24 horas em

solução 25 $mmoL^{-1}$ de cisteína. Os voltamogramas obtidos para a 100° varredura, em ambas as condições são apresentados na **Figura 17**.

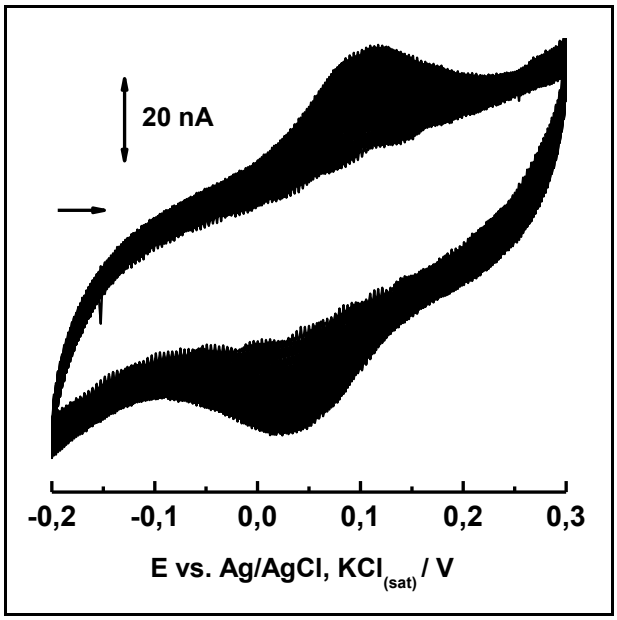


Figura 15 - Voltamogramas cíclicos (100 ciclos) da ativação eletroquímica do eletrodo **Au/3-MPA/CSH** em solução tampão fosfato 0,1$molL^{-1}$ pH 7,2.

Parâmetros experimentais: ν = 20 mVs^{-1}, -0,2V ≤ E_{Apl} ≤ 0,3V.

Preparo do eletrodo de **Au/3-MPA/AuNp**: [t(h)]: 1 hora.

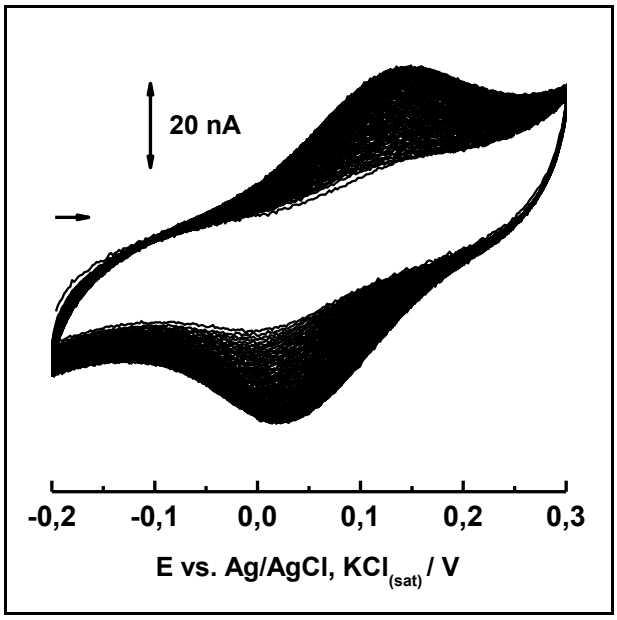


Figura 16 - Voltamogramas cíclicos (100 ciclos) da ativação eletroquímica do eletrodo **Au/3-MPA/CSH** em solução tampão fosfato 0,1molL^{-1} pH 7,2.

Parâmetros experimentais: ν = 20 mVs^{-1}, -0,2V ≤ E_{Apl} ≤ 0,3V.

Preparo do eletrodo de **Au/3-MPA/AuNp**: [t(h)]: 24 horas.

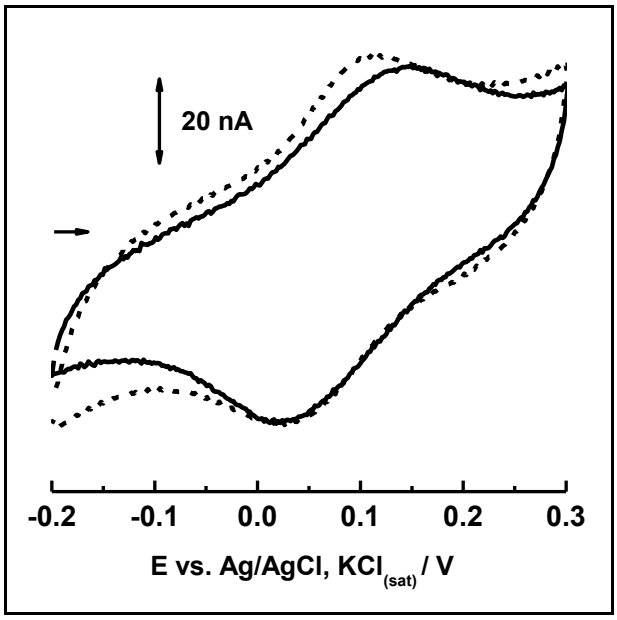


Figura 17 - Voltamogramas cíclicos (100° ciclo) da ativação eletroquímica do eletrodo **Au/3-MPA/CSH** em solução tampão fosfato 0,1molL^{-1} pH 7,2.

Parâmetros experimentais: ν = 20 mVs^{-1}, -0,2V ≤ E_{Apl} ≤ 0,3V.

Preparo do eletrodo de **Au/3-MPA/AuNp**: [t(h)]: (▬ ▬) 1 hora, (▬▬) 24 horas.

Os resultados obtidos com tempo de imersão de 24 horas foram similares àqueles em que o tempo de imersão foi de 1 hora, um indicativo de que o processo de ativação eletroquímica pode proporcionar, não só uma melhora na velocidade da reação de transferência de carga no eletrodo, como também auxiliar na aceleração do procedimento de montagem do eletrodo. Além disto, deve-se atentar que o valor de ΔE_p é menor para menores tempos de imersão em relação ao observado para o tempo de 24 horas.

O terceiro parâmetro avaliado foi a concentração da solução de cisteína para imersão do **EAu/MPA**; foram utilizadas soluções com concentrações de 25 $mmolL^{-1}$ e 0,1 $molL^{-1}$, fixando-se o tempo de imersão em 1 hora. A **Figura 18** mostra os voltamogramas cíclicos (100° ciclo) para ambas as ativações eletroquímicas do **EAu/MPA/CSH** em tampão fosfato, 0,1 $molL^{-1}$. Observou-se maiores valores de corrente de pico do par redox tiólico superficial quando a concentração da solução de cisteína foi 0,1 $molL^{-1}$.

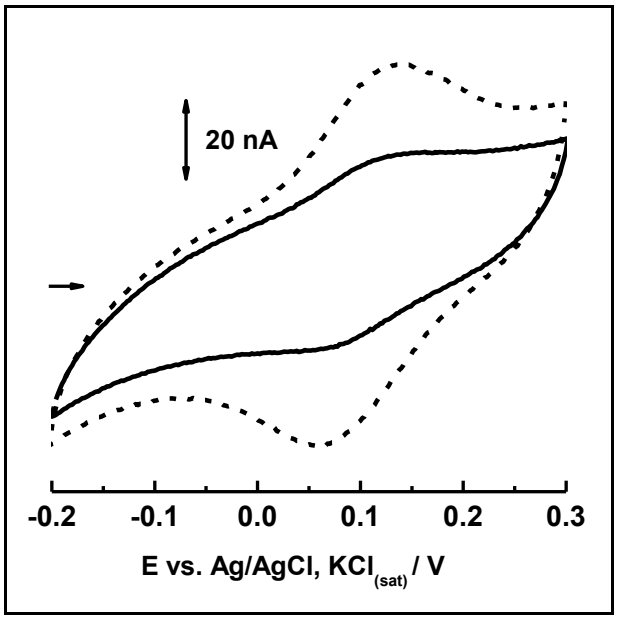


Figura 18 - Voltamogramas cíclicos (100° ciclo) da ativação eletroquímica do eletrodo **Au/3-MPA/CSH** em solução tampão fosfato 0,1molL^{-1} pH 7,2.

Parâmetros experimentais: ν = 20 mVs^{-1}, -0,2V ≤ E_{Apl} ≤ 0,3V.

Preparo do eletrodo **Au/3-MPA/CSH**: [CSH]: (——) 25 mmolL^{-1} e (— —) 0,1 molL^{-1}.

Embora os estudos de dessorção de MPA tenham mostrado que é muito difícil se obter resultados reprodutíveis no que tange ao valor do recobrimento superficial com 3-MPA, o contrário foi observado para os resultados obtidos no ancoramento da cisteína e portanto, esta última etapa foi usada como controle. Com base nestes resultados, adotou-se a solução de concentração 0,1 molL^{-1} de cisteína para a obtenção do eletrodo de **Au/3-MPA/CSH.**

4.1.4 Efeito da lavagem superficial do eletrodo Au/3-MPA/CSH

Após o processo de ativação eletroquímica dos eletrodos de **Au/3-MPA/CSH**, avaliou-se o efeito da lavagem superficial do mesmo a fim de verificar

a estabilidade das camadas de cisteína ancoradas sobre as moléculas de 3-MPA. Como este ancoramento foi realizado em solução tampão MES 0,2 molL^{-1} pH 6,2, a fim de promover a interação eletrostática entre o grupo carboxilato superficial presente no eletrodo **Au/3-MPA** e o grupamento amino presente nas moléculas de cisteína, escolheu-se para a lavagem, o tampão acetato/ácido acético com pH 4,75, valor de pH menor do que o valor de pK_a dos grupos carboxilato no MPA (pK_a = 5,49). Verificou-se, com este procedimento, que a acidez do meio não foi suficiente para deslocar as moléculas de cisteína da superfície do eletrodo, **Figura 19**. Como as soluções de tetracloroaurato (III) foram preparadas em tampão acetato, pH 4,75, era de fato necessário saber se a modificação **3-MPA/CSH** se mantinha inalterada durante o procedimento de lavagem e incorporação das nanopartículas de ouro.

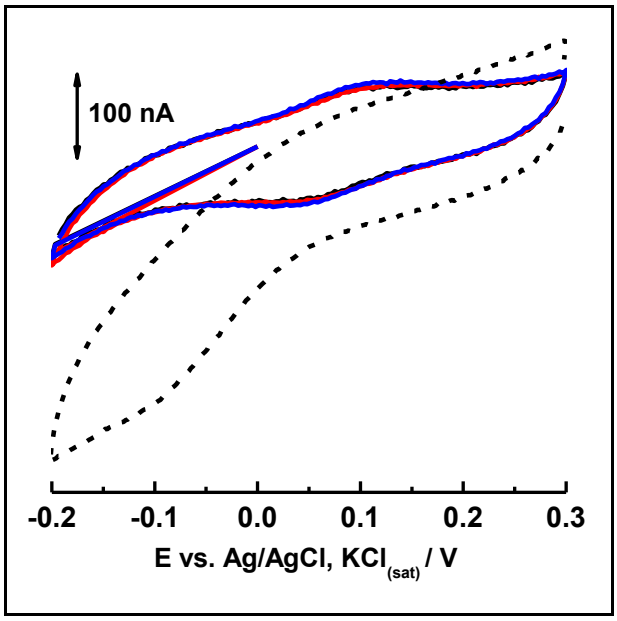


Figura 19 - Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo modificado **Au/3-MPA/CSH** em solução tampão fosfato 0,1molL-1 pH 7,2, após lavagem com (——) água e (——) tampão acetato/ácido acético 0,1molL^{-1} pH 4,7.

Parâmetros experimentais: ν = 20 mVs^{-1}, -0,2V ≤ E_{Apl} ≤ 0,3V.

4.1.5 Utilização da superfície do eletrodo de Au/3-MPA/CSH para redução, "in situ", de ouro com formação de nanopartículas

Foram adotados dois métodos na construção dos eletrodos modificados com nanopartículas de ouro: i) através do recobrimento da superfície do eletrodo de **Au/MPA/CSH** com 20 μL de solução de nanopartículas de ouro, recém preparadas, pelo método de Turkevich (vide seção 3.4.5.1 - *Materiais e Métodos*), (eletrodo denominado de **Au/3-MPA/CSH/AuNpT**) e, ii) através do recobrimento do eletrodo de **Au/MPA/CSH** com 20 μL de uma solução 1 $mmolL^{-1}$ de tetracloroaurato preparada em tampão acetato/ácido acético 0,1 $molL^{-1}$ pH 4,75 (eletrodo denominado de **Au/3-MPA/CSH/AuNp).** O monitoramento da redução do ouro sobre a superfície dos eletrodos foi acompanhada pelo desaparecimento do par redox tiólico superficial. Os resultados obtidos para ambos os métodos de modificação do eletrodo de **Au/MPA/CSH** são mostrados na **Figura 20 e 21.**

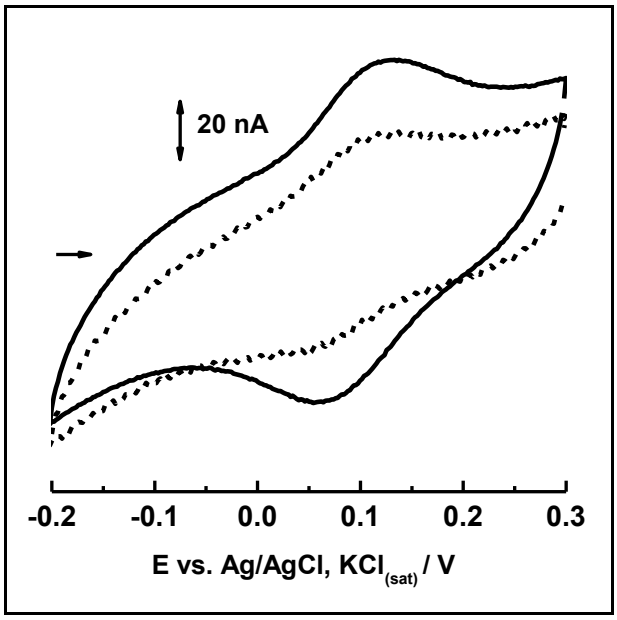


Figura 20 - Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de (——) **Au/3-MPA/CSH** e o eletrodo de (— —) **Au/3-MPA/CSH/AuNpT** em solução tampão fosfato 0,1molL^{-1} pH 7,2.

Parâmetros experimentais: ν = 20 mVs^{-1}, -0,2V ≤ E_{Apl} ≤ 0,3V.

Os voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de **Au/3-MPA/CSH/** após a modificação com a solução de nanopartículas de ouro continuaram apresentando o par redox tiólico superficial, **Figura 20**, indicando que as nanopartículas de ouro não foram incorporadas na superfície do eletrodo, provavelmente devido à alta estabilização proporcionada pelos íons citrato.

No caso em que adicionou-se solução de tetracloroaurato na superfície do eletrodo de **Au/3-MPA/CSH**, houve desaparecimento do par redox tiólico superficial, indicando alteração da superfície do eletrodo provavelmente devido à incorporação do ouro na forma de nanopartículas, **Figura 21**.

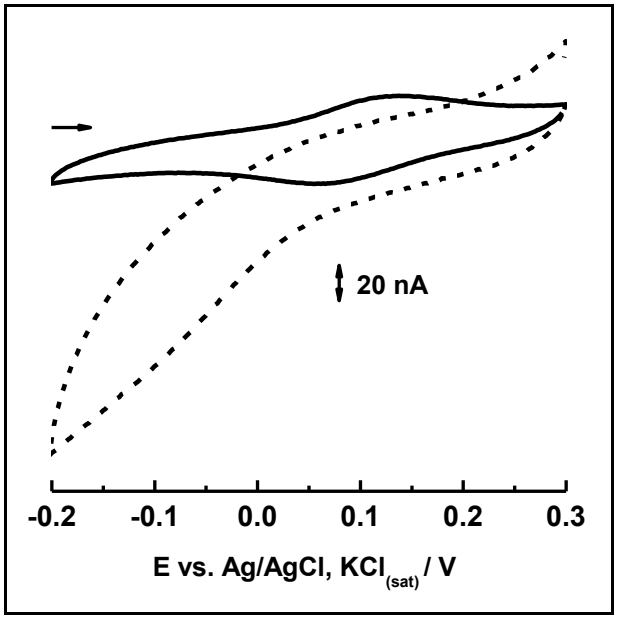
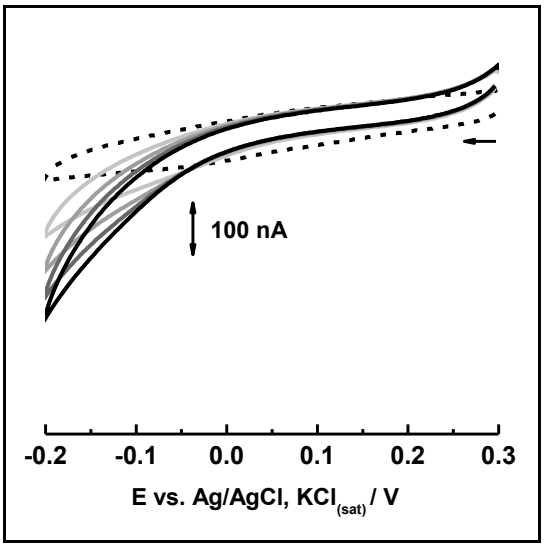


Figura 21 - Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de (——) **Au/3-MPA/CSH** e o eletrodo de (— —) **Au/3-MPA/CSH/AuNp** em solução tampão fosfato 0,1molL^{-1} pH 7,2.

Parâmetros experimentais: ν = 20 mVs^{-1}, -0,2V ≤ E_{Apl} ≤ 0,3V.

4.1.6 Redução de peróxido de hidrogênio

A fim de avaliar se o eletrodo de **Au/3-MPA/CSH/AuNp** apresenta resposta para a redução catalítica de H_2O_2, obtiveram-se voltamogramas cíclicos, na ausência de oxigênio, após adição de concentrações crescentes do analito na célula eletroquímica. Os dados foram comparados aos resultados obtidos com o eletrodo de **Au** previamente submetido ao mesmo pré - tratamento adotado para superfícies que foram modificadas (vide seção 3.4.1. - *Materiais e Métodos*)**, Figuras 22 e 23.**



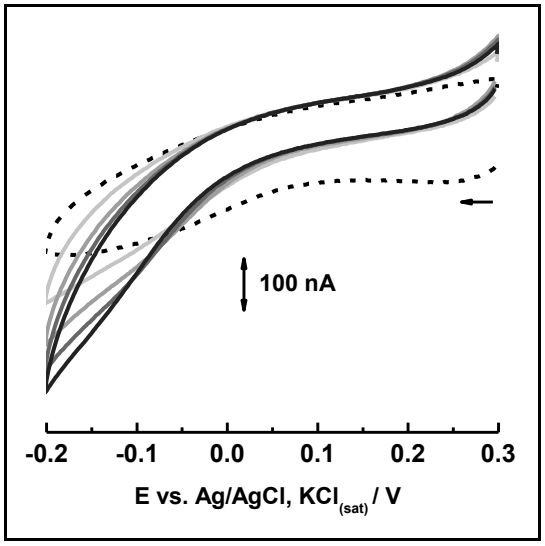


Figura 22 - Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de **Au** limpo e pré-tratado em solução tampão fosfato 0,1 $molL^{-1}$, pH 7,2, contendo concentrações crescentes de peróxido de hidrogênio (100, 200, 300 e 400 $\mu molL^{-1}$).

Figura 23 - Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de **Au/3-MPA/CSH/AuNp**, em solução tampão fosfato 0,1 $molL^{-1}$, pH 7,2, contendo concentrações crescentes de peróxido de hidrogênio (100, 200, 300 e 400 $\mu molL^{-1}$).

Parâmetros experimentais: ν = 10 mVs^{-1}, -0,2V ≤ E_{Apl} ≤ 0,3V.

Como pode ser visto pelos dados apresentados nas **Figuras 22** e **23**, as correntes de redução do analito não diferem, significativamente daquelas observadas com o eletrodo limpo.

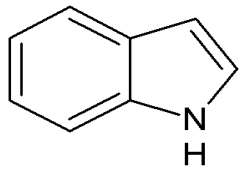
Estes resultados podem ser explicados pelo fato das medições terem sido realizadas em pH 7,2. Nesta condição experimental, o peróxido de hidrogênio se encontra em uma região intermediária, já que em meio ácido este poderia atuar como agente redutor e, em meio alcalino, como agente oxidante, de acordo com as **Reações 2** e **3** (vide seção 1.5 - *Introdução*). Deste modo, é provável que o próprio analito possa estar, via reação química, promovendo a oxidação das nanopartículas superficiais de ouro.

Este fato pode ser corroborado pelos voltamogramas cíclicos de reutilização do eletrodo, após a obtenção dos dados apresentados na **Figura 23**, mostraram a perda da pequena atividade catalítica para a redução do peróxido de hidrogênio. É possível, diminuindo-se o pH da solução do eletrólito suporte para 4,75, a superfície modificada seja mais estável e apresente maior atividade catalítica para redução deste analito.

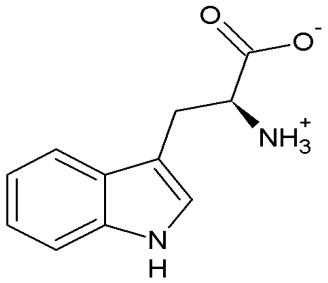
4.2 Eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB)

4.2.1 Determinação de compostos indólicos

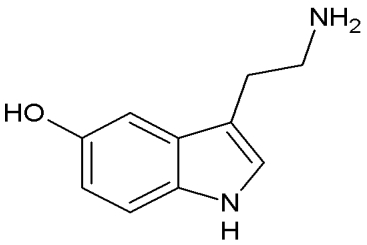
A serotonina sofre oxidação no grupo hidroxila presente no anel benzênico, enquanto os demais derivados indólicos, sofrem oxidação no heteroátomo de nitrogênio presente no anel pirrólico, em um processo envolvendo um elétron e um próton (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011).



Indol



Triptofano



Serotonina

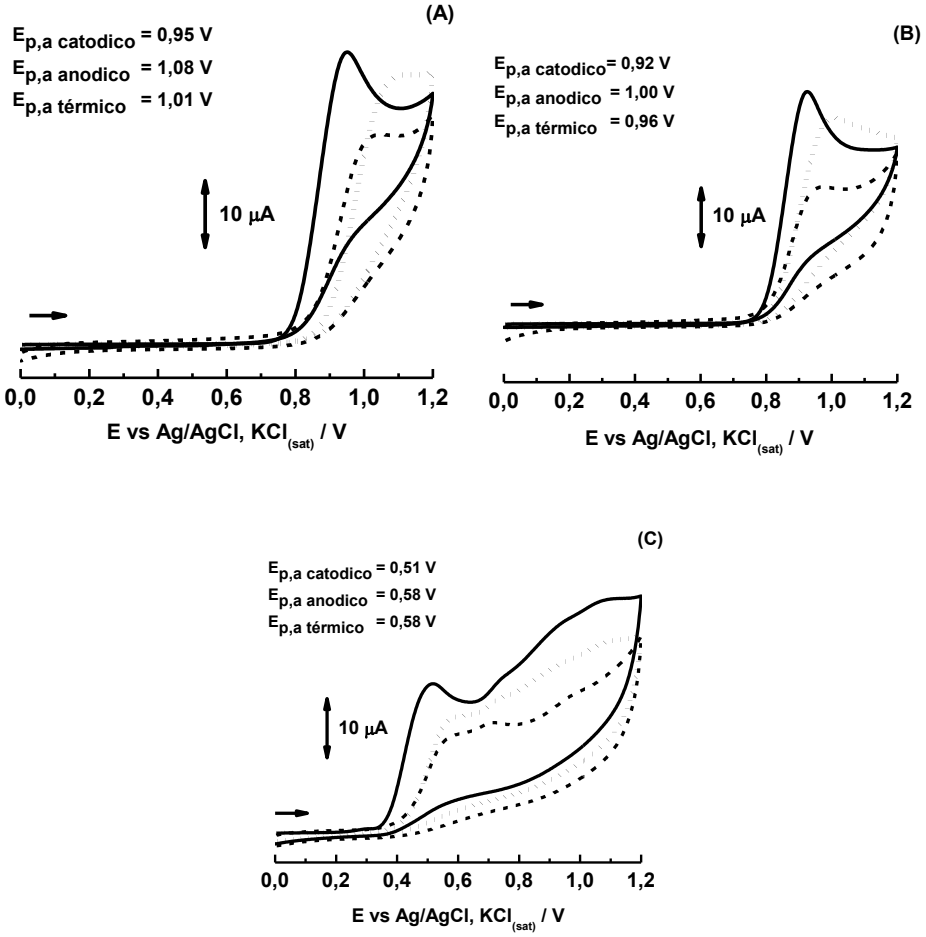


Figura 24 - Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de **DDB** após diferentes tratamentos de superfície, obtidos em solução tampão fosfato 0,1molL^{-1} pH 7,2 contendo (A) indol, (B) L-triptofano e (C) serotonina.

Parâmetros experimentais: 0,2V ≤ E_{Apl} ≤ 1,2V; ν = 100 mVs^{-1}.

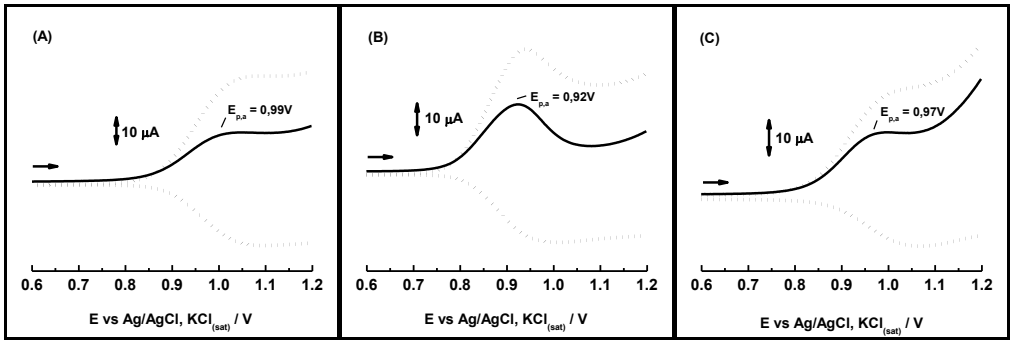
(▬) **c-EDDB**, (●●●) **a-EDDB** e (▬ ▬) **o-EDDB**.

Os voltamogramas cíclicos obtidos em solução dos derivados indólicos, **Figura 24**, indicam maior facilidade de transferência de carga em superfície hidrofóbica como a presente no **c-EDDB** (observaram-se picos mais estreitos, bem definidos e em potenciais menos positivos), diferentemente do observado para os **EDDB** submetidos aos demais pré-tratamentos (**a-EDDB** e **o-EDDB**).

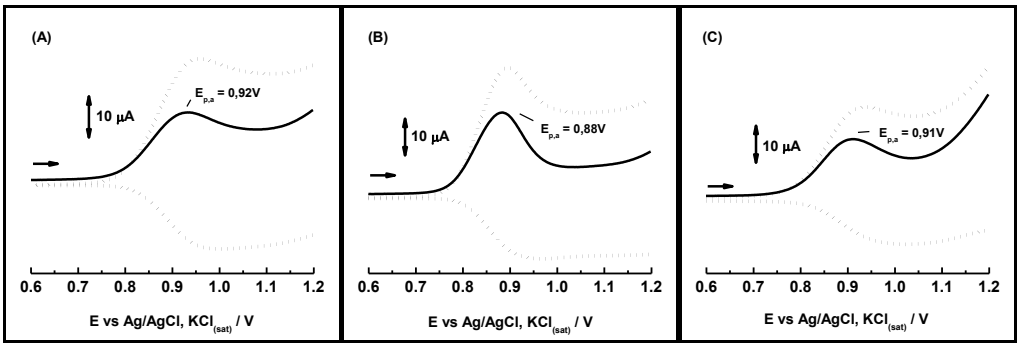
Isso sugere que a oxidação esteja ocorrendo no heteroátomo de nitrogênio do anel pirrólico.

Deve-se ressaltar que o pico de oxidação do triptofano sobre o a superfície hidrofílica do **a-EDDB** foi próximo ao pico de oxidação observado sobre a superfície hidrofóbica do **c-EDDB**. Isto se torna mais visível em voltamogramas de onda quadrada apresentados na Figura 25 e pode ser indicativo da interação entre o grupo 2-amino da molécula e a superfície hidrofílica do eletrodo, já que no pH de trabalho tem-se a forma desprotonada em solução.

1°



2°



3°

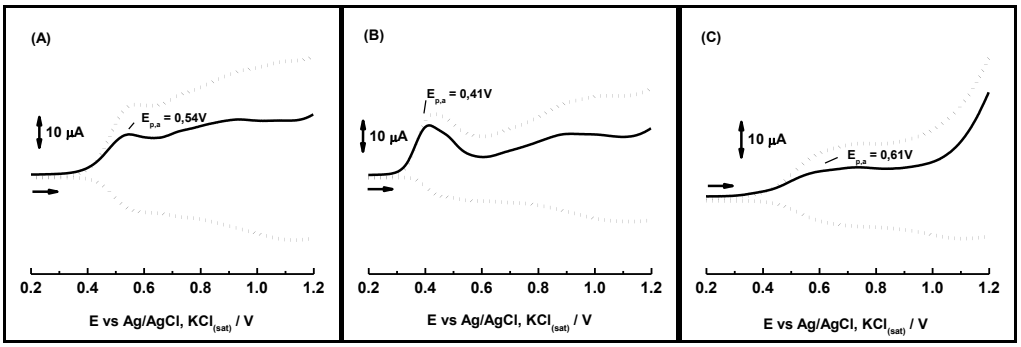


Figura 25 - Voltamogramas de onda quadrada dos eletrodos de **DDB** após diferentes tratamentos de superfície, obtidos em tampão fosfato 0,1 molL^{-1} pH 7,2 contendo soluções de concentração 100µmolL^{-1} de (1) indol, (2) L-triptofano e (3) serotonina.

Parâmetros experimentais: 0,2V ≤ E_{Apl} ≤ 1,2V, Frequência: 25 Hz; Amplitude de pulso: 30 mV.

(A) **c-EDDB**, (B) **a-EDDB** e (C) **o-EDDB**.

Outro fator visível é o deslocamento do potencial de pico referente à oxidação do triptofano presente no **o-EDDB** para potenciais mais negativos, o que sugere que o pré-tratamento térmico confere uma configuração hidrofílica à superfície do eletrodo similar ao **a-EDDB**, com resposta similar.

5. Conclusão

O pré-tratamento de eletrodos de ouro, combinando procedimentos de polimento mecânico, limpeza química em solução "piranha" e limpeza eletroquímica em H_2SO_4 0,5 molL^{-1}, minimizou os problemas de reprodutibilidade de superfície do eletrodo. O quociente entre Q_m, a carga envolvida no processo de redução da monocamada de óxido de ouro, formada durante a ciclagem em H_2SO_4, e 390 μCcm^{-2} (valor teórico de carga para redução de uma monocamada de oxigênio adsorvida em um eletrodo de ouro de 1 cm^2 de área ativa), permitiu a determinação da área ativa do eletrodo. Este valor, foi utilizado na normalização do cálculo de recobrimento superficial de 3-MPA, $\Gamma_{3-\mathrm{MPA}}$, obtido dividindo-se a carga referente ao processo de dessorção redutiva do 3-MPA pelo produto da área ativa do eletrodo, número de elétrons envolvidos e a constante de Faraday.

Os processos de dessorção redutiva do 3-MPA em solução de KOH não apresentaram correlação direta com o aumento da concentração da solução de MPA (10 e 25 mmolL^{-1}) para imersão do eletrodo de ouro, porém os resultados obtidos para o recobrimento superficial apresentaram a mesma ordem de grandeza e deste modo, optou-se por usar a solução de maior concentração para a continuidade da modificação superficial. O efeito do tempo de imersão (1, 2 e 4 horas) nesta solução foi igualmente avaliado. Observou-se que quanto maior o tempo de imersão menor a carga do pico de dessorção redutiva do 3-MPA,

relativa aos defeitos da monocamada. No entanto a utilização do maior tempo não coincidia com a proposta inicial de se prepara o eletrodo em tempos mínimos, de modo que o tempo de imersão escolhido foi o de 2 horas.

O processo de ancoramento de cisteína foi dependente do pH, já que se baseou na interação eletrostática originada entre a forma desprotonada do grupo carboxílico superficial presente no 3-MPA e a forma protonada do grupo amina presente na cisteína. O ancoramento foi realizado em um valor de pH intermediário entre os valores de pKa do grupo carboxílico (pKa = 5,49) e do grupo amina (pKa = 10,78). O tampão MES 0,2 $molL^{-1}$, pKa = 6,15, foi utilizado para este fim, principalmente por não apresentar propriedades de complexação de metais em geral.

O eletrodo de **Au/MPA/CSH** recém preparado não apresentou, em tampão fosfato 0,1 $molL^{-1}$, pH 7,2, o par redox correspondente ao processo redox RSSR/RSH, do grupo tiólico superficial. A ausência deste sinal nos primeiros ciclos, foi atribuída à dificuldade no transporte de carga na superfície do eletrodo, ocasionada pela distância entre as moléculas de 3-MPA e cisteína eletrostaticamente ligadas. Devido a este fato, a ciclagem em tampão fosfato, a baixas velocidades de varredura, foi adotado como um procedimento de ativação eletroquímica.

Para imobilização das moléculas de cisteína sobre o eletrodo de **Au/3-MPA** fixou-se inicialmente a concentração da solução de cisteína em 25 $mmolL^{-1}$ (preparada em tampão MES 0,2 $molL^{-1}$, pH 6,2). O tempo de imersão foi variado (1 hora e 24 horas) e observou-se que os resultados foram similares, portanto utilizou-se o tempo de 1 hora de imersão em solução de cisteína. Finalmente o

efeito da concentração de cisteína (25 mmolL^{-1} e 0,1 molL^{-1}) foi avaliado para tempo de imersão de 1 hora. Maiores níveis de corrente para o processo redox do grupo tiólico foram observados para a concentração de 0,1 molL^{-1} de cisteína, sendo este o valor de concentração escolhido.

Como a superfície modificada resiste à lavagens com água, tampão fosfato 0,1 molL^{-1}, pH 7,2 e tampão acetato/ácido acético, pH 4,75, sugere-se que as moléculas de 3-MPA e cisteína, inicialmente ligadas via atração eletrostática, tenham originado a formação de uma ligação amídica com a eliminação de uma molécula de água.

Esta superfície modificada, em sua forma otimizada foi utilizada para a redução de ouro a partir de soluções de $HAuCl_4$. O monitoramento da redução do ouro foi acompanhada pelo desaparecimento do par redox tiólico superficial. Para tanto, solução de $HAuCl_4$ foi adicionada na superfície do eletrodo de **Au/3-MPA/CSH**. O desaparecimento do par redox tiólico superficial, indicou a alteração da superfície do eletrodo, provavelmente devido à incorporação do ouro na forma de nanopartículas.

Após a constatação da ausência do par tiólico superficial, avaliou-se a resposta do eletrodo de **Au/3-MPA/CSH/AuNp** para a redução catalítica de H_2O_2, na ausência de oxigênio. Os resultados obtidos não foram significativos em comparação ao eletrodo de **Au** limpo, o que pode ser explicado devido ao meio no qual foram realizadas as medidas (pH 7,2), no qual o peróxido de hidrogênio pode ter atuado, também, como agente oxidante. Os voltamogramas obtidos na reutilização do eletrodo **Au/3-MPA/CSH/AuNp** mostraram a perda da pequena atividade catalítica para a redução do peróxido de hidrogênio, o que

corroborou a hipótese de que o próprio analito, via reação química, tenha promovido a oxidação das nanopartículas superficiais de ouro.

Eletrodos de diamante dopado com boro, previamente submetidos a diversos tipos de tratamento superficial, quais sejam, tratamento catódico (**c-EDDB**), tratamento anódico (**a-EDDB**) e térmico, foram utilizados na detecção dos alguns compostos indólicos, tais como: triptofano e serotonina. Os voltamogramas cíclicos obtidos em solução dos analitos, indicaram maior facilidade de transferência de carga na superfície do eletrodo **c-EDDB** (picos mais estreitos, bem definidos e em potenciais menos positivos foram observados), diferentemente do observado para os eletrodos **a-EDDB** e **o-EDDB**. Na detecção de triptofano, observou-se que a distância entre os potenciais de pico de oxidação sobre o a superfície hidrofílica do **a-EDDB** em relação à superfície hidrofóbica do **c-EDDB** foi menor, o que pode ser indicativo de um mecanismo de aproximação distinto para estas moléculas, em comparação com os outros compostos indólicos estudados.

6. Perspectivas futuras

Pretende-se, no menor espaço de tempo possível, responder algumas das dúvidas que ficaram em aberto no decorrer do trabalho, quais sejam:

1- Efetuar a detecção de peróxido de hidrogênio com o eletrodo de **Au/3-MPA/CSH/AuNp** em meio alcalino afim de verificar se nesta condição o efeito catalítico para redução deste analito é mais efetiva. Se isto acontecer, a hipótese levantada da possível reoxidação do ouro por reação química com o peróxido, em meio neutro, é de fato possível.

2 - Verificar se o eletrodo de **Au/3-MPA/CSH/AuNp** pode ser utilizado na detecção de compostos indólicos. Em caso positivo os resultados obtido serão comparados aos provenientes da utilização de eletrodos de diamante dopado com boro, submetidos a um prévio tratamento catódico.

3 - Verificar se o eletrodo de **Au/3-MPA/CSH** pode ser utilizado para detecção de espécies intermediárias provenientes da redução monoeletrônica de nitrocompostos, uma vez que a presença de cisteína na superfície do transdutor pode facilitar a redução monoeletrônica, com a formação de nitro radicais, ou ainda a estabilização da espécie proveniente da redução com envolvimento de 2 elétrons, o derivado nitroso (JULIÃO et al., 2006).

7. Bibliografia

ALI, T. A. et al. Zinc(II) modified carbon paste electrodes based on self-assembled mercapto compounds-gold-nanoparticles for its determination in water samples. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 3320–3328, set. 2014.

ALLEN, P. M. et al. Surface modifiers for the promotion of direct electrochemistry of cytochrome c. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 178, n. 1, p. 69–86, out. 1984.

ARRIGO, A.-P. Gene expression and the thiol redox state. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9-10, p. 936–944, nov. 1999.

BENITES, T. A. et al. Efeitos da Rugosidade Superficial nas propriedades de Passivação de Monocamadas Organicas Automontadas. **Química Nova**, v. 37, n. 9, p. 1533–1537, 2014.

BOND, A. M. et al. Evidence for fast and discriminatory electron transfer of proteins at modified gold electrodes. **European Journal of Biochemistry**, v. 191, n. 3, p. 737–742, ago. 1990.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; TUGULEA, L. Anodic stripping voltammetry of trace metals by batch injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 322, n. 3, p. 151–157, abr. 1996.

BUORO, R. M. et al. Imunossupressor leflunomide anodic behaviour at a boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 729, p. 61–67, set. 2014.

CALVELO, M.; VÁZQUEZ, S.; GARCÍA-FANDIÑO, R. Molecular dynamics simulations for designing biomimetic pores based on internally functionalized self-assembling α,γ-peptide nanotubes. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, 7 out. 2015.

CARVALHAL, R. F.; FREIRE, R. S.; KUBOTA, L. T. Polycrystalline gold electrodes: A comparative study of pretreatment procedures used for cleaning and thiol self-assembly monolayer formation. **Electroanalysis**, v. 17, n. 14, p. 1251–1259, 2005.

CHEN, D.; LI, J. Interfacial design and functionization on metal electrodes through self-assembled monolayers. **Surface Science Reports**, v. 61, n. 11, p. 445–463, 2006.

DONG, S.; LI, J. Self-assembled monolayers of thiols on gold electrodes for bioelectrochemistry and biosensors. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 42, n. 1, p. 7–13, abr. 1997.

DUBOIS, L.; NUZZO, R. Synthesis, structure, and properties of model organic surfaces. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 43, p. 437–463, 1992.

ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Pathways of Electrochemical Oxidation of Indolic Compounds. **Electroanalysis**, v. 23, n. 6, p. 1337–1344, 2011.

FASCI, J. S. Modification of electrode surfaces with self-organized electroactive microstructures. **Tech. Chem.**, v. 22, p. 119, 1992.

FENG, G. et al. Studies on the effect of electrode pretreatment on the coverage of self-assembled monolayers of dodecanethiol on gold by electrochemical reductive desorption determination. **The Analyst**, v. 136, n. 23, p. 5058, 2011.

FILOMENI, G.; ROTILIO, G.; CIRIOLO, M. R. Cell signalling and the glutathione redox system. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 5-6, p. 1057–1064, set. 2002.

FISICA, C.; MILANO, U. Real Surface Area Measurements in Electrochemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 5, p. 711–734, 1991.

FORD, M. J.; MASENS, C.; CORTIE, M. B. The Application of Gold Surfaces and Particles in Nanotechnology. **Surface Review and Letters**, v. 13, n. 02n03, p. 297–307, 2006.

FREIRE, R. S. et al. Direct Electron Transfer: An Approach for Electrochemical Biosensors with Higher Selectivity and Sensitivity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 230–243, 2003.

GIZ, M. .; DUONG, B.; TAO, N. . In situ STM study of self-assembled mercaptopropionic acid monolayers for electrochemical detection of dopamine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 465, n. 1, p. 72–79, abr. 1999.

GODÍNEZ, L. A.; CASTRO, R.; KAIFER, A. E. Adsorption of Viologen-Based Polyelectrolytes on Carboxylate-Terminated Self-Assembled Monolayers. **Langmuir**, v. 12, n. 21, p. 5087–5092, jan. 1996.

GOODING, J. J.; HIBBERT, D. B. The application of alkanethiol self-assembled monolayers to enzyme electrodes. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 8, p. 525–533, ago. 1999.

GORTON, L. et al. Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide coenzymes by graphite electrodes modified with an adsorbed phenoxazinium salt, meldola blue. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 161, n. 1, p. 103–120, 1984.

HABIB, A.; TABATA, M.; WU, Y. G. Formation of Gold Nanoparticles by Good's Buffers. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 78, n. 2, p. 262–269, 11 fev. 2005.

HOOGVLIET, J. et al. Electrochemical pretreatment of polycrystalline gold electrodes to produce a reproducible surface roughness for self-assembly: a study in phosphate buffer pH 7.4. **Analytical chemistry**, v. 72, n. 9, p. 2016–21, 2000.

HU, K.; BARD, A. J. Use of Atomic Force Microscopy for the Study of Surface Acid−Base Properties of Carboxylic Acid-Terminated Self-Assembled Monolayers. **Langmuir**, v. 13, n. 19, p. 5114–5119, set. 1997.

IKEGAMI, M. et al. Size-controlled fabrication of gold nanodome arrays and its application to enzyme electrodes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 384, n. 1-3, p. 388–392, jul. 2011.

JACOB, R. A. The integrated antioxidant system. **Nutrition Research**, v. 15, n. 5, p. 755–766, maio 1995.

JULIÃO, M. S. DA S. et al. Voltammetric detection of the interactions between RNO2− and electron acceptors in aqueous medium at highly boron doped diamond electrode (HBDDE). **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 24, p. 5080–5086, jul. 2006.

KAKIUCHI, T. et al. Double-Layer-Capacitance Titration of Self-Assembled Monolayers of ω-Functionalized Alkanethiols on Au(111) Surface. **Langmuir**, v. 16, n. 12, p. 5397–5401, jun. 2000.

KIMLING, J. et al. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. **The journal of physical chemistry. B**, v. 110, n. 32, p. 15700–7, 17 ago. 2006.

LANE, R. F.; HUBBARD, A. T. Electrochemistry of chemisorbed molecules. I. Reactants connected to electrodes through olefinic substituents. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 77, n. 11, p. 1401–1410, maio 1973.

LEE, K. A. Electron transfer into self-assembling monolayers on gold electrodes. **Langmuir**, v. 6, n. 3, p. 709–712, 1990.

LEE, Y.; PARK, T. G. Facile fabrication of branched gold nanoparticles by reductive hydroxyphenol derivatives. **Langmuir**, v. 27, n. 6, p. 2965–2971, 2011.

LI, Z. et al. Effect of surface pretreatment on self-assembly of thiol-modified DNA monolayers on gold electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 722-723, p. 131–140, 2014.

LOURENÇÃO, B. C. et al. Simultaneous Differential Pulse Voltammetric Determination of Ascorbic Acid and Caffeine in Pharmaceutical Formulations Using a Boron-Doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 22, n. 15, p. 1717–1723, 2010.

ŁUCZAK, T. Comparison of electrochemical oxidation of epinephrine in the presence of interfering ascorbic and uric acids on gold electrodes modified with S-functionalized compounds and gold nanoparticles. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 24, p. 5863–5870, out. 2009.

MASKUS, M.; ABRUÑA, H. D. Synthesis and Characterization of Redox-Active Metal Complexes Sequentially Self-Assembled onto Gold Electrodes via a New Thiol−Terpyridine Ligand. **Langmuir**, v. 12, n. 18, p. 4455–4462, jan. 1996.

MISCORIA, S. A.; BARRERA, G. D.; RIVAS, G. A. Enzymatic Biosensor Based on Carbon Paste Electrodes Modified with Gold Nanoparticles and Polyphenol Oxidase. **Electroanalysis**, v. 17, n. 17, p. 1578–1582, set. 2005.

MORAN, L.; GUTTERIDGE, J.; QUINLAN, G. Thiols in Cellular Redox Signalling and Control. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 7, p. 763–772, 1 jun. 2001.

OLIVEIRA, F. C. M. DE; SERRANO, S. H. P. Electrochemically Active L-Cysteine Gold Modified Electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 125, p. 566–572, 2014.

PINGARRÓN, J. M.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 19, p. 5848–5866, 2008.

POMPELLA, A. et al. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1499–1503, 2003.

PRIME, K. L.; WHITESIDES, G. M. Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide): a model system using self-assembled monolayers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 23, p. 10714–10721, nov. 1993.

RAGHEB, T.; GEDDES, L. A. Electrical properties of metallic electrodes. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 28, n. 2, p. 182–186, mar. 1990.

RAHMAN, M. M.; ASIRI, A. M. Selective choline biosensors based on choline oxidase co-immobilized into self-assembled monolayers on micro-chips at low potential. **Anal. Methods**, 14 out. 2015.

RAJ, C. R.; OKAJIMA, T.; OHSAKA, T. Gold nanoparticle arrays for the voltammetric sensing of dopamine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 543, n. 2, p. 127–133, 2003.

RASHID, H. et al. Synthesis of spongy gold nanocrystals with pronounced catalytic activities. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 22, n. 17, p. 7141–3, 15 ago. 2006.

RITA DE CÁSSIA MENDES DE BARROS. **Mecanismo de oxidação eletroquímica e determinação analítica de primaquina – algumas aplicações de eletrodos de diamante dopado com boro**. [s.l: s.n.].

SATO, Y.; MIZUTANI, F. Determination of Real Composition of 3-Mercaptopropionic Acid and 1-Octadecanethiol Mixed Self-Assembled Monolayers by Using Electrochemical and Electrochemical Quartz Crystal Microbalance Measurements. **Electroanalysis**, v. 10, n. 9, p. 633–637, jul. 1998.

SAWAGUCHI, T.; SATO, Y.; MIZUTANI, F. Ordered structures of self-assembled monolayers of 3-mercaptopropionic acid on Au(111): in situ scanning tunneling microscopy study. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 3, n. 16, p. 3399–3404, 2001.

SEN, C. K. Redox Signaling and the Emerging Therapeutic Potential of Thiol Antioxidants. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 11, p. 1747–1758, jun. 1998.

SIRAJUDDIN et al. The formation of gold nanoparticles using hydroquinone as a reducing agent through a localized pH change upon addition of NaOH to a solution of HAuCl4. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 370, n. 1-3, p. 35–41, 2010.

SONG, S. et al. Characterization of cytochrome c/alkanethiolate structures prepared by self-assembly on gold. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 97, n. 24, p. 6564–6572, jun. 1993.

STEEL, A. B.; HERNE, T. M.; TARLOV, M. J. Electrochemical Quantitation of DNA Immobilized on Gold. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 22, p. 4670–4677, nov. 1998.

SUGIHARA, K.; SHIMAZU, K.; UOSAKI, K. Electrode Potential Effect on the Surface p K a of a Self-Assembled 15-Mercaptohexadecanoic Acid Monolayer on a Gold/Quartz Crystal Microbalance Electrode. **Langmuir**, v. 16, n. 18, p. 7101–7105, set. 2000.

WEDEMEYER, W. J. et al. Disulfide Bonds and Protein Folding †. **Biochemistry**, v. 39, n. 15, p. 4207–4216, abr. 2000.

WELCH, C. M.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, n. 3, p. 601–619, 2006.

XU, S.; HAN, X. A novel method to construct a third-generation biosensor: self-assembling gold nanoparticles on thiol-functionalized poly(styrene-co-acrylic acid) nanospheres. **Biosensors & bioelectronics**, v. 19, n. 9, p. 1117–20, 15 abr. 2004.