

Universidade de São Paulo
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

FERNANDO CASTRO MOTA DE OLIVEIRA

**Mecanismo Redox e Aplicações Analíticas
de L-Cisteína e L-Glutationa Ancoradas sobre
Eletrodos de Ouro Recobertos com Camadas Auto-
Arranjadas de Ácido 3-Mercaptopropiônico**

Versão Corrigida da Tese Defendida

São Paulo

Data de Depósito na SPG
16/08/2013

FERNANDO CASTRO MOTA DE OLIVEIRA

**Mecanismo Redox e Aplicação Analítica
de L-Cisteína e L-Glutationa Ancoradas sobre
Eletrodos de Ouro Recobertos com Camadas Auto-
Arranjadas de Ácido 3-Mercaptopropiônico**

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

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Helena Pires Serrano

São Paulo

2013

O grande inconveniente da vida real e o que a torna insuportável ao homem superior é que, se transferirem para ela os princípios do ideal, as qualidades tornam-se defeitos, de modo que, muito frequentemente, o homem completo tem bem menos sucesso na vida do que aquele que se move pelo egoísmo ou pela rotina vulgar.

Epigrafe de “O Triste Fim de Policarpo Quaresma” (Lima Barreto) retirada do 26º capítulo de *Marco Aurélio ou o fim do mundo antigo* (*Marc-Aurèle ou la fin du monde antique*), último volume da obra *As origens do Cristianismo* (*Les origines du Christianisme*) do escritor e pensador francês Ernest Renan.

Dedicatória

**Aos meus pais Antonilio e Rosilene
e minha irmã Carina pelo carinho, ternura e força nos momentos difíceis;**

Agradecimentos

A Profa. Dra. Silvia Helena Pires Serrano pela Orientação e Aprendizado que me foram proporcionados

Aos Colegas do Laboratório de Bioeletroquímica e Bioeletroanalítica (LABIA) João (in memoriam), Robson, Cel. William, José Vinícius, Luis, Othon, Rafael, Raphael, Maila, Amanda, Adriana e Matesa, que proporcionaram um convívio amigável e que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Márcia Laudelina Arruda Temperini e o Dr. Tercio Paulo pelo auxílio e utilização do Laboratório de Espectroscopia Molecular (LEM), para a realização das medidas de Espectroscopia Raman de Superfície (SERS).

Aos colegas do Instituto de Química pela amizade

Aos Professores, colegas e funcionários do Instituto de Química (IQ/USP) que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro na compra de reagentes para este trabalho e pela concessão da bolsa de doutorado.

Resumo

Moléculas de L-cisteína (CSH) e L-glutathiona (GSH) foram ancoradas na superfície de eletrodos de ouro, previamente modificados com uma camada autoarranjada de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA). Esta arquitetura molecular foi importante para preservar a atividade redox dos grupos tiólicos da CSH e GSH na interface eletrodo/solução. A identificação do par redox R-S-S-R/R-SH, bem como a determinação do pKa dos grupos -SH superficiais, foram efetuadas usando voltametria cíclica em soluções de eletrólito em diferentes pH contendo ferricianeto de potássio. A presença dos grupos -SH e -S-S- na superfície dos eletrodos modificados foi ainda confirmada por Espectroscopia Raman de Superfície. Determinaram-se as constantes de velocidade de transferência de carga do processo quase reversível R-S-S-R / R-SH. Estes eletrodos modificados apresentaram resposta eletrocatalítica para a redução de espécies reativas de oxigênio (ROS), como peróxido de hidrogênio e para a oxidação de compostos com atividade antioxidante como a quercetina. Demonstrou-se que a presença de íons Cu^{2+} na superfície destes eletrodos é capaz de deslocar o equilíbrio do par R-S-S-R/R-SH, no sentido oxidativo. Métodos de quantificação para estes compostos foram desenvolvidos por amperometria hidrodinâmica e voltametria cíclica.

Palavras Chave: L-cisteína, L-glutathiona, Voltametria Cíclica, Camadas Auto-Arranjadas, Ponte de dissulfeto, Espécies Reativas de Oxigênio, Antioxidantes.

Abstract

L-cysteine molecules (CSH) and L-glutathione (GSH) were anchored on the surface of gold electrodes, previously modified with a self assembled monolayer of 3-mercaptopropionic acid (MPA). This molecular architecture was important to preserve the redox properties of the thiol groups of CSH and GSH in the interface electrode / solution. The identification of the redox couple RSSR / R-SH and the determination of the pKa of -SH groups surface were made using cyclic voltammetry in electrolyte solutions at different pH contents potassium ferricyanide. The presence of the -SH and -SS- modified electrode surface was further confirmed by Raman spectroscopy of surface. It was determined the rate constants of direct electron transfer of quasi-reversible coupled R-SS-R/R-SH. The modified electrodes showed electrocatalytic response to the reduction of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide and the oxidation of compounds with antioxidant activity such as quercetin. It was demonstrated that presence of Cu^{2+} ions on the electrode surface can shift the equilibrium of the RSSR/R-SH redox coupled into oxidative direction. Hydrogen peroxide and Quercetin were detected at these modified electrodes using amperometry and hydrodynamic cyclic voltammetry.

Keywords: L-cysteine, L-glutathione, Cyclic Voltammetry, Self Assembled Mono layers, Disulfide Bridge, Reactive Oxygen Species, Antioxidants.

Sumário

Resumo	6
Abstract	7
1. Introdução	18
1.1. Revisão Bibliográfica	20
1.1.1. Eletrodos Modificados por Camadas Auto-arranjadas	20
1.1.2. Principais Técnicas de Caracterização das Camadas Auto-arranjadas.....	22
1.1.2.1. Espectroscopia Raman de Superfície	23
1.1.3. Transferência Eletrônica em Camadas Auto-arranjadas	25
1.1.3.1. Aplicações em Células Eletroquímicas	26
1.1.4. Espécies Reativas de Oxigênio e Radicais Livres	27
1.1.4.1. Sistema Antioxidante e Estresse Oxidativo.....	29
1.1.4.2. Biossensores para ROS, RNS e Compostos Antioxidantes.....	30
1.1.5. Ação dos Compostos Tiólicos nos Processos do Estresse Oxidativo.....	33
1.1.5.1. Equilíbrio de Formação e Quebra de Pontes de Dissulfeto	33
1.1.5.2. Principais Técnicas Utilizadas para Estudo de Pontes de Dissulfeto	35
2. Materiais e Métodos	38
2.1. Reagentes e Soluções	38
2.2. Célula Eletroquímica	39
2.3. Equipamentos	39
2.4. Limpeza da Superfície de Eletrodo de Ouro	40
2.5. Formação da Camada Auto-arranjada de MPA sobre o Eletrodo de Ouro	40
2.6. Imobilização de CSH e GSH sobre o eletrodo de ouro recoberto com MPA	40
2.7. Ativação Eletroquímica dos Eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH	41
2.8. Titulação Voltamétrica dos Grupos com Característica Acido-Base na Superfície do Eletrodo de Au/MPA e Au/MPA/CSH.....	41
2.9. Tratamento Superficial Eletroquímico do Eletrodo de Ouro para a Obtenção dos Espectros Raman de Superfície	41
2.10. Obtenção dos Espectros Raman de Superfície - SERS dos Eletrodos Modificados com MPA, Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH.	42
2.11. Redução Eletrocatalítica de Peróxido de Hidrogênio sobre os eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH.....	42

2.12. Construção das Curvas Analíticas Amperométricas para Determinação de Peróxido de Hidrogênio utilizando-se os Eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH	43
2.13. Imobilização de íons de Cobre sobre os Eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH	43
2.14. Deslocamento do Equilíbrio Redox dos Eletrodos de Ouro Modificados com Au/MPA/CSH por Moléculas de Oxigênio	43
2.15. Determinação de Quercetina através do Eletrodo de Au/MPA/CSH	44
2.16. Equações utilizadas para o Cálculo dos Parâmetros Termodinâmicos e Cinéticos	44
3. Resultados e Discussão	49
3.1. Otimização das Condições de Formação da Camada Auto-Arranjada de MPA sobre a Superfície do Eletrodo de Ouro	49
3.2. Ativação Eletroquímica dos Eletrodos Modificados de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH	54
3.3. Otimização do Processo de Imobilização de CSH sobre a CAA de MPA sobre o Eletrodo de Ouro	58
3.4. Determinação dos Grupos Funcionais Presentes na Superfície do Eletrodo de Au/MPA/CSH	62
3.5. Caracterização Espectroscópica dos Grupos Funcionais Presentes na Superfície dos Modificados de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH	65
3.6. Determinação dos Mecanismos de Reação dos Eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH em Função do pH	69
3.7. Eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH-Parâmetros Cinéticos	75
3.8. Redução Eletrocatalítica de H ₂ O ₂ em Eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH	80
3.9. Determinação Amperométrica de H ₂ O ₂ usando Eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH	86
3.10. Adsorção de íons Cu ²⁺ sobre os Eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH	90
3.11. Eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH após adsorção de íons de Cu ²⁺ Parâmetros Termodinâmicos	95
3.12. Eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH após Adsorção de íons de Cu ²⁺ Estudo Cinético	99
3.13. Avaliação da Estabilidade dos Eletrodos Modificados com Au/MPA/CSH/Cu ²⁺ e Au/MPA/GSH/Cu ²⁺	103
3.14. Determinação de H ₂ O ₂ utilizando os Eletrodos Modificados com Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH após adsorção de íons de Cu ²⁺	105

3.15. Interação do Eletrodo de Au/MPA/CSH com Moléculas de Oxigênio	108
3.16. Influência do Oxigênio sobre o Excesso Superficial e Coeficiente de Transferência de Carga no Eletrodo de Au/MPA/CSH.....	111
3.17. Avaliação do comportamento voltamétrico do Eletrodo de Au/MPA/CSH na presença de Quercetina e O ₂	114
3.18. Perfil Voltamétrico em Função da Velocidade de Varredura.....	117
3.19. Determinação de Quercetina Através de Eletrodos de Au/MPA/CSH por Voltametria Cíclica.....	119
4. Conclusões	120
5. Perspectivas Futuras	123
6. Referências	124

Lista de Abreviaturas

CAA: camadas auto-arranjadas;

MPA: ácido 3-mercaptopropiônico;

CSH: L-cisteína;

CSSC: cisteína oxidada;

GSH: L-glutathiona;

GSSG: glutathiona oxidada;

RNS: Espécies Reativas de Nitrogênio;

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio;

TEA: Tióis Eletroquimicamente ativos;

XPS: Espectroscopia de Raio-X de Fotoelétrons;

EXAFS: Espectroscopia de Absorção de Raio-X de Estendida à Estrutura Fina;

SHG: Espectroscopia de Geração de Segundo Harmônico;

SFG: Espectroscopia Vibracional de Geração de Soma de Frequência;

SERS: Espectroscopia Raman com Amplificação de Superfície;

HREELS: Espectroscopia de Perda de Energia Eletrônica de Alta Resolução;

AFM: Microscopia de Força Atômica;

STM: Microscopia de Tunelamento Eletrônico;

ESI: Espectroscopia de Impedância Eletroquímica;

LEIS: Espectroscopia de Espalhamento de Íons de Baixa Energia;

SOD: *superóxido dismutase*;

Cat: *catalase*;

GPx: *glutathiona peroxidase*;

PDI: *isomerase dissulfeto proteica*;

SEC: Cromatografia de Exclusão por Tamanho;

MALDI: Desorção/Ionização Assistida por Laser;

XANES: Espectroscopia de Absorção de Raio-X Próximo a Estrutura de Borda;

EPR: Espectroscopia de Ressonância Eletônica Paramagnética;

RMN: Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear;

ppm: partes-por-milhão;

RSSR/RSH: par redox tiol oxidado/tiol reduzido;

MES: Ácido Morfolinoetanossulfônico;

MS: Espectrometria de Massas.

Lista de Esquemas e Figuras

Esquema 1: Representação esquemática de uma CAA contendo defeitos sobre substrato de ouro.	21
Esquema 2: Comparação entre os processos de absorção de radiação na região do Infravermelho, Espalhamento de Rayleigh, Espalhamento Raman Stokes e Raman anti-Stokes.	24
Esquema 3: Estrutura molecular da molécula de L-cisteína (CSH).	33
Esquema 4: Estrutura molecular da molécula de L-glutathione (GSH).	33
Esquema 5: Adsorção das moléculas de MPA sobre a superfície metálica do eletrodo através da ligação do átomo de enxofre sobre átomos de ouro.	49
Esquema 6: Ancoramento das moléculas de CSH sobre a CAA de MPA presente na superfície do eletrodo de ouro.	54
Esquema 7: Processo de adsorção e desprotonação das moléculas de MPA sobre a superfície do eletrodo de ouro.	63
Esquema 8: Processo de adsorção e desprotonação das moléculas de CSH sobre a superfície do eletrodo de ouro recoberto com MPA.	63
Esquema 9: Processo de adsorção e desprotonação das moléculas de GSH sobre a superfície do eletrodo de ouro recoberto com MPA.	64
Esquema 10: Etapas do mecanismo de transferência eletrônica do processo redox observado para o eletrodo de ouro modificado com Au/MPA/CSH.	71
Esquema 11: Etapas do mecanismo de transferência eletrônica do processo redox observado para o eletrodo de ouro modificado com Au/MPA/GSH.	74
Esquema 12: Adsorção de íons Cu^{2+} sobre o eletrodo de Au/MPA/CSH.	90
Esquema 13: Mecanismo de formação da ponte de dissulfeto após a adsorção de íons Cu^{2+} sobre o eletrodo de Au/MPA/CSH.	91
Esquema 14: Mecanismo proposto de manutenção dos grupos tioil sobre o eletrodo de Au/MPA/CSH exercido por íons de cobre.	100
Esquema 15: Equilíbrio tautomérico da molécula de quercetina	116
Figura 1: Voltamograma Cíclico obtido em H_2SO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ usando o eletrodo de ouro previamente polido em suspensão de alumina $0,1 \mu\text{m}$ após tratamento com solução piranha. $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_1 = +1,6 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$; $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$	48

Figura 2: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KOH 0,5 mol L ⁻¹ após a adsorção de MPA sobre a superfície de um eletrodo de ouro. [MPA] = 1 (A); 2 (B), 5(C), 10 (D) e 25 (E) mmol L ⁻¹ E _i = - 0,2 V; E _λ = - 1,3 V e E _f = - 0,2 V; v = 0,05 V s ⁻¹	49
Figura 3: (A) Curva de recobrimento superficial de MPA sobre o eletrodo de ouro versus concentração de MPA utilizada para a adsorção. (B) Isoterma de Langmuir e (C) Isoterma de Frumkin.....	51
Figura 4: Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de ouro limpo, recoberto com MPA (Au/MPA) e recoberto com MPA e CSH (Au/MPA/CSH) em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,2 contendo O ₂ dissolvido. E _i = - 0,2 V; E _l = + 0,3 V e E _f = - 0,2 V; v = 0,1 V s ⁻¹	52
Figura 5: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de ouro recoberto com CSH através da imersão deste em solução desta molécula a diferentes concentrações durante 1 hora, em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,2. E _i = - 0,2 V; E _l = + 0,3 V e E _f = - 0,2 V; v = 0,1 V s ⁻¹ . [CSH] = 2, 5, 10, 15, 20 mmol L ⁻¹	53
Figura 6: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo Au/MPA/CSH em solução tampão acetato de amônio 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,2 na ausência de O ₂ . Processo de Ativação do Eletrodo e (B) Corrente de pico versus número de ciclos. E _i = - 0,2 V; E _l = +0,3 V e E _f = -0,2 V; v = 0,01 V s ⁻¹	54
Figura 7: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo Au/MPA/GSH em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,2. (B) Corrente de pico versus número de ciclos. E _i = -0,2 V; E _λ = 0,3 V e E _f = -0,2 V; v = 0,01 V s ⁻¹	56
Figura 8: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,2 utilizando eletrodos de Au/MPA/CSH preparados com diferentes concentrações de CSH. (B) Curva corrente de pico versus concentração de CSH. E _i = -0,2 V; E _λ = 0,3 V e E _f = -0,2 V; v = 0,01 V s ⁻¹	57
Figura 9: (A) Curva do recobrimento superficial de CSH calculado sobre o eletrodo de Au/MPA/CSH versus concentração de CSH utilizada para a adsorção. (B) Curvas Isotermas de Langmuir e (B) de Frumkin.	58
Figura 10: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,2 utilizando eletrodo de Au/MPA/GSH preparados usando diferentes concentrações de GSH. (B) Curva de correntes de pico versus concentração de GSH. E _i = -0,2 V; E _λ = 0,3 V e E _f = -0,2 V; v = 0,01 V s ⁻¹	59

Figura 11: (A) Curva do recobrimento superficial de GSH sobre o eletrodo de Au/MPA/GSH versus concentração de GSH utilizada para a adsorção; (B) Isoterma de Langmuir e (C) Isoterma de Frumkin.....	60
Figura 12: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ em solução tampão fosfato em diferentes valores de pH. (A) Au/MPA e (B) Au/MPA/CSH. $E_i = 0,6 \text{ V}$, $E_\lambda = -0,1 \text{ V}$, $E_f = 0,6 \text{ V}$, $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$	61
Figura 13: (A e C) Curva de $I_{p,c}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ versus pH das soluções de fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. (B e D) Curva de $\partial I_{p,c}/\partial \text{pH}$ versus pH. Resultados obtidos utilizando eletrodos de ouro modificados com (A e B) Au/MPA e (C e D) Au/MPA/CSH.	62
Figura 14: Voltamogramas cíclicos obtidos com os eletrodos: (A) Au/MPA/CSH e (B) Au/MPA/GSH polidos e após procedimento de nanoestruturação prévio antes da formação das camadas de MPA e CSH ou GSH, item 2.9. $E_i = -0,2 \text{ V}$, $E_\lambda = +0,3 \text{ V}$, $E_f = -0,2 \text{ V}$; $v = 0,01 \text{ V s}^{-1}$	65
Figura 15: Espectros Raman de uma solução 10 mmol L^{-1} de MPA.	66
Figura 16: Espectros Raman de uma solução 10 mmol L^{-1} de CSH.	66
Figura 17: Espectros Raman de uma solução 10 mmol L^{-1} de GSH.	67
Figura 18: Espectros Raman de Superfície dos eletrodos de Au/MPA (a), Au/MPA/CSH (b) e Au/MPA/GSH (c). Condições experimentais da obtenção dos espectros conforme item 2.10.	67
Figura 19: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sob diferentes pH. $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_\lambda = +0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$; $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$. (B) Curvas de E_p versus pH ($E_{p,c} = 0.287 - 0.039 \text{ pH}$ e $E_{p,a} = 0.346 - 0.037 \text{ pH}$). (C) I_p versus pH.	69
Figura 20: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/GSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH. $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_\lambda = +0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$; $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$. (B) Curvas de E_p versus pH ($E_{p,c} = 0.212 - 0.027 \text{ pH}$ e $E_{p,a} = 0.289 - 0.030 \text{ pH}$). (C) I_p versus pH.....	72
Figura 21: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2, em diferentes velocidades de varredura. $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_\lambda = +0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$. (B) Curvas de E_p versus $\ln v$ e (C) I_p versus v . $I_{p,a} = (0,628 \pm 0,008) 10^{-6} \text{ A/V s}^{-1} v$, $R = 0,9952$; $I_{p,c} = (0,585 \pm 0,007) 10^{-6} \text{ A/V s}^{-1} v$, $R = 0,9934$	75

Figura 22: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/GSH em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,2; sob diferentes velocidades de varredura. E _i = -0,2 V; E _λ = +0,3 V e E _f = -0,2 V. (B) Curvas de E _p versus ln v e (C) I _p versus v. I _{p,a} = (0,242 ± 0,008) 10 ⁻⁶ v, R = 0,9952; I _{p,c} = -(0,305 ± 0,004) 10 ⁻⁶ v, R = 0,9934.	78
Figura 23: Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando os eletrodos de (A) Au/MPA/CSH e (B) Au/MPA/GSH em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ a 0.01 V s ⁻¹ na ausência e na presença de 2,0 mmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂ . E _i = -0,2 V; E _l = 0,3 V e E _f = -0,2 V.	80
Figura 24: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,2 na presença de 10 mmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂ à diferentes velocidades de varredura. E _i = -0,2 V; E _l = +0,3 V e E _f = -0,2 V. (B) Curva de I _p versus v. (C) Curva de I _{p,a} /I _{p,c} versus v. (D) I _p versus v ^{1/2}	81
Figura 25: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/GSH em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ na presença de 10 mmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂ à diferentes velocidades de varredura. E _i = -0,2 V; E _l = 0,3 V e E _f = -0,2 V. (B) Curva de I _p versus v. (C) Curva de I _{p,a} /I _{p,c} versus v. (D) I _p versus v ^{1/2}	83
Figura 26: (A) Voltamogramas cíclicos do obtidos com o eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ na presença de diferentes concentrações de H ₂ O ₂ . (B) Curva de I _{p,c} versus [H ₂ O ₂]. E _i = -0,2 V; E _l = 0,3 V e E _f = -0,2 V; v = 0,01 V s ⁻¹ . I _{p,c} = (0,519 ± 0,054) nA + (4,45 ± 0,02)[H ₂ O ₂ / mmol L ⁻¹].	84
Figura 27: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de MPA/GSH em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ na presença de diferentes concentrações de H ₂ O ₂ . (B) Curva de I _{p,c} versus [H ₂ O ₂]. E _i = -0,2 V; E _l = 0,3 V e E _f = -0,2 V; v = 0,01 V s ⁻¹ . I _{p,c} = (0,112 + 0,058) nA + (11,66 + 0,12)[H ₂ O ₂ / mmol L ⁻¹].	85
Figura 28: (A) Amperograma obtido usando o eletrodo de Au/MPA/CSH - Detecção de H ₂ O ₂ em uma célula eletroquímica contendo solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,2. E _{ap} = -0,1 V. (B) Curva Analítica: I _{catódica} versus [H ₂ O ₂].	87
Figura 29: (A) Amperograma obtido usando o eletrodo de Au/MPA/GSH – Detecção de H ₂ O ₂ em uma célula eletroquímica contendo solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,2. E _{ap} = -0,1 V. (B) Curva Analítica: I _{catódica} versus [H ₂ O ₂].	88
Figura 30: Voltamogramas cíclicos obtido com o eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,2 antes e após a adsorção de íons cobre, conforme descrito no item 2.13. E _i = -0,2 V; E _l = 0,3 V e E _f = -0,2 V; v = 0,1 V s ⁻¹	89

Figura 31: Espectros de Raman de superfície do eletrodo de Au/MPA/CSH obtidos antes (a) e após (b) a adsorção de íons Cu^{2+} a sua superfície.....	92
Figura 32: Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/GSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ antes e após adsorção de íons cobre conforme descrito no item 2.13 Condições Experimentais: $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_\lambda = 0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$. $v = 0,10 \text{ V s}^{-1}$	92
Figura 33: Espectros Raman de superfície do eletrodo de Au/MPA/GSH obtidos antes (a) e após (b) a adsorção de íons Cu^{2+} a sua superfície.	93
Figura 34: Voltamogramas cíclicos obtidos com os eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 (A) antes e (B) após adsorção de íons cobre conforme o item 2.13. $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_\lambda = 0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$; $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$	94
Figura 35: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH com o eletrodo de Au/MPA/CSH, após adsorção de íons cobre. (B) Curvas de E_p versus pH ($E_{p,c} = 0.302 - 0.038 \text{ pH}$ e $E_{p,a} = 0.386 - 0.031 \text{ pH}$). (C) I_p versus pH. $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_\lambda = +0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$; $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$	95
Figura 36: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/GSH, após adsorção de íons Cu^{2+} , em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores pH (B) Curvas de E_p versus pH ($E_{p,c} = 0.228 - 0.029 \text{ pH}$ e $E_{p,a} = 0.322 - 0.033 \text{ pH}$). (C) Curvas I_p versus pH. Condições Experimentais: $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_\lambda = 0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$ e $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$	97
Figura 37: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/CSH, após adsorção de íons cobre, em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes velocidades de varredura. (B) Curvas de E_p versus $\ln v$ e (C) I_p versus v . ($I_{p,c} = -(17,97 \pm 0,8) 10^{-6} (\text{A} / \text{V s}^{-1}) v$ $R = 0,9992$; $I_{p,a} = (10,08 \pm 0,30) 10^{-6} (\text{A} / \text{V s}^{-1}) v$ $R = 0,9994$). Condições Experimentais: $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_\lambda = 0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$	99
Figura 38: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/GSH, após adsorção de íons cobre, em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 em diferentes velocidades de varredura (B) Curvas de E_p versus $\ln v$ e (B) I_p versus v . $I_{p,c} = -(9,04 \pm 0,03) 10^{-6} (\text{A} / \text{V s}^{-1}) v$; $R = 0,9988$; $I_{p,a} = (2,96 \pm 0,02) 10^{-6} (\text{A} / \text{V s}^{-1}) v$; $R = 0,9969$. Condições Experimentais: $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_\lambda = 0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$	101
Figura 39: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7.2 a $0,1 \text{ V s}^{-1}$ antes, após adsorção de íons	

cobre e após realização de vários ciclos. (B) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 3,0, com o eletrodo de Au/MPA/CSH após adsorção de íons cobre. E _i = -0,2 V; E _λ = 0,3 V e E _f = -0,2 V. v = 0,1 V s ⁻¹	103
Figura 40: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,2, a 0,1 V s ⁻¹ utilizando o eletrodo de Au/MPA/CSH antes, após adsorção de íons cobre, conforme item 2.13. (B) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 3,0, com o eletrodo de MPA/GSH após adsorção de íons cobre. E _i = -0,2 V; E _λ = 0,3 V e E _f = -0,2 V. v = 0,1 V s ⁻¹	103
Figura 41: (A) Amperograma obtido em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,2, após adições de solução padrão de H ₂ O ₂ . Eletrodo de trabalho: Au/MPA/CSH/Cu ²⁺ ; E _{ap} = -0,2 V. (B) Curva analítica de corrente catódica versus concentração de H ₂ O ₂ na célula eletroquímica. I _f = (0,90 ± 0,30) (10 ⁻⁹ A) + (126,6 ± 3,0) (10 ⁻⁹ A / μmol L ⁻¹) [H ₂ O ₂] e R ² = 0,9954.	105
Figura 42: (A) Amperograma obtido em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,2, após adições de solução padrão de H ₂ O ₂ . Eletrodo de trabalho: Au/MPA/GSH/Cu ²⁺ ; E _{ap} = -0,2 V. (B) Curva analítica de corrente catódica versus concentração de H ₂ O ₂ na célula eletroquímica. I _f = (-4,07 ± 0,39) (10 ⁻⁹ A) + (13,98 ± 0,11) (10 ⁻⁹ A / μmol L ⁻¹) [H ₂ O ₂] e R ² = 0,9996.	106
Figura 43: (A) Voltamogramas Cíclicos obtidos com eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,2. E _i = -0,2 V; E _λ = 0,3 V e E _f = -0,2 V; v = 0,1V s ⁻¹ .(B) I _p versus tempo de O ₂ . (C) E _p versus tempo de O ₂ . Voltamogramas registrados após borbulhamento de O ₂ por tempos variáveis.....	108
Figura 44: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,2, após borbulhamento de O ₂ por 30 minutos. E _i = -0,2 V; E _λ = 0,3 V e E _f = -0,2 V; v = 0,1V s ⁻¹ . (B) I _p versus tempo de O ₂ . (C) E _p versus tempo de O ₂	110
Figura 45: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,2. E _i = -0,2V; E _λ = +0,3 V e E _f = -0,2 V; v = 1,0 V s ⁻¹ . (B) Curvas de I _p versus número de ciclos e (B) E _p versus número de ciclos. Voltamogramas registrados após borbulhamento de O ₂ por 30 minutos.	111
Figura 46: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,2 em diferentes velocidades de varredura. E _i = -0,2V; E _λ = +0,3 V e E _f = -0,2 V. (B) Curvas de I _p versus v (I _{p,c} = - (4,08 ± 0,08) 10 ⁻⁶	

$(A / V s^{-1}) v$; $R^2 = 0,9952$ e $I_{p,a} = (2,56 \pm 0,13) 10^{-6} (A / V s^{-1}) v$; $R^2 = 0,9934$). (C) E_p versus $\ln v$. Voltamogramas registrados após borbulhamento de O_2 por 30 minutos... 113

Figura 47: Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 contendo $5,63 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de quercetina. $E_i = -0,2V$; $E_\lambda = +0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$. $v = (A) 0,01$ e (B) $0,1 \text{ V s}^{-1}$. Voltamogramas registrados após borbulhamento de O_2 por 30 minutos..... 115

Figura 48: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 contendo $5,63 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de quercetina. $E_i = -0,2V$; $E_\lambda = +0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$; $v = 0,01 \text{ V s}^{-1}$. Voltamogramas registrados após borbulhamento de O_2 por 30 minutos..... 115

Figura 49: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura utilizando eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 contendo $5,63 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de quercetina. B) Curvas de I_p versus v , (C) E_p versus $\ln v$ e (D) $I_{p,a}/I_{p,c}$ versus v . $E_i = -0,2V$; $E_\lambda = +0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$. Voltamogramas registrados após borbulhamento de O_2 na solução por 30 minutos..... 117

Figura 50: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando o eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2, contendo diferentes concentrações de quercetina e (B) $I_{p,a}$ versus [quercetina]. $I_{p,a} = (20,15 \pm 0,40) \text{ nA} + (7,89 \pm 0,06) [\text{Quercetina}] / \mu\text{mol L}^{-1}$. Condições Experimentais: $E_i = -0,2V$; $E_\lambda = +0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$; $v = 0,01 \text{ V s}^{-1}$ e borbulhamento de O_2 por 30 minutos..... 118

1. Introdução

Dentre os principais objetivos da confecção de eletrodos modificados está à atribuição de certas características específicas de seletividade e sensibilidade dos eletrodos a um determinado analito ou grupo de analitos¹⁻⁴. Isto geralmente é feito através da imobilização de um composto sobre a superfície do eletrodo de trabalho capaz de reagir com o analito, presente na solução de eletrólito suporte.

A formação de camadas auto-arranjadas (CAA) em relação a outras metodologias de modificação de superfícies apresenta diversas vantagens, como a capacidade de se formar monocamadas de recobrimento com alta regularidade e boa reprodutibilidade, através de procedimentos relativamente simples⁵⁻⁸. A imersão da superfície em uma solução contendo moléculas com afinidade pela mesma provoca a formação de uma monocamada através de processos de adsorção química⁹⁻¹⁰. Após a formação da monocamada forças intermoleculares promovem a organização das moléculas, de forma a direcionar todas na mesma direção¹¹. Como os processos de formação da monocamada e sua reorganização molecular são termodinamicamente favoráveis este método de modificação de superfície ganha praticidade frente aos métodos de eletrodeposição e formação de filmes por evaporação (“dip coating” e “spin coating”).

As principais superfícies utilizadas em eletroquímica para a formação de CAA são as de metais nobres como ouro¹²⁻¹⁵, paládio¹⁶⁻¹⁷, platina¹⁸⁻¹⁹ e prata²⁰⁻²¹, sendo os melhores agentes modificadores moléculas contendo grupos doadores de pares eletrônicos como tióis e aminas. Geralmente emprega-se a formação de CAAs com o objetivo de funcionalizá-las e usá-las para imobilização de moléculas eletroativas como enzimas e complexos metálicos²²⁻²⁴. Esta estratégia de imobilização enzimática é, em alguns casos, muito eficiente²⁵.

A imobilização de moléculas eletroativas sobre eletrodos contendo CAA tem sido utilizada nos chamados sensores de terceira geração, onde a transferência eletrônica entre o centro redox do componente biológico e a superfície do eletrodo ocorre diretamente, através de processos de tunelamento dos elétrons gerados após a aplicação do potencial²⁶. Este processo depende da espessura da CAA e, em cadeias lineares, depende do número de carbonos das moléculas constituintes da CAA²⁷.

A ocorrência de reações químicas acopladas ao processo eletroquímico geralmente é um objetivo explorado para o desenvolvimento de sensores utilizando eletrodos modificados com moléculas eletroativas²⁸⁻³⁰. O mecanismo eletrocatalítico permite a determinação do analito em concentrações muito baixas devido ao aumento de sensibilidade e possibilita a obtenção de respostas em potenciais relativamente baixos, dificultando a ação de interferentes. Moléculas como ferroceno³¹⁻³⁴, citocromo-c³⁵⁻³⁷, complexos de rutênio³⁸⁻⁴⁰ e enzimas como peroxidase⁴¹⁻⁴², superóxido dimutase⁴³⁻⁴⁴, além de heme-proteínas⁴⁵ estão entre os principais compostos eletroativos utilizados para a modificação de superfícies de eletrodos.

O desenvolvimento de biossensores com aplicações em análise bioquímica tem por objetivo mimetizar um sistema biológico⁴⁵. Biossensores eletroquímicos geralmente são confeccionados através da imobilização de uma enzima ou biocomposto eletroativo na superfície de um eletrodo, onde a reação entre o composto ancorado e o substrato da reação desencadeia um processo de eletrocatalise⁴⁶.

Dentre os principais sítios de sinalização celular redox no meio biológico estão os grupos tiólicos, presentes em proteínas através de resíduos do aminoácido cisteína, os quais, através do equilíbrio redox envolvendo a formação de pontes de dissulfeto, executam função biológica na conformação do peptídeo, responsável pelo enovelamento de determinadas proteínas⁴⁷⁻⁴⁹. Além disso, o equilíbrio redox envolvendo grupos tiólicos funciona como um componente da frente não enzimática do sistema antioxidante, capaz de eliminar de radicais livres e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio⁵⁰.

Existem na literatura, trabalhos que fazem uso de eletrodos de carbono vítreo modificados com ácido cistêmico, derivado eletroativo da cisteína, porém o processo redox ocorre de maneira diferenciada ao executado pelo grupo tiólico, presente nos resíduos de cisteína das enzimas e proteínas⁵¹⁻⁵⁵.

Desta forma, para desenvolver sensores capazes de mimetizar processos biológicos redox em que grupos tiólicos estejam envolvidos, explorou-se neste trabalho, a preparação de eletrodos de ouro modificados com camadas autoarranjadas de ácido 3-mercaptopropiônico (Au/MPA). Estes foram posteriormente usados para imobilizar tióis biologicamente e eletroquimicamente ativos (TEA) como a L-cisteína (CSH) e a L-glutationa (GSH). Esta estratégia permitiu o desenvolvimento de eletrodos modificados com MPA/CSH (Au/MPA/CSH) e MPA/GSH (Au/MPA/GSH) para a detecção

eletrocatalítica de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS – do inglês Reactive Oxygen Species), como o peróxido de hidrogênio e compostos polifenólicos, antioxidantes, como a quercetina. A interação deste sistema com espécies oxidantes como íons Cu^{2+} e O_2 foi estudada para avaliar o efeito destes compostos sobre o equilíbrio redox RSSR/RSH, sempre presente em sistemas biológicos.

1.1. Revisão Bibliográfica

1.1.1. Eletrodos Modificados com Camadas Autoarranjadas

A formação de Camadas Autoarranjadas (CAA) sobre eletrodos metálicos é uma técnica bem utilizada para diversas finalidades, onde se destacam principalmente a proteção da superfície do eletrodo contra reações indesejadas⁵⁶ ou a funcionalização para ancoramento de moléculas que conferem à superfície, características químicas desejadas⁵⁷⁻⁵⁹. Trata-se de um processo de modificação superficial que confere características específicas a superfície, em função dos grupos funcionais presentes na extremidade livre das moléculas adsorvidas⁶⁰.

O principal substrato utilizado é a superfície metálica de ouro e os principais tipos de compostos adsorventes são moléculas contendo grupos tiólicos (-SH). Os grupos tiólicos apresentam alta afinidade por átomos de ouro da superfície metálica do eletrodo, sendo o processo de adsorção termodinamicamente favorável com liberação de energia de 40 a 50 kcal/mol⁶¹.

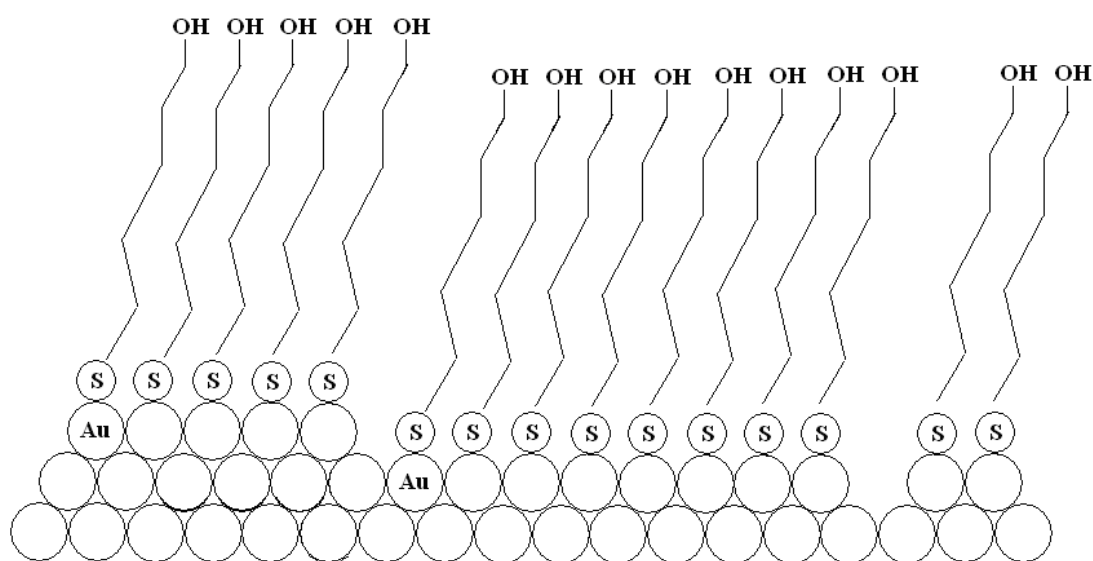
Existem diversas técnicas de confecção de CAA em superfícies, dentre elas processos de evaporação e adsorção em fase gasosa⁶²⁻⁶³, porém a modificação de eletrodos de ouro com alcanotióis é frequentemente realizada através da imersão em soluções diluídas usando etanol como solvente⁶³⁻⁶⁵.

O processo de recobrimento da superfície com a CAA possui cinética dependente da soma das áreas não recobertas, aptas a serem preenchidas com moléculas adsorvidas⁶⁶. O crescimento da área recoberta ocorre através da aglomeração de moléculas partindo de diferentes pontos da superfície até o ponto onde estas áreas de aglomeração se tocam recobrando toda a superfície. A formação das áreas recobertas sobre a superfície ocorre através de três regiões com características distintas: i) áreas com baixa densidade, não uniformes, formadas de moléculas com orientação aleatória possuindo regiões vagas entre si; ii) áreas formadas por moléculas deitadas sobre a superfície e iii) áreas com alta densidade, formadas por moléculas altamente

empacotadas. Ao longo do processo de recobrimento, as regiões da CAA com as formas descritas em i) e ii) tendem à conformação descrita em iii) e quando a saturação da superfície é atingida, esta se encontra recoberta com o maior empacotamento possível.⁶⁷

O processo de auto-organização da CAA ocorre via rearranjo lateral regido por forças de Van der Waals entre as cadeias carbônicas de moléculas adjacentes. Este processo de reorganização provoca a orientação das moléculas na CAA, de modo que moléculas lineares, como alcanotióis, apresentam-se inclinadas na superfície direcionadas sobre o mesmo ângulo, que varia entre 0 a 60°.

A ocorrência de defeitos nas CAA é comum e um processo natural, pois entropicamente o processo de organização molecular é desfavorável. Porém, as causas dos defeitos podem possuir origem intrínseca ou de fatores externos⁶⁸. Os fatores externos estão associados à limpeza da superfície, método de preparação e pureza da solução adsorvente. Os fatores intrínsecos têm origem de processos termodinâmicos da formação das camadas, como surgimento ilhas de vacâncias na estrutura pela saída de ad-átomos e formação de grupos com orientação diferente⁶⁹.



Esquema 1: Representação esquemática de uma CAA contendo defeitos sobre substrato de ouro.

O processo de formação pode ser descrito por diferentes modelos matemáticos, em função da intensidade das interações laterais entre as moléculas que formam CAA. Quando as interações por forças eletrostáticas ou de Van der Waals são desprezíveis ou mutuamente excludentes, o modelo de Langmuir se aplica, de modo que a orientação da CAA ocorre devido a efeitos estéricos de empacotamento sobre a superfície⁷⁰. Quando

as forças entre moléculas adjacentes não podem ser consideradas nulas ou desprezíveis, o modelo de Frumkin deve ser utilizado, pois estas interações são contabilizadas e responsáveis pela auto-organização da CAA⁷¹. No entanto, o modelo de Frumkin, as interações eletrostáticas prevêm repulsões infinitas que são incompatíveis com a realidade. Desta forma, Bockris e colaboradores⁷² desenvolveram um modelo de isoterma que leva em consideração as moléculas carregadas e as forças eletrostáticas e dispersivas entre elas, considerando também a heterogeneidade dos sítios de ligação e a substituição de moléculas do solvente durante o processo de adsorção.

1.1.2. Principais Técnicas de Caracterização das Camadas Autoarranjadas

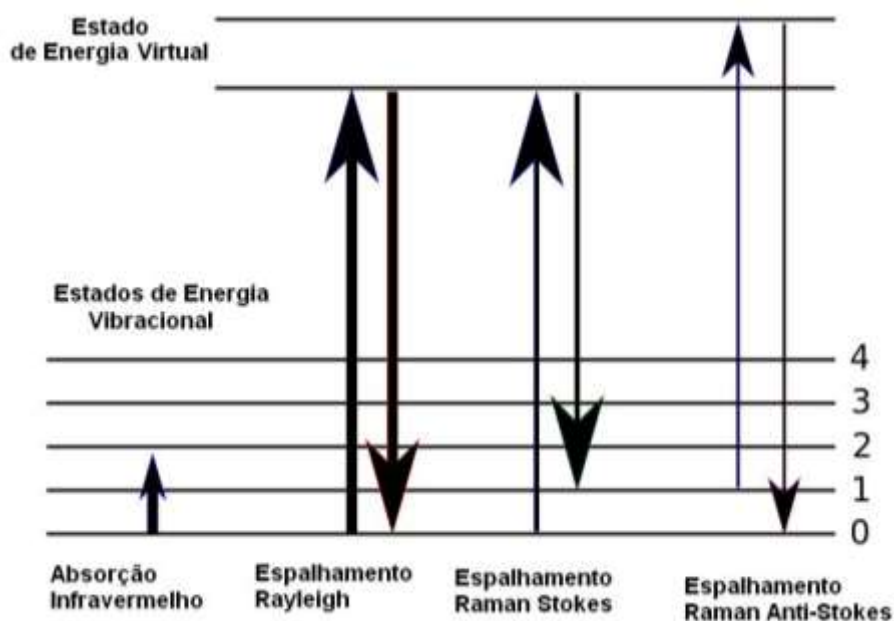
A espessura da CAA pode ser medida utilizando elipsometria e espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (do inglês X-ray photoelectrons spectroscopy - XPS), técnicas que fornecem informações sobre as propriedades interfaciais^{73,74}. O tipo de ordenamento da CAA e a forma de orientação das moléculas podem ser obtidos por meio da Espectroscopia de Absorção de Raio-X de Estrutura Fina Próxima (NEXAFS)⁷⁵. Numerosas outras técnicas espectroscópicas são utilizadas, tal como a geração segunda de harmônicas (do inglês second harmonic generation -SHG)⁷⁶, a geração de frequência soma (do inglês sum frequency generation - SFG)⁷⁷, a espectroscopia Raman de Superfície (do inglês Surface Enhanced Raman Spectroscopy - SERS)⁷⁸, bem como a, de espectroscopia de perda de energia eletrônica de alta resolução (do inglês High Resolution Eletrons Electron Energy Loss - HREELS)⁷⁹. As estruturas das CAA são comumente determinadas utilizando técnicas de microscopia de varredura, como Microscopia de Força Atômica (do inglês Atomic Force Microscope - AFM)⁸⁰ e a microscopia de tunelamento eletrônico (do inglês Scanning Tunneling Microscopy - STM)⁸¹. A STM tem sido capaz de ajudar na compreensão dos mecanismos de formação das CAA, bem como na determinação de suas características estruturais, como a integridade das estruturas granulares bidimensionais formadas, que juntas recobrem a superfície. Em particular a STM pode gerar imagens da distribuição espacial, de grupos terminais e da estrutura empacotada das moléculas nas CAA⁸². A AFM é uma ferramenta igualmente poderosa, sem a exigência de que as CAA sejam condutoras⁸³, tendo sido utilizada para determinar as forças de atrito em CAAs⁸⁴. Mais recentemente, no entanto, também têm sido utilizados métodos de difração⁸⁵⁻⁸⁶.

Um instrumento para caracterizar a formação da CAA em tempo real, é a espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês dual electrochemical spectroscopy impedance – ESI)⁸⁷, onde o comportamento processos é determinado e associado a parâmetros da CAA, como espessura e presença de defeitos. A medição do ângulo de contato pode ser usada para determinar a energia livre de superfície, que reflete a composição superficial média das CAA, como também para sondar a cinética e termodinâmica da formação das CAA^{88, 89}. A cinética de adsorção e temperatura de desorção induzida, bem como informação sobre a estrutura também podem ser obtidas em tempo real, por meio de técnicas de dispersão de íons, tais como a Espectroscopia de Espalhamento de Íons de Baixa Energia (do inglês Low Energy Ion Spectroscopy - LEIS)⁹⁰. Diversas técnicas são utilizadas para a identificação da regularidade e presença de defeitos nas CAA e entre as principais se encontram a AFM e a Espectroscopia Raman de Superfície⁹¹⁻⁹².

1.1.2.1. Espectroscopia Raman de Superfície

A Espectroscopia Raman de Superfície funciona a partir do princípio básico da Espectroscopia Raman realizada em solução⁹³.

O efeito Raman ocorre a partir de espalhamento de luz monocromática absorvida por um composto. Ao retornar ao estado fundamental após uma transição eletrônica, as moléculas emitem um fóton com quantidade de energia igual à absorvida. Este é o chamado espalhamento Rayleigh⁹⁴. Porém, uma pequena quantidade de moléculas, em média na proporção de 1: 10⁸ dos fótons emitidos possui energia menor que a absorvida. Este processo é chamado de espalhamento Raman Stokes⁹⁵. Também pode ocorrer emissão de fótons com maior energia do que a absorvida, em proporção ainda menor que a do espalhamento Rayleigh, processo denominado de espalhamento Raman Anti-Stokes⁹⁶. Os processos de espalhamento Raman podem ser comparados aos processos de absorção de radiação no intervalo do infravermelho, que envolvem transições de estados vibracionais de ligações e são úteis na identificação de ligações químicas⁹⁷. Ambas as técnicas são complementares, pois algumas transições não observadas nos espectros de Infravermelho são vistas nos espectros Raman e vice-versa. No esquema 2 são apresentados o diagrama de Jablonski destes processos.



Esquema 2: Comparação entre os processos de absorção de radiação na região do Infravermelho, Espalhamento de Rayleigh, Espalhamento Raman Stokes e Raman anti-Stokes.

Devido à baixa proporção do espalhamento Raman em relação ao processo Rayleigh, a caracterização molecular em baixas concentrações é dificultada através da instrumentação convencional em solução. No entanto, moléculas adsorvidas em superfícies rugosas de metais como ouro e prata produzem espectros Raman com limites de detecção muito menores que os processos observados em solução⁹⁸.

Isto ocorre porque materiais nanoestruturados como superfícies rugosas são capazes de apresentar ressonância eletrônica ao serem irradiados com radiações eletromagnéticas, devido ao efeito “plasmon” de superfície, que provoca aumento da proporção do espalhamento Raman em relação ao espalhamento Rayleigh para moléculas localizadas entre dois pontos em uma superfície⁹⁹. Esta técnica é chamada de Intensificação de Superfície Raman (SERS – do inglês Surface Enhanced Raman Spectroscopy). Com isso, é possível a caracterização de moléculas presentes em uma superfície através da técnica SERS⁹⁸.

Esta técnica permite a caracterização de moléculas presentes em uma CAA, através da identificação de suas ligações. Frequentemente o uso de CAA é realizado para a funcionalização de superfícies metálicas como eletrodos de ouro para o ancoramento de moléculas, cuja identificação é feita pela caracterização de suas ligações.

1.1.3. Transferência Eletrônica em Camadas Auto-arranjadas

A imobilização de biomoléculas sobre superfícies metálicas funcionalizadas é uma das principais aplicações do uso de CAA para estudos eletroquímicos. A vantagem da funcionalização superficial através de CAA frente a outras técnicas é a alta regularidade da espessura do filme monomolecular, o que garante uniformidade no processo de transferência eletrônica entre as espécies redox à superfície do eletrodo¹⁰⁰. Apesar de executar a função de ancorar a molécula redox sobre a superfície do eletrodo, a CAA constitui uma barreira capaz de dificultar a transferência eletrônica¹⁰¹. Isto ocorre devido à natureza não condutora das cadeias carbônicas, presente nas moléculas que constituem o filme monomolecular da CAA. Com isso, o processo de transferência eletrônica se processa através do tunelamento dos elétrons entre a espécie eletroativa ancorada e a superfície eletródica^{100, 101}. O efeito de tunelamento é caracterizado pela passagem de elétrons através de uma barreira resisitiva, de modo que a probabilidade e ocorrência deste efeito diminuem como função da barreira resistiva. Moléculas lineares possibilitam respostas mais uniformes devido à alta regularidade das monocamadas formadas¹⁰². CAA formadas por moléculas de cadeias carbônicas longas apresentam maior regularidade da resposta de corrente. Isto se deve à maior intensidade das forças laterais de Van der Waals que organizam o filme monomolecular. No entanto, a intensidade das correntes obtidas diminui exponencialmente em função do aumento do número de carbonos das moléculas do filme¹⁰²⁻¹⁰⁵, pois a probabilidade de tunelamento diminui em função da distancia que o elétron precisa ultrapassar^{102, 103}. Nesta condição, voltamogramas com picos mais estreitos e menor diferença entre potenciais de pico são observadas.

O recobrimento de eletrodos com alcanotióis, principalmente de ouro, é de longe o método mais utilizado para a confecção de CAA, pois estes são agentes intermediários para o ancoramento superficial de outras moléculas eletroativas. Diversos estudos têm demonstrado que este comportamento é independente da espécie eletroativa que troca elétrons como eletrodo, de modo que sempre existe uma queda na constante de velocidade da transferência eletrônica a partir do acréscimo do numero de carbonos da cadeia formadora da CAA, onde o grupo eletroativo está ancorado¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

O alinhamento das moléculas na monocamada é tido como um fator determinante do processo de tunelamento dos elétrons entre as espécies eletroativas e a superfície do eletrodo¹⁰⁷. A presença de grupos polares na extremidade da CAA em

contacto com a solução leva ao acúmulo de moléculas de água, diminuindo a regularidade do filme em sua extremidade e alargando os picos voltamétricos obtidos¹⁰⁸. Isto provoca variação no direcionamento do elétron até a superfície do eletrodo, gerando uma distribuição de diferentes distâncias de tunelamento¹⁰⁹.

Para atenuar este problema costuma-se utilizar simultaneamente moléculas contendo os grupos de ancoramento e moléculas com cadeia semelhantes, mas com extremidade de hidrocarbonetos¹¹⁰. Isto faz com que, devido à repulsão, os grupos carregados afastem-se na estrutura da monocamada mista formada por moléculas com extremidades diferentes, porém com cadeias carbônicas semelhantes. Esta estratégia tem como inconveniente a possibilidade de criar uma separação de fases sobre a superfície¹¹¹. Além disto, de acordo com a proporção entre as moléculas que formam a monocamada, pode ocorrer a formação de regiões heterogêneas sobre a superfície, causando problemas de heterogeneidade entre os sítios de ligação das moléculas eletroativas. A técnica de Langmuir-Blodgett tem sido frequentemente utilizada para a formação de filmes monomoleculares em interface ar-solução que, posteriormente, são transferidos para superfícies, formando CAA¹¹².

A utilização de nanopartículas e nanoestruturas tem sido comum na literatura atual, pois se demonstrou que a introdução de um corpo condutor de dimensões nanométricas dentro da camada autoarranjada é capaz de melhorar o processo de transferência eletrônica¹¹²⁻¹¹⁸. Assim, nanotubos de carbono¹¹²⁻¹¹⁸, nanopartículas metálicas, de ouro¹¹⁵, paládio¹¹⁶, platina¹¹⁷ e diversos outros metais têm sido utilizados para esta finalidade.

1.1.3.1. Aplicações em Células Eletroquímicas

A principal aplicação de eletrodos modificados com CAA na área eletroanálise tem sido a construção de sensores electrocatalíticos para a determinação de compostos redox, como exemplo, os biossensores de terceira geração, onde biomoléculas eletroativas executam processos de transferência eletrônica direta sobre o eletrodo através de tunelamento dos elétrons via CAA¹¹⁸⁻¹¹⁹.

Biossensores enzimáticos são os principais dispositivos eletroquímicos que fazem uso de CAA. Apesar de existirem diversos métodos de preparação de biossensores eletroquímicos, o ancoramento de biomoléculas sobre CAA apresenta-se

como um método de melhor precisão, não só devido à regularidade dos filmes formados¹²⁰, como também à inibição de reações de interferentes¹²¹.

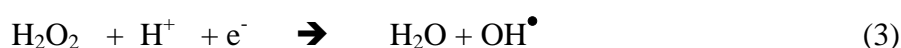
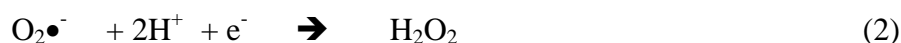
Enzimas como superóxido dismutase¹²²⁻¹²⁴, catalase¹²⁵, glutathiona peroxidase¹²⁶, peroxidase de raiz-forte¹²⁷⁻¹²⁹, tem apresentado boas propriedades de transferência eletrônica direta quando ancoradas em CAA sobre eletrodos metálicos. Biossensores amperométricos fazem uso desta estratégia de imobilização.

Superfícies semicondutoras também apresentam capacidade de formar CAA com regularidade considerável¹³⁰. Biossensores construídos através de transistores de efeito de campo sobre filmes semicondutores têm sido utilizados fabricados a partir do ancoramento de enzimas para a detecção de diversas espécies biológicas¹³⁰⁻¹³². Métodos potenciométricos através de transistores semicondutores também têm sido utilizados através do ancoramento de ácidos nucleicos para detecção de vírus e bactérias¹³²⁻¹³³.

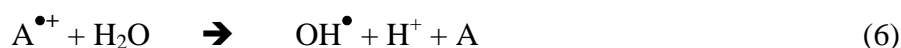
1.1.4. Espécies Reativas de Oxigênio e Radicais Livres

O processo de respiração aeróbica apresenta mecanismos variáveis em função da evolução. O mecanismo molecular de transporte de elétrons é mais complexo nos seres mais evoluídos porém, em todos os seres aeróbicos conhecidos desde bactérias até seres pluricelulares, como animais e plantas, a transferência de elétrons para o oxigênio se reduzir à água na cadeia transportadora de elétrons, ocorre à custa de uma heme-cobre proteína¹³⁴⁻¹³⁶. No ser humano, tal processo ocorre de modo que uma molécula reduzida, o *citocromo c* (Fe^{2+}), gerado no complexo III (*quinol oxidase citocromo c redutase*) da cadeia transportadora de elétrons fornece um elétron à heme-cobre proteína, presente no complexo IV (*citocromo c oxidase*) da cadeia transportadora. O trabalho desta heme-cobre proteína é oxidar o *citocromo c* (Fe^{2+}) a *citocromo c* (Fe^{3+}) e reduzir o O_2 a H_2O , porém a oxidação do *citocromo c* (Fe^{2+}) envolve um elétron e a redução do O_2 envolve quatro elétrons. Deste modo, quatro moléculas de *citocromo c* (Fe^{2+}) serão consumidas para efetuar a redução de uma molécula de O_2 . Cada elétron gerado pela oxidação do *citocromo c* circula pela proteína até o sítio ativo, onde a molécula de O_2 será reduzida por duas moléculas de outros dois citocromos, o *citocromo a* e o *citocromo a₃* e três átomos de cobre. Neste metal, oscilam entre os estados de oxidação +1 e +2, à medida que os elétrons vão se direcionando ao longo do ciclo¹³⁷⁻¹³⁹. Desta forma, os átomos de cobre efetuam papel fundamental no processo de respiração aeróbica.

Cada elétron é fornecido um por vez à molécula de O₂, de modo que são geradas espécies intermediárias conjuntamente a moléculas de água e cada intermediário é produzido indiretamente durante o processo de respiração aeróbica¹⁴⁰⁻¹⁴¹.



Algumas destas espécies possuem elétrons desemparelhados e por isso são chamadas de radicais livres¹⁴². Devido ao elétron desemparelhado, estas espécies apresentam alta reatividade podendo reagir com muitas das moléculas presentes no meio intracelular. Isto ocorre, pois tendem a se reduzir a fim de adquirirem configuração eletrônica mais estável, ou se oxidarem através da doação do elétron desemparelhado gerando, às vezes, espécies radiculares menos reativas, de acordo com a configuração eletrônica das espécies que recebem o elétron. Dentre os radicais livres, o que apresenta maior capacidade oxidativa é o radical hidroxil (OH[•]), que possui potencial de redução de 2,3 V¹⁴³. Os radicais livres podem abstrair um elétron de outra molécula deixando-a com um elétron desemparelhado, tornando-a também um radical livre, apto a capturar de volta o elétron perdido, apresentando características de agente redutor e apto, portanto, a abstrair elétrons de qualquer molécula¹⁴³⁻¹⁴⁶.



Deste modo, a formação de radicais livres gera um processo em cadeia, onde cada radical gerado pode desencadear a formação de vários outros, de modo que uma pequena quantidade de radicais livres é capaz de causar sérios danos celulares¹⁴⁷.

Os radicais livres não são apenas formados como produtos intermediários do processo de respiração aeróbica. O metabolismo de xenobióticos¹⁴⁸⁻¹⁴⁹ e o metabolismo de nucleotídeos¹⁵⁰⁻¹⁵¹, que ocorrem no interior dos lisossomos e peroxissomos, também geram radicais livres, como os íons superóxido (O₂^{•-}), e o peróxido de hidrogênio

(H₂O₂). Mecanismos de sinalização celular do sistema imune executam processos onde a produção de radicais livres serve como moléculas citotóxicas para matar microrganismos invasores e células tumorais¹⁵²⁻¹⁵⁵, além de participarem nos processos de apoptose¹⁵⁶⁻¹⁵⁷.

1.1.4.1. Sistema Antioxidante e Estresse Oxidativo

A condição de superprodução de compostos pró-oxidantes como os RNS e ROS é chamada de Estresse Oxidativo, cujas conseqüências são danos oxidativos a proteínas, em que os alvos principais os grupos tiólicos, os lipídeos, presentes nas membranas celulares, e os ácidos nucléicos, presentes no interior do núcleo celular.

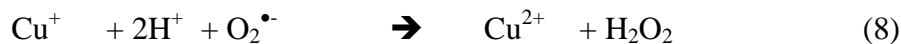
Devido aos seus efeitos deletérios, as células precisam de um sistema de eliminação do excesso de radicais livres formados. Isto é feito à custa do sistema antioxidante¹⁵⁸, conjunto de vias enzimáticas e não enzimáticas de eliminação do excesso de radicais livres do meio intracelular.

A componente não enzimática do sistema antioxidante tem como principais agentes as vitaminas C e E, ácido ascórbico e do tocoferol¹⁵⁹⁻¹⁶², respectivamente. Enquanto o ácido ascórbico, devido a sua hidrofiliçidade, atua no meio intracelular do citosol, o tocoferol, devido ao seu caráter lipofílico, atua nas membranas bilipídicas. As duas vitaminas possuem a capacidade de abstrair o elétron desemparelhado de radicais livres, transformando-se em outros radicais, porém com menor tempo de vida ou ainda, constante cinética de reação muito baixa, inviabilizando o desencadeamento da formação de novos radicais altamente reativos, como o radical hidroxil. Além destas duas vitaminas, existe uma gama de várias outras moléculas capazes de inibir a ação de radicais livres, como os carotenóides¹⁶³ e compostos fenólicos¹⁶⁴⁻¹⁶⁵.

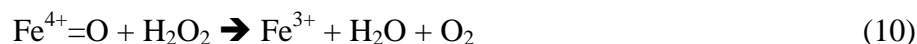
Qualquer molécula capaz de inibir os efeitos de radicais livres é considerada um antioxidante. A glutatona é um peptídeo que apresenta certa atividade antioxidante no meio intracelular, pois é um dos principais agentes envolvidos na regulação do potencial redox no interior das células¹⁶⁶ e, por se apresentar em concentração relativamente alta no interior das células, exerce um grande papel no sistema antioxidante do organismo.

O sistema antioxidante enzimático funciona a partir de três enzimas, sendo a primeira, a *superóxido dismutase* (SOD)¹⁶⁷, uma enzima que catalisa a dismutação dos íons O₂^{•-}, o primeiro radical livre gerado, à H₂O e O₂. Existem vários tipos de SOD's,

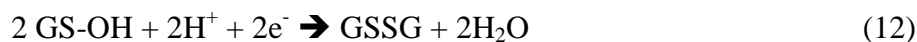
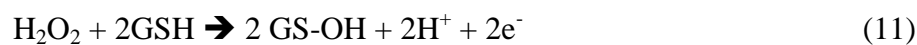
porém, a principal é a CuZnSOD, a qual possui átomos de cobre e zinco no centro redox¹⁶⁸.



O principal meio de eliminação do excesso de peróxido de hidrogênio são as enzimas catalase (Cat)¹⁶⁹ e glutathione peroxidase (GPx)¹⁷⁰. A primeira atua através da ação de grupos heme, que ao reagir com moléculas de peróxido de hidrogênio formam o grupo ferril, ($\text{Fe}^{4+} = \text{O}$). Este estado de oxidação altamente instável do ferro reage oxidando moléculas de peróxido de hidrogênio, de modo que na reação global tem se a dismutação das ROS¹⁶⁹.



A GPx age através da redução de moléculas de peróxido de hidrogênio utilizando a glutathione como molécula doadora de elétrons. Este processo é mediado por grupos selenetos (R-Se^-), presentes no centro redox da enzima, que em seu estado oxidado formam uma ponte de disseleneto (Se-Se)¹⁷⁰. Deste modo, o processo de redução do peróxido de hidrogênio através de moléculas de glutathione (GSH), mediado pela enzima GPx pode ser esquematizadas em etapas, conforme os equilíbrios:



Esta reação também se processa a nível não enzimático, de modo que moléculas de glutathione, presentes no meio intracelular do citosol de diversas células executam a função de “tampão” redox, consumindo qualquer excesso de espécies oxidantes como o peróxido de hidrogênio¹⁷¹. Desta forma, a participação de moléculas contendo grupos tiólicos na inibição de compostos pró-oxidantes é fundamental para a inibição do Estresse Oxidativo nos sistemas biológicos.

1.1.4.2. Biossensores para ROS, RNS e Compostos Antioxidantes

Diversos métodos de detecção de ROS têm sido desenvolvidos para detecção *in vivo* e *in vitro*¹⁷²⁻¹⁷⁵. A detecção de compostos antioxidantes também tem sido utilizada como alvo de pesquisas para diagnóstico do nível de estresse oxidativo em que se encontra determinado sistema biológico¹⁷⁶⁻¹⁷⁸.

A detecção de peróxido de hidrogênio tem sido bastante explorada, devido a sua participação como principal ROS gerado *in vivo*^{179, 180} e sua detecção, em tecidos vivos, efetuada através de métodos de fluorescência e imuno-histoquímicos¹⁸¹⁻¹⁸³. Diversas metodologias eletroanalíticas foram desenvolvidas para a detecção destas espécies, através da imobilização de enzimas como catalase¹⁸¹⁻¹⁸⁷, horseradish peroxidase¹⁸⁸⁻¹⁹⁶ e glutathione peroxidase¹⁹⁷⁻²⁰⁰, porém, devido à complexidade do meio biológico, poucos destes métodos apresentaram robustez suficiente para uma detecção precisa *in vivo*.

A detecção quantitativa do íon superóxido tem sido realizada através de métodos indiretos de geração de espécies fluorescentes²⁰¹ e de uso da técnica de separação de HPLC²⁰². Diversas técnicas de detecção em tecidos biológicos fazem uso da espectrofotometria de fluorescência²⁰²⁻²⁰⁵. Tais métodos apresentaram pouca precisão devido ao grande número de reações e subprodutos envolvidos, além da necessidade de uma instrumentação complexa. Assim, métodos eletroquímicos baseados na utilização de biossensores contendo metaloproteínas, como a enzima superóxido dismutase (SOD), têm sido empregados em diversos sistemas²⁰⁶⁻²¹² contendo nanocompósitos para aumentar a sensibilidade e o limite de detecção desta espécie.

Dentre as espécies reativas de nitrogênio, RNS, o óxido nítrico (NO), o peroxinitrito (ONOO⁻) e o dióxido de nitrogênio (NO₂) tem sido os principais alvos de detecção, devido a participação destas espécies em diversos processos bioquímicos. O óxido nítrico possui função fisiológica na vasodilatação endotelial, porém a sua reação com o íon superóxido gera o peroxinitrito²¹³. Métodos eletroquímicos para detecção de óxido nítrico *in vivo* utilizam eletrodos de platina recobertos com filmes de Nafion para eliminar interferências de compostos aniônicos com o íon ascorbato²¹⁴⁻²¹⁶. O peroxinitrito executa efeitos deletérios através da alteração do estado de oxidação de proteínas hêmicas como a hemoglobina, mioglobina e citocromo c²¹⁷⁻²¹⁸, diminuindo a atividade destas enzimas. Quando em meio suficiente ácido o peroxinitrito protonado decompõe-se em dióxido de nitrogênio e radical hidroxila. A sua detecção eletroquímica

tem sido realizada usando biossensores contendo polímeros condutores e complexos de manganês²¹⁹⁻²²¹.

A principal via de eliminação de ROS e RNS está baseada na ação do tampão redox constituído por espécies tiólicas de baixo peso molecular como a GSH, principal antioxidante presente nas células²²²⁻²²⁵. A detecção da concentração total de GSH e fração entre a forma reduzida e oxidada (GSH/GSSG) nos tecidos é um dos principais diagnósticos da condição do estresse oxidativo²²⁶⁻²³⁰. Métodos para a detecção de GSH têm sido desenvolvidos empregando técnicas eletroquímicas, as quais têm apresentado grande versatilidade frente a outras técnicas²³¹⁻²³⁵. A atividade redox da GSH se baseia na capacidade de formar pontes de dissulfeto e sofrer reações de adição no grupo tiólico, formando adutos como o ácido sulfênico (R-S-OH) e nitrosil tióis (R-S-NO)²³⁶. Com isto, eletrodos modificados com compostos capazes de se adicionar ao grupo tiólico têm sido empregados para a detecção de GSH²³⁷⁻²³⁸.

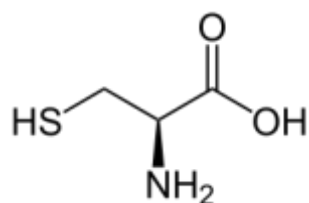
Diversos flavonóides, em especial, a quercetina, têm sido apontados como uma das principais espécies antioxidantes presentes em amostras de plantas consumidas na forma de chás com uso terapêutico, possivelmente devido a sua ação contra as espécies oxidantes geradas em processos inflamatórios^{239, 240}. Usando sistema de detecção eletroquímico ao invés do espectrofotométrico²⁴¹, menores limites de detecção e maior sensibilidade têm sido obtidos na determinação de quercetina em amostras de plasma. Os métodos eletroquímicos têm demonstrado robustez semelhante aos cromatográficos, apesar de que processos de envenenamento de superfície têm sido demonstrados por conta de produtos de oxidação da quercetina sobre eletrodos não modificados²⁴²⁻²⁴⁴. Deste modo, o uso de sistemas electrocatalíticos é sempre uma boa estratégia para a detecção destas espécies. Eletrodos de ouro com CAA contendo citocromo-c, sensíveis ao íon $O_2^{\bullet-}$ foram utilizados para a detecção indireta de quercetina já que esta, em função de seu poder antioxidante, consome este radical livre²⁴³. Estes métodos utilizam a capacidade de oxidação electrocatalítica que moléculas eletroativas, como citocromo-c e ferroceno, adsorvidas sobre o eletrodo exercem sobre flavonóides.

1.1.5. Ação dos Compostos Tiólicos nos Processos do Estresse Oxidativo

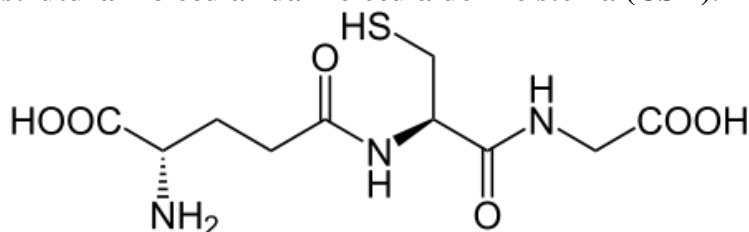
As interações entre compostos contendo grupos tiólicos e espécies oxidantes têm sido estudadas devido a processos de desnaturação de proteínas mediadas pela ação de radicais livres²⁴⁵. A ação do oxigênio sobre grupos tiólicos livres, pode iniciar a formação de íons superóxido e catalisar a iniciação de processos de reação em cadeia²⁴⁶.

Através de diversas técnicas de análise bioquímica de eletroforese em gel demonstrou-se a formação do ácido sulfênico, produto da reação entre CSH e peróxido de hidrogênio²⁴⁷⁻²⁴⁹. A desnaturação de albumina pela formação de ácido sulfênico sobre um resíduo de CSH, exposto na estrutura protéica, foi demonstrada pela ação de ROS, como peróxido de hidrogênio²⁵⁰. Foi demonstrado que a ação de RNS como o peróxido nítrico sobre peptídeos contendo grupos tiólicos expostos, gera radicais COO^\cdot , através de reação com o dióxido de carbono²⁵¹.

Estudos da interação entre íons metálicos oxidantes, como Cu^{2+} e Fe^{3+} , com compostos contendo grupos tiólicos, como a L-cisteína e L-glutationa, geram íons superóxido, pela ação do oxigênio²⁵², através da formação do radical tioil ($-\text{S}^\cdot$) como espécie intermediária. A ação oxidante do íon Cu^{2+} é capaz de esgotar o tampão redox celular, diminuindo a capacidade dos tecidos de eliminarem radicais livres e espécies oxidantes²⁵³.



Esquema 3: Estrutura molecular da molécula de L-cisteína (CSH).



Esquema 4: Estrutura molecular da molécula de L-glutationa (GSH).

1.1.5.1. Equilíbrio de Formação e Quebra de Pontes de Dissulfeto

O equilíbrio entre a formação e quebra de pontes de dissulfeto em sistemas biológicos tem sido estudado desde longa data, devido sua participação em processos de enovelamento protéico²⁵⁴⁻²⁵⁵, sinalização redox²⁵⁶ e estresse oxidativo¹⁷¹.

No enovelamento protéico de um polipeptídeo contendo vários resíduos do aminoácido L-cisteína (CSH), o qual possui o grupo tiol (-SH), formam-se pontes de dissulfeto (-S-S-) ligando diversos pontos distantes de uma mesma cadeia polipeptídica ou cadeias presentes em estruturas terciárias diferentes²⁵⁴. Alterações na estrutura proteica, causada pela formação e quebra de pontes de dissulfeto, funcionam como uma chave liga-desliga para determinados processos catalisados por enzimas que possuem em sua estrutura pontes de dissulfeto e grupos tiólicos²⁵⁷.

Devido à capacidade que ROS e RNS têm de alterar este equilíbrio, diversos estudos tem sido feitos para avaliar os efeitos do estresse oxidativo em processos biológicos controlados por esta reação²⁵⁸⁻²⁵⁹. É comum a ocorrência de reações de deslocamento, onde o átomo de enxofre de uma molécula é substituído por outra sem que ocorra a quebra da ponte de dissulfeto. A ação de CSH e GSH sobre grupos tiólicos livres em proteínas, pode exercer um efeito protetor contra espécies oxidativas²⁵⁹⁻²⁶⁰.

Dentre os principais sistemas do meio biológico, onde o equilíbrio redox, envolvendo pontes de dissulfeto participa, destaca-se a ação da enzima isomerase dissulfeto proteica (PDI – do inglês “proteic disulfide isomerase”). Esta enzima está localizada no retículo endoplasmático das células de diversos seres vivos, sendo responsável pela formação de pontes de dissulfeto e, em condições controladas, pelo enovelamento ideal de determinadas proteínas logo após a sua transcrição gênica²⁶¹. Espécies redox, relacionadas ao estresse oxidativo agem diretamente nesta enzima, tendo como alvo os grupos tiólicos livres²⁶¹.

A formação de pontes de dissulfeto entre resíduos de CSH presentes em diversos pontos do segmento da cadeia polipeptídica promove distorções na estrutura protéica, de maneira a expor outras regiões contendo resíduos com polaridade capaz de aumentar ou diminuir a solvatação do peptídeo, tornando-o mais ou menos solúvel em meio aquoso²⁶². Também, através destas distorções causadas por quebra e formações de pontes de dissulfeto, cavidades catalíticas presentes em enzimas podem ter sua conformação tridimensional alterada resultando em perda de atividade. Isto ocorre com a enzima xantina desidrogenase, que após oxidação em grupos tiólicos livres, perde sua

capacidade de utilizar o NAD como aceptor de elétrons na oxidação de xantina, de modo que, após o processo oxidativo passa a utilizar o oxigênio (O₂) como aceptor, passando a ser denominada xantina oxidase²⁶³.

1.1.5.2. Principais Técnicas Utilizadas na identificação de pontes de Dissulfeto

O estudo das reações de quebra e formação da ponte de dissulfeto envolve a determinação de parâmetros físico-químicos relacionados à cinética da reação, número de etapas envolvidas e número de compostos intermediários produzidos.

Na área proteômica estudos estruturais tem como alvo o equilíbrio das pontes de dissulfeto devido a seu efeito sobre as estruturas terciária e quaternária de enzimas e a manutenção da função fisiológica. Para isso, um dos principais métodos utilizados é a cromatografia de exclusão por tamanho (SEC – do inglês “size exclusion chromatography”)²⁶⁴. O posicionamento dos resíduos de L – cisteína é determinado a partir do sequenciamento do peptídeo através de técnicas de espectrometria de massa de desorção a laser em matriz polimérica (MS-MALDI – do inglês “mass spectrometry on matrix assisted laser desorption/ionisation”)²⁶⁵. Antes do processo são realizadas quebras das pontes de dissulfeto através de clivagens redutivas.

A espectrometria de massa (do inglês “mass spectrometry” – MS), através de seu acoplamento com técnicas cromatográficas, como a cromatografia líquida de alto desempenho (do inglês “high performance liquid chromatography” – HPLC), tem sido utilizada para o identificação de pontes de dissulfeto em peptídeos²⁶⁶⁻²⁶⁷. Diferentes procedimentos de análises têm sido utilizados e, um deles, é o acoplamento da cromatografia HPLC ao espectrômetro de massa, feito através de um sistema de eletrospra. Neste caso, os analitos, devido à natureza pouco volátil e alta quantidade de íons, são após eluição introduzidos no detector através da nebulização da fase móvel cromatográfica²⁶⁸. O principal resultado obtido através de métodos que utilizam a MS é o posicionamento das pontes de dissulfeto na cadeia peptídica. Clivagens redutivas fornecem resultados das seqüências lineares das cadeias peptídicas, enquanto resultados obtidos sem este procedimento fornecem apenas informações sobre os pontos da cadeia ligados através das pontes de dissulfeto.

As técnicas de Raio-X são úteis na determinação do estado de oxidação dos átomos de enxofre em moléculas contendo grupos tiólicos onde através desta

informação é possível avaliar o deslocamento do equilíbrio redox do par R–S–S–R, H⁺/R–SH. Através de métodos utilizando a técnica de espectroscopia de Raio-X de Fotoelétrons (do inglês “x-ray photoelectrons spectroscopy – XPS) é possível a determinação do número de elétrons na camada de valência do átomo de enxofre, através das transições de elétrons de orbitais mais internos até a camada mais externa, informação obtida através da energia dos fótons liberados na transição²⁶⁹. Para a determinação da estrutura molecular vizinha ao redor dos átomos da ponte de dissulfeto tem sido utilizada a técnica de absorção de raio-X próximo a estrutura de borda (do inglês “x-ray absorption near edge structure – XANES)²⁷⁰. Após o processo de transição de elétrons, que são provenientes de camadas internas do átomo, ocorre o processo de relaxação, durante o qual os fótons são emitidos e sofrem espalhamento em um padrão que é dependente das vizinhanças do átomo emissor²⁷⁰. Através do padrão de espalhamento da radiação absorvida por determinado átomo é possível determinar a estrutura molecular de sua vizinhança. Esta técnica envolve o uso radiações de alta potencia, sendo comumente utilizada a radiação síncrotron, gerada em aceleradores de partículas²⁷⁰.

Diversos trabalhos na literatura demonstraram de que o equilíbrio redox envolvendo a formação da ponte de dissulfeto ocorre através de intermediários radiculares, cuja detecção tem sido efetuada pela técnica de espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR - do inglês “electron paramagnetic resonance”) ²⁷¹⁻²⁷³. Nesta técnica, a presença de elétrons desemparelhados, presentes nos radicais livres, é detectada através do desdobramento de energia entre os estados de spin do elétron desemparelhado dentro de um campo magnético. Desta maneira, a formação de radicais tioil (R-S[•]) e do radical ânion dissulfeto (R-S-S^{•-}-R), como intermediários do processo oxidativo de tióis em peptídeos, foram identificados²⁷³.

A Ressonância Magnética nuclear (RMN) tem sido empregada em métodos titulométricos. Através de variações no espectro de RMN de H¹ como função da concentração de hidrogênio, é possível identificar grupos com características ácido-base como, por exemplo, o grupo tiólico²⁷⁴.

Apesar da grande versatilidade das técnicas eletroquímicas, como ferramenta analítica para determinações quantitativas, qualitativas e obtenção de parâmetros cinéticos e termodinâmicos de reações, estas têm sido pouco utilizadas no estudo de reações radiculares e seus mecanismos de transferência eletrônica, principalmente envolvendo a formação de pontes de dissulfeto.

A maior vantagem da aplicação das técnicas voltamétricas no campo biológico reside no fato de que as mesmas muitas vezes permitem simular fielmente a produção de intermediários reativos e/ou produtos de reação que são exatamente os mesmos daqueles provenientes de reações enzimáticas²⁷⁵. Com isto, estas técnicas têm sido empregadas raramente para estudar sistemas *in vitro* e interações químico-biológicas que ocorrem *in vivo*²⁷⁶.

Diante da importância biológica do sistema RSSR/RSH, esta Tese teve como objetivo geral:

- 1- Desenvolver eletrodos de ouro modificados com MPA/CSH e MPA/GSH para mimetizar processos biológicos envolvendo o sistema redox RSSR/RSH e estudar o mecanismo pelo qual espécies oxidantes tais como Cu^{2+} e O_2 , afetam esse sistema;
- 2- Determinar, utilizando técnicas eletroquímicas, o mecanismo redox de formação e quebra de pontes de dissulfeto nestes sensores.

E como *objetivos específicos*:

- 1- Desenvolver metodologias de modificação de eletrodos de ouro com moléculas de L-cisteína e L-glutathiona de modo a manter a eletroatividade do grupo tiólico presente nestas moléculas;
- 2 - Identificar e caracterizar os parâmetros físico-químicos que governam o processo redox R-SH/RSSR nos pares redox confinados sobre a superfície dos eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH;
- 3 - Desenvolver metodologias de análise quantitativa de espécies reativas de oxigênio (ROS), como peróxido de hidrogênio e compostos com atividade antioxidante, como quercetina.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes e Soluções

Soluções aquosas de ácido morfolinoetanossulfônico (MES) $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas utilizando o padrão Sigma-Aldrich (CAS 4432-31-9, Código Sigma M3671). Estas soluções foram neutralizadas com solução de NaOH (Merck CAS 1310-73-2, Código 1.06466.0050) para a preparação do tampão MES $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,2, de modo a obter proporções iguais do ácido e de seu respectivo sal. O tampão fosfato (TF) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2 foi preparado pela dissolução de quantidades apropriadas de Na_2HPO_4 (CAS 7782-85-6, Código Sigma S5011) e NaH_2PO_4 da Sigma-Aldrich (CAS 7558-80-7, Código Sigma S5136) em água deionizada.

As soluções de L-cisteína (CSH) foram preparadas pela dissolução de cloridrato de L-cisteína anidra 98% Sigma-Aldrich (CAS 704804-6, Código Sigma C1276) em tampão MES. A solução de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) foi preparada pela dissolução do padrão do composto líquido, 98% (CAS 107-96-0, Código Sigma M5801) em etanol anidro da Sigma-Aldrich (CAS 64-17-5, Código Sigma 459836).

A solução estoque $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio foi preparada a partir da diluição de solução padrão 30% da MERCK (CAS 7722-80-1, Código Merck 1.07209.0250) em tampão fosfato, pH 7,2. A solução de acetato de amônio foi preparada pela dissolução de quantidade apropriada do respectivo sal, marca QM (CAS 631-61-8, Código QM 12520) em água deionizada.

A soluções de Cu^{2+} $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas através da dissolução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ da Merck (CAS 7758-98-7, Código Merck 1.02790.0250) em solução tampão acetato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2. Outras soluções utilizadas foram preparadas por dissolução de quantidades apropriadas dos respectivos sais, obtidos da Merck, em água ou nos tampões de interesse, MES ou tampão fosfato (TF).

2.2. Célula Eletroquímica

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando-se uma célula eletroquímica constituída de um copo de vidro, com capacidade volumétrica de 20 mL para solução de eletrólito de suporte. Utilizou-se sistema de três eletrodos constituído de:

- **Eletrodo de trabalho:** Eletrodos de ouro modificados com MPA e posteriormente com CSH (Au/MPA/CSH) ou GSH (Au/MPA/GSH);

- **Eletrodo de referência:** Sistema de Ag/AgCl, KCl_(sat);

A construção deste eletrodo foi realizada através da anodização de um fio de prata por eletrólise em solução de HCl 0,1 mol L⁻¹, aplicando-se corrente constante de 1 mA durante 900 segundos. Para a formação da semi-célula utilizada como eletrodo de referência este fio de prata anodizado a cloreto de prata foi inserido em uma ponteira Eppendorf^{MR} selada na ponta com um pedaço de membrana de troca-iônica utilizada para confecção de baterias chumbo-ácida. Este compartimento foi preenchido com solução saturada de KCl saturado, a fim de manter constante o potencial da semi-célula para funcionamento como eletrodo de referência.

- **Eletrodo Auxiliar:** Fio de Platina.

Como soluções de eletrólito de suporte foram utilizadas as soluções de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em diversos valores pH.

2.3. Equipamentos

Todas as soluções aquosas 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 e amperométricas foram efetuadas um potenciostato μ AutoLab type III, interfaceado a um microcomputador utilizando-se o software GPES.

Os espectros Raman de Superfície foram obtidos através de um sistema micro-Raman no equipamento Renishaw Raman Ínvia Confocal Imaging Microprobe System 3000, contendo laser de He/Ne de 633 nm, acoplado a um microscópio óptico com resolução espacial de 1,0 μ m, que permite selecionar a região de interesse da amostra para a obtenção dos espectros Raman de superfície. As medidas foram realizadas no

Laboratório de Espectroscopia Molecular (LEM), sob a orientação da profa. Dra. Márcia Laudelina Arruda Temperini, com o auxílio do Dr. Tércio Paulo.

2.4. Limpeza da Superfície de Eletrodo de Ouro

O eletrodo foi polido com suspensões de alumina de 1,0 e 0,3 μm sobre uma superfície de feltro da Arotec. Em seguida, foi submetido a tratamento químico por 5 minutos de imersão da superfície metálica em solução piranha ($\text{H}_2\text{SO}_{4(c)}$ e H_2O_2 30%, 1:1 v/v). Na seqüência, obtiveram-se voltamogramas cíclicos (10 ciclos) em solução 0,1 mol L^{-1} de H_2SO_4 , no intervalo de potencial de $-0,2$ V a $+1,6$ V sob a velocidade de 0,1 V s^{-1} .

2.5. Formação da Camada Auto-arranjada de MPA sobre o Eletrodo de Ouro

A otimização das condições de formação da CAA de MPA sobre o eletrodo de ouro foi conduzida empregando estudos de desorção eletroquímica do MPA da superfície do eletrodo. O eletrodo de ouro previamente limpo foi imerso em soluções etanólicas de MPA, de diferentes concentrações, durante 1 hora. Na seqüência, obtiveram-se voltamogramas cíclicos em solução de KOH 0,5 mol L^{-1} na janela de potencial de $-0,3 \leq E_{\text{apl}} \leq -1,3$ V a velocidade de 0,01 V s^{-1} . A quantidade adsorvida de MPA sobre a superfície do eletrodo foi obtida a partir da área dos picos de desorção registrados nos voltamogramas obtidos.

Nos demais experimentos a formação da CAA de MPA sobre o eletrodo de ouro foi conduzida utilizando-se solução etanólica de MPA 10 mmol L^{-1} e tempo de uma hora. Em seguida o eletrodo foi lavado com água destilada.

2.6. Imobilização de CSH e GSH sobre o eletrodo de ouro recoberto com MPA

Estudos preliminares foram realizados através da imersão do eletrodo de ouro recoberto com MPA em uma solução de 50 mmol L^{-1} de CSH em tampão MES 0,1 mol L^{-1} pH 6,2 durante 10 minutos para adsorção de moléculas de CSH sobre os grupos carboxilatos presentes nas moléculas de MPA, constituintes da CAA sobre o eletrodo.

Otimização da concentração de CSH foi realizada através da imersão do eletrodo recoberto com MPA em soluções de CSH de diferentes concentrações. O objetivo deste

estudo foi obter a concentração de CSH necessária para saturar os sítios de ligação presentes nas moléculas de MPA durante os 10 minutos de imersão do eletrodo de Au/MPA na solução de CSH. Após este estudo, selecionou-se a concentração de 20 mmol L⁻¹ de CSH em solução de tampão MES 0,1 mol L⁻¹ pH 6,2 para a confecção do eletrodo de Au/MPA/CSH e utilização nos demais experimentos. O mesmo procedimento foi realizado para se obter a concentração de GSH necessária para saturar o eletrodo de Au/MPA. A concentração de GSH escolhida foi 20 mmol L⁻¹ em solução de tampão MES 0,1 mol L⁻¹ pH 6,2, com tempo de imersão de 10 minutos. Em ambos os casos os eletrodos modificados, Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH, foram lavados solução tampão MES 0,1 mol L⁻¹ pH 6,2 antes de realizar a etapa de ativação.

2.7. Ativação Eletroquímica dos Eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH

Os eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH foram, cada um ao seu tempo, transferidos para uma célula eletroquímica contendo solução de acetato de amônio 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2 como eletrólito suporte. Após imersão dos eletrodos de referência e auxiliar, foram efetuados 100 voltamogramas cíclicos no intervalo de potencial de $-0,2 \leq E_{\text{apl}} \leq +0,3$ V a velocidade de 0,01 V s⁻¹.

2.8. Titulação Voltamétrica dos Grupos com Característica Acido-Base na Superfície do Eletrodo de Au/MPA e Au/MPA/CSH

A titulação voltamétrica dos grupos com característica ácido-base presentes na superfície dos eletrodos de Au/MPA e Au/MPA/CSH foi realizada através da obtenção de voltamogramas cíclicos em solução de ferricianeto de potássio ([K₃Fe(CN)₆]) 10 mmol L⁻¹, utilizando como eletrólito de suporte tampões fosfato em diferentes valores de pH, de 2 a 10. A partir dos voltamogramas obtidos foram construídas curvas de I_{p,c} versus pH da solução de eletrólito.

2.9. Tratamento Superficial Eletroquímico do Eletrodo de Ouro para a Obtenção dos Espectros Raman de Superfície

Para a obtenção dos Espectros Raman de Superfície foi necessário realizar, após polimento da superfície de ouro, um tratamento eletroquímico para a formação de nanoestruturas superficiais, necessárias para a obtenção do efeito SERS. Este procedimento constituiu-se da realização de 50 varreduras de voltametria cíclica em

solução de cloreto de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em potenciais de $0,0 \leq E_{\text{apl}} \leq + 1,0 \text{ V}$ a velocidade de $0,1 \text{ V s}^{-1}$.

2.10. Obtenção dos Espectros Raman de Superfície - SERS dos Eletrodos Modificados com MPA, Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH.

Os espectros Raman de Superfície foram obtidos após a seleção microscópica das regiões superficiais dos eletrodos de ouro que apresentaram boa homogeneidade após a realização do tratamento eletroquímico descrito no item anterior. Devido ao acréscimo da área superficial do eletrodo de ouro, por conta do processo de formação de nanoestrutura, a modificação com MPA foi realizada através da imersão em solução etanólica 25 mmol L^{-1} deste composto, durante 24 horas. Para a incorporação de CSH e GSH utilizou-se tempo de 2 horas de imersão em soluções 25 mmol L^{-1} de CSH e GSH em tampão MES $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,2; sob agitação. Para a ativação eletroquímica utilizou-se procedimento semelhante ao descrito no item 2.7, porém realizando-se 200 ciclos volamétricos em solução de acetato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 na faixa de potencial de $- 0,2 \leq E_{\text{apl}} \leq + 0,3 \text{ V}$ a velocidade de $0,01 \text{ V s}^{-1}$.

As aquisições espectrais foram realizadas através da exposição da região de interesse a um laser de He-Ne ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) com uma potência de 8 mW e resolução de 2 cm^{-1} durante 10 s de exposição. Tres aquisições foram feitas para cada ponto utilizando-se $0,5\%$ da radiação proveniente do laser.

2.11. Redução Eletrocatalítica de Peróxido de Hidrogênio sobre os eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH

Para a avaliação do efeito do par redox, presente nos eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH, na redução eletrocatalítica do peróxido de hidrogênio efetuaram-se voltamogramas cíclicos em célula eletroquímica contendo 10 mL solução de H_2O_2 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2; utilizando cada um dos eletrodos modificados como eletrodo de trabalho. O registro dos voltamogramas cíclicos foi realizado em velocidades de varredura de $0,01$ a $0,5 \text{ V s}^{-1}$ e as correntes faradáicas resultantes do processo eletrocatalítico foram obtidas em potencial de $0,0 \text{ V}$.

2.12. Construção das Curvas Analíticas Amperométricas para Determinação de Peróxido de Hidrogênio utilizando-se os Eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH

A uma célula de vidro com capacidade de 20 mL foram adicionados 10 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2, mantendo-se a solução sob agitação. Aplicou-se $-0,1 \text{ V}$ ao eletrodo de trabalho e, após estabilização da corrente inicial adicionou-se, a cada 10 segundos, alíquotas de $5 \mu\text{L}$ de solução de peróxido de hidrogênio $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ durante 15 minutos.

2.13. Imobilização de íons de Cobre sobre os Eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH

Para avaliar a eventual adsorção de íons Cu^{2+} sobre os eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH, estes foram imersos, por 5,0 minutos, em solução $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de Cu^{2+} , preparada em tampão acetato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2; sob agitação.

2.14. Deslocamento do Equilíbrio Redox dos Eletrodos de Ouro Modificados com Au/MPA/CSH por Moléculas de Oxigênio

O efeito do oxigênio sobre deslocamento dos equilíbrios redox, CSSC/CSH ou GSSG/GSH foi avaliado. Para tanto, O_2 foi borbulhado na célula contendo 20 mL de solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato pH 7,2; a 25° e voltamogramas cíclicos, à $0,1 \text{ V s}^{-1}$, foram obtidos no intervalo de potenciais de $-0,2 \leq E_{\text{apl}} \leq +0,3 \text{ V}$ após cada tempo de purga do gás sobre a solução de eletrólito. Estudos cinéticos foram realizados através do registro de voltamogramas em diferentes velocidades de varredura. A eliminação do gás O_2 da solução de eletrólito de suporte da célula eletroquímica foi realizada através do borbulhamento de gás nitrogênio (N_2).

2.15. Determinação de Quercetina através do Eletrodo de Au/MPA/CSH

Desenvolveu-se um método para determinação de quercetina usando voltametria cíclica e o eletrodo de Au/MPA/CSH. A construção de curva analítica foi realizada através da correlação entre os valores de corrente de pico anódica versus concentração de quercetina presente na solução de eletrólito de suporte. A concentração de quercetina na solução de eletrólito da célula eletroquímica foi controlada através de adições de

solução padrão 3,75 mmol L⁻¹ de quercetina. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos antes e depois de cada adição de 5,0 µL da solução padrão de quercetina à célula eletroquímica contendo 20 mL de solução de eletrólito suporte saturada em O₂. A varredura de potencial foi realizada na faixa de - 0,2 ≤ E_{apl} ≤ + 0,3 V a velocidade de 0,01 V s⁻¹.

2.16. Equações utilizadas para o Cálculo dos Parâmetros Termodinâmicos e Cinéticos

O cálculo do recobrimento de MPA sobre o eletrodo de ouro foi determinado com base na carga correspondente a integração dos picos voltamétricos de dessorção em solução de 0,1 KOH mol L⁻¹:

$$Q = \left(\int_{\text{pico}} I(E) dE \right) / v \quad (13)$$

Onde:

Q: carga do pico (C);

$\int_{\text{pico}} I(E) dE$: área do pico (C);

v: velocidade de varredura (V s⁻¹).

$$\Gamma_{\text{MPA}} = Q / nFA \quad (14)$$

Onde:

n: número de elétrons = 1

F: constante de Faraday (F = 96485 C)

A: área do eletrodo (cm²) = 0,071 cm².

Os processos de formação de monocamadas foram tratados com base nos modelos de isotermas de Langmuir e Frumkin. O modelo de Langmuir aplica-se à situação onde as espécies adsorvidas apresentam pouca interação entre si. A equação considerada para este modelo foi:

$$K[C] = \Gamma / (\Gamma_m - \Gamma) \quad (15)$$

Onde:

K: constante;

[C]: atividade da espécie adsorvida (utilizou-se concentração molar mol L⁻¹);

Γ : recobrimento superficial calculado (mol cm^{-2})

Γ_m : recobrimento de saturação (mol cm^{-2}).

A linearização desta equação produz a equação:

$$\Gamma^{-1} = (\Gamma_m K)^{-1} [C]^{-1} + \Gamma_m^{-1} \quad (16)$$

No modelo de Frumkin a equação é acrescida de um fator que considera as interações entre as espécies adsorvidas:

$$K[C] = [\Gamma / (\Gamma_m - \Gamma)] \exp(-2\beta\Gamma) \quad (17)$$

Onde:

β : coeficiente associado à interação entre espécies adjacentes.

A linearização desta equação produz a equação:

$$\ln \{ ((\Gamma_m - \Gamma)[C] / \Gamma) \} = \ln K - 2\beta\Gamma \quad (18)$$

O recobrimento dos eletrodos de Au/MPA com moléculas de CSH e GSH foi obtido através das equações:

$$I_{p,c} = \alpha (F^2 A / 2,718 RT) v \Gamma_0 \quad (19)$$

$$I_{p,a} = (1-\alpha) (F^2 A / 2,718 RT) v \Gamma_0 \quad (20)$$

Onde:

$I_{p,c}$: corrente de pico catódica (A);

$I_{p,a}$: corrente de pico anódica (A);

α : coeficiente de transferência eletrônica do processo de redução;

$1-\alpha$: coeficiente de transferência eletrônica do processo de oxidação;

R: constantes dos gases ideais ($R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$);

T: temperatura (K);

Γ_0 : recobrimento do eletrodo com a espécie eletroativa (mol cm^{-2});

Os valores de α e Γ foram obtidos a partir das inclinações as curvas de I_p versus v , de acordo com as equações:

$$\Delta I_{p,c} / \Delta v = \alpha (F^2 A / 2,718 RT) \Gamma_0 \quad (21)$$

$$\Delta I_{p,a} / \Delta v = (1-\alpha) (F^2 A / 2,718 RT) \Gamma_0 \quad (22)$$

Conforme ao constatado na sessão 3.6, o recobrimento superficial obtido através das equações (19) e (20), (21) e (22) se refere a moléculas contendo grupos tiólicos desprotonados, pois é sob esta forma que o processo redox é iniciado. Assim, a quantidade total de moléculas de CSH e GSH presente na superfície dos eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH foi calculada com base no equilíbrio de desprotonação do grupo tiólico em ambas as moléculas:



$$K_a(-\text{SH}) = [\text{CS}^-][\text{H}^+] / [\text{CSH}] \rightarrow [\text{CSH}] = [\text{CS}^-][\text{H}^+] / K_a$$

$$\Gamma_{\text{CSH}} = \Gamma_0(\text{CSH}) [\text{H}^+] / K_a(-\text{SH}) \quad (24)$$



$$K_a(-\text{SH}) = [\text{GS}^-][\text{H}^+] / [\text{GSH}] \rightarrow [\text{GSH}] = [\text{GS}^-][\text{H}^+] / K_a \quad (26)$$

$$\Gamma_{\text{GSH}} = \Gamma_0(\text{GSH}) [\text{H}^+] / K_a(-\text{SH}) \quad (27)$$

A determinação do número de elétrons e do coeficiente de transferência eletrônica foi obtida através das respectivas equações:

$$E_{p,c} - E_{p/2,c} = 0,062 / \alpha n \quad (28)$$

$$E_{p,a} - E_{p/,c} = 0,062 / (1-\alpha)n \quad (29)$$

Onde:

$E_{p,c}$: potencial de pico catódico (V);

$E_{p,a}$: potencial de pico anódico (V);

$E_{p/2,c}$: potencial correspondente a metade da corrente de pico catódica (V);

$E_{p/2,a}$: potencial correspondente a metade da corrente de pico anódica (V).

O número de elétrons e prótons acoplados ao processo de transferência eletrônica foi obtido usando a relação entre prótons e elétrons, conforme as equações:

$$\Delta E_{p,a}/\Delta pH = 0,059 (n(H) / n) \quad (30)$$

$$\Delta E_{p,c}/\Delta pH = 0,059 (n(H) / n) \quad (31)$$

Onde:

$\Delta E_{p,a}/\Delta pH$: inclinação da curva de $E_{p,a}$ versus pH (V);

$\Delta E_{p,c}/\Delta pH$: inclinação da curva de $E_{p,c}$ versus pH (V);

$n(H)$: número de prótons que acompanham o processo de transferência eletrônica;

n : número de elétrons.

A determinação das constantes de velocidade do processo de transferência eletrônica foi realizada usando as equações:

$$E_{p,c} = E^{0'} + (RT/\alpha F) \ln [(RT/\alpha F)(k_{s,b}/v)] \quad (32)$$

$$E_{p,a} = E^{0'} - [RT/((1-\alpha)F)] \ln [(RT/((1-\alpha)F))(k_{s,f}/v)] \quad (33)$$

Onde:

$E^{0'}$: potencial formal do processo redox;

$k_{s,b}$: constante de velocidade de transferência eletrônica do processo reverso (s^{-1});

$k_{s,f}$: constante de velocidade de transferência eletrônica do processo direto (s^{-1}).

A partir dos voltamogramas obtidos em condições onde $\ln v = 0$, as equações (32) e (33) se reduzem a:

$$E_{p,c} = E^{0'} + (RT/\alpha F) \ln(RT/\alpha F) + (RT/\alpha F) \ln k_{s,b} \quad (34)$$

$$E_{p,a} = E^{0'} - [RT/((1-\alpha)F)] \ln[RT/((1-\alpha)F)] - [RT/((1-\alpha)F)] \ln k_{s,f} \quad (35)$$

3. Resultados e Discussão

3.1. Otimização das Condições de Formação da Camada Auto-Arranjada de MPA sobre a Superfície do Eletrodo de Ouro

A Figura 1 apresenta o voltamograma característico de um eletrodo de ouro previamente limpo, cujo perfil voltamétrico indica a ausência de material adsorvido à superfície. Esta situação é indispensável para a formação da CAA sobre sua superfície.

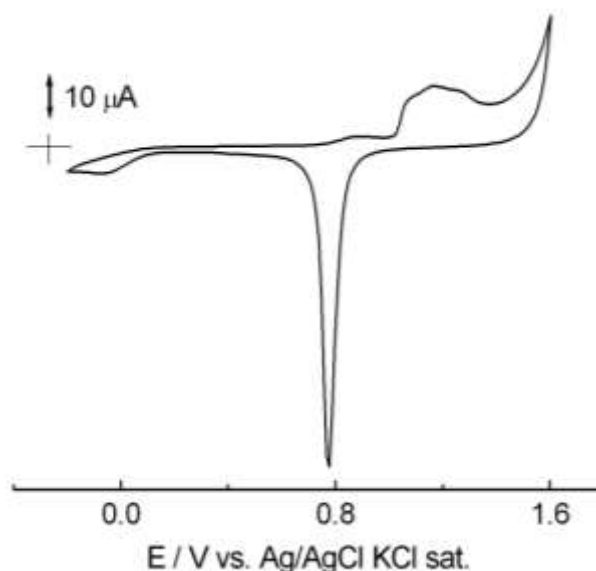
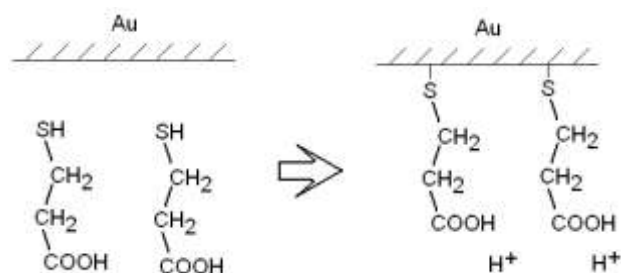


Figura 1: Voltamograma Cíclico obtido em H_2SO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ usando o eletrodo de ouro previamente polido em suspensão de alumina $0,1 \mu\text{m}$ após tratamento com solução piranha. $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_l = +1,6 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$; $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

O perfil voltamétrico apresentado na Figura 1 mostra processos oxidativos resultantes da oxidação de átomos de ouro da superfície do eletrodo e redução destes mesmos átomos durante a varredura reversa. A janela de potenciais até o valor limite de $0,8 \text{ V}$ corresponde ao intervalo de polarização, que é a janela de potenciais de trabalho, no qual não ocorrem processos faradáicos resultantes do material constituinte do eletrodo. A ausência de processos faradáicos nesta região indica que a superfície não possui espécies adsorvidas, que poderiam atrapalhar a formação da CAA.

A formação da CAA de MPA sobre a superfície do eletrodo de ouro foi utilizada com o objetivo de proteger a superfície metálica do eletrodo, para impedir o inconveniente dos grupos tiólicos, presentes nas moléculas de CSH, ligarem-se diretamente a superfície do eletrodo, impossibilitando que estes estivessem disponíveis para reação eletródica.

O processo de formação das CAA de MPA ocorre conforme o esquema 5:



Esquema 5: Adsorção das moléculas de MPA sobre a superfície metálica do eletrodo através da ligação do átomo de enxofre sobre átomos de ouro.

Diversos trabalhos na literatura descrevem a formação de CAA sobre eletrodos de ouro usando tempos muito elevados de imersão em solução de MPA, de modo a possibilitar a auto-organização desta monocamada. A fim de reduzir o tempo demasiado de preparação dos eletrodos modificados, sem diminuir a regularidade da auto-organização da CAA, foram realizados experimentos utilizando diferentes concentrações de MPA, para a obtenção de um valor ótimo deste parâmetro a tempo mais curto. Realizou-se a formação de CAA de MPA sobre a superfície do eletrodo de ouro usando-se diferentes concentrações de MPA, mas mantendo-se o tempo de imersão em 1 hora. Na figura 2 são apresentados os voltamogramas obtidos.

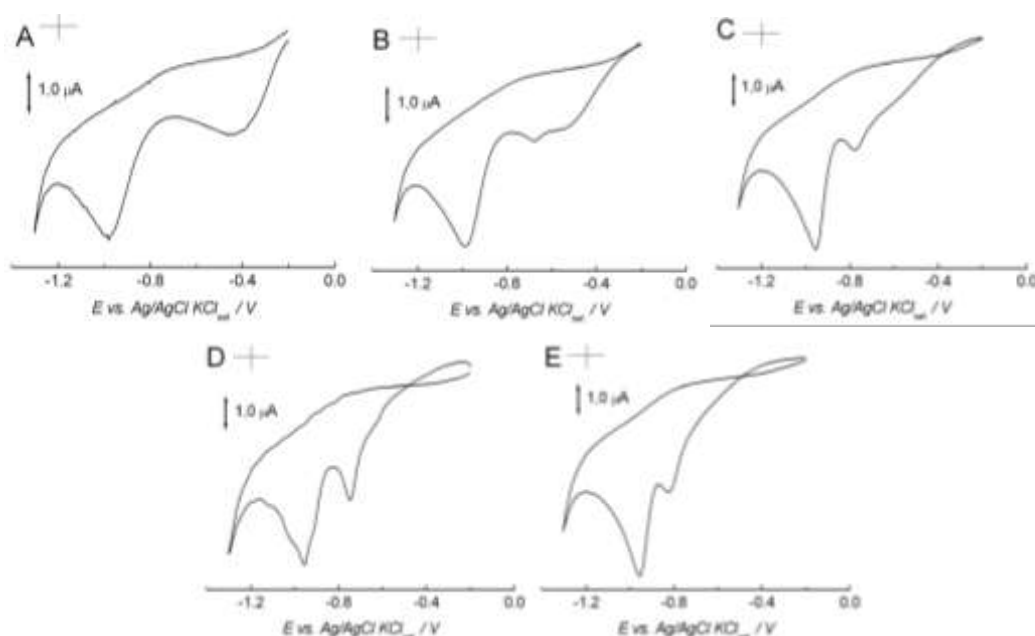
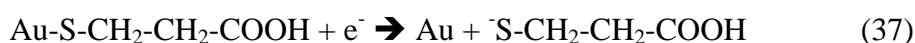
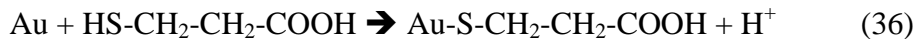


Figura 2: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KOH 0,5 mol L⁻¹ após a adsorção de MPA sobre a superfície de um eletrodo de ouro. [MPA] = 1 (A); 2 (B), 5(C), 10 (D) e 25 (E) mmol L⁻¹ E_i = - 0,2 V; E_λ = - 1,3 V e E_f = - 0,2 V; ν = 0,05 V s⁻¹.

Na figura 2 são observados processos faradáicos catódicos, resultantes da desorção das moléculas de MPA adsorvidas sobre a superfície do eletrodo. O processo que possui potencial de pico em torno de -1,0 V apresenta aumento de corrente de pico para maiores valores de concentração de MPA. Isto indica que ocorre maior adsorção para maiores concentrações de MPA. Para menores concentrações são observados mais de um processo catódico, que à medida que a concentração de MPA aumenta, os potenciais de pico observados tendem a se aproximar. Os processos de desorção que ocorreram em menor potencial de pico se referem às interações mais fracas de moléculas de MPA sobre a superfície, provavelmente alojadas em defeitos da CAA. Isto indica que para menores concentrações de MPA e tempos de adsorção longos, da ordem de uma hora, a ocorrência de defeitos na CAA é mais frequente. Os resultados obtidos indicam que para o tempo de 1 hora a saturação da superfície metálica é atingida com o aumento de concentração de MPA. Estudos do recobrimento com tempos diferentes não foram realizados, pois o objetivo foi o recobrimento com tempo relativamente curto.

Os processos de adsorção e desorção de MPA sobre a superfície de ouro podem ser descritos por meio das reações (36) e (37) respectivamente:



Os picos catódicos observados na Figura 2 se devem, de fato, à desorção de MPA, pois na varredura reversa não é observado nenhum sinal de reoxidação, indicando que as moléculas desorvidas não são novamente adsorvidas à superfície do eletrodo. Isto porque em meio fortemente alcalino, KOH 0,5 mol L⁻¹, do eletrólito de suporte, o MPA, após sofrer o processo de desorção, é mantido sobre a forma de tiolato, que carregado negativamente apresenta alto grau de solvatação e, conseqüentemente, dificuldade em se adsorver de maneira específica a superfície do eletrodo.

O cálculo do excesso superficial para cada concentração de MPA foi realizado através da integração dos picos apresentados nos voltamogramas da Figura 2, conforme as equações 13 e 14. Na Figura 3 são plotados os valores dos excessos superficiais calculados para cada concentração de MPA.

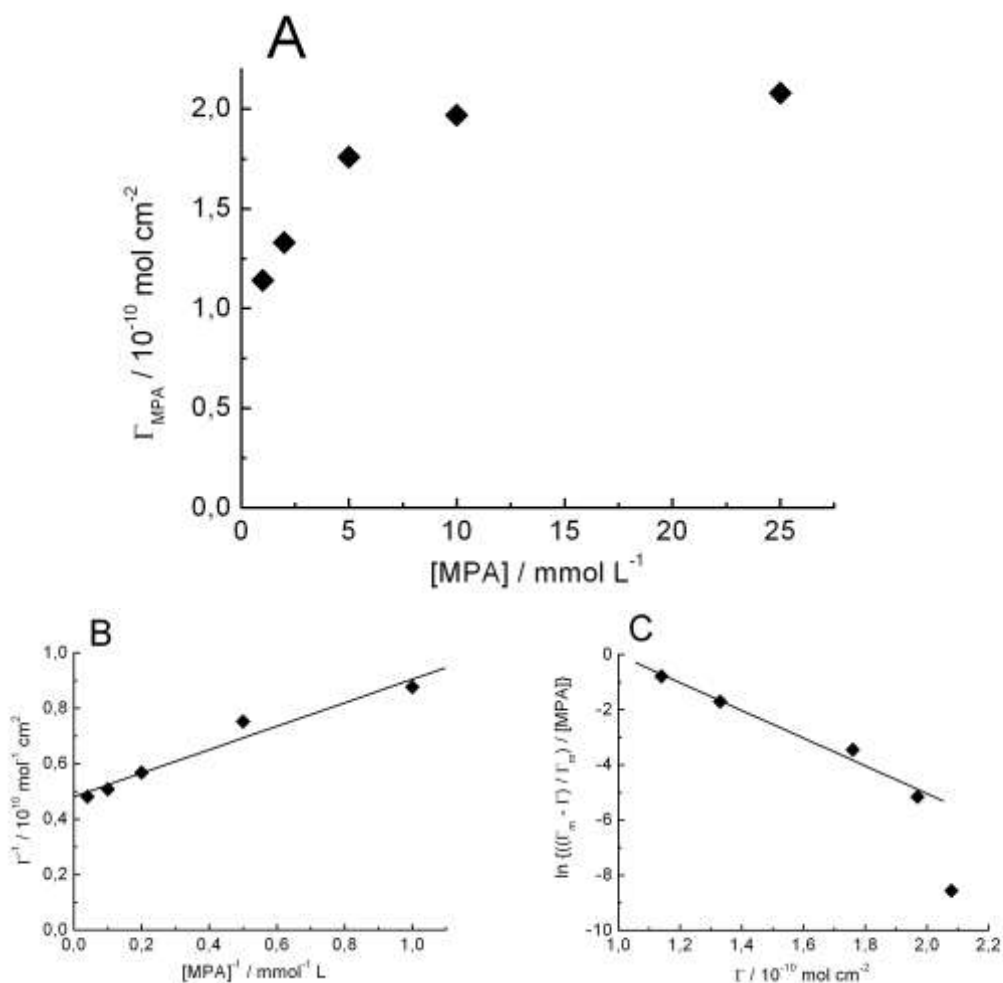


Figura 3: (A) Curva de recobrimento superficial de MPA sobre o eletrodo de ouro versus concentração de MPA utilizada para a adsorção. (B) Isoterma de Langmuir e (C) Isoterma de Frumkin.

O recobrimento superficial praticamente não aumenta para concentrações de MPA maiores que 10 mmol L^{-1} indicando saturação da superfície de ouro e obtenção da quantidade máxima de moléculas de MPA por cm^2 que caberiam em uma monocamada sobre a superfície.

A partir da Figura 3B é possível observar que a adsorção de MPA sobre o eletrodo de ouro ocorre através da formação de uma monocamada, devido à aproximação linear obtida para o modelo de Langmuir. Apesar da existência de forças de atração de Van der Waals entre as cadeias carbônicas, estas não têm intensidade suficiente para ultrapassar as forças de repulsão entre os grupos carboxila desprotonados na extremidade das moléculas de MPA, devido ao pequeno número de átomos de carbono na cadeia. Para concentrações mais baixas de MPA, o modelo de Frumkin apresenta certa correlação, mas esta diminui à medida que a concentração aumenta. Isto

se deve ao aumento da repulsão entre moléculas mais próximas, que provavelmente produz uma diferença significativa entre as energias dos sítios de ligação a serem preenchidos e a contabilização do processo de dessolvatação dos íons adsorvidos.

Na Figura 4 são apresentados voltamogramas obtidos em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 antes, após a formação de CAA de MPA e após formação da nova monocamada de MPA/CSH.

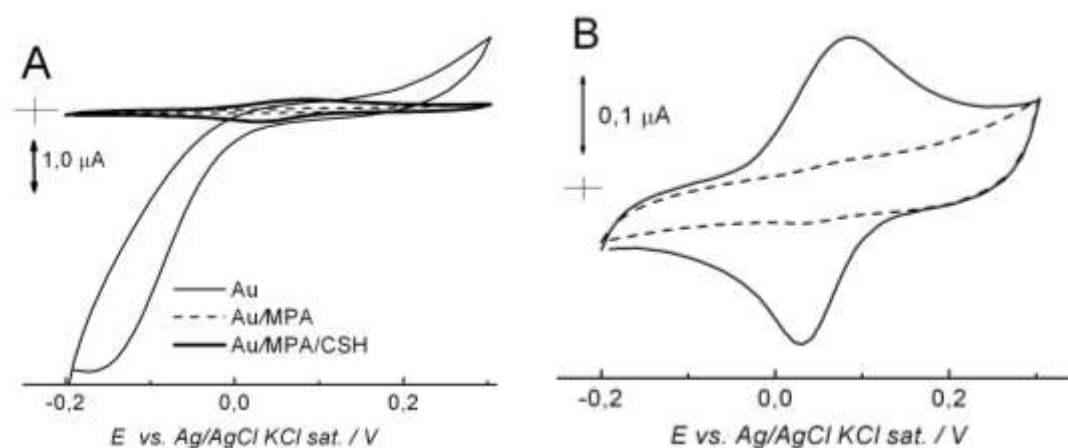


Figura 4: Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de ouro limpo, recoberto com MPA (Au/MPA) e recoberto com MPA e CSH (Au/MPA/CSH) em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 contendo O_2 dissolvido. $E_i = - 0,2 \text{ V}$; $E_f = + 0,3 \text{ V}$ e $E_r = - 0,2 \text{ V}$; $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

Como demonstrado na Figura 4 o processo de redução de O_2 é suprimido após a formação da CAA sobre o eletrodo de ouro, pois esta funciona como uma barreira para esta molécula, que é eletroativa sobre a superfície de ouro descoberta, na janela de potencial de trabalho.

Na figura 5 são apresentados voltamogramas obtidos com eletrodo de ouro recoberto com CSH diretamente, sem o recobrimento superficial prévio com moléculas de MPA.

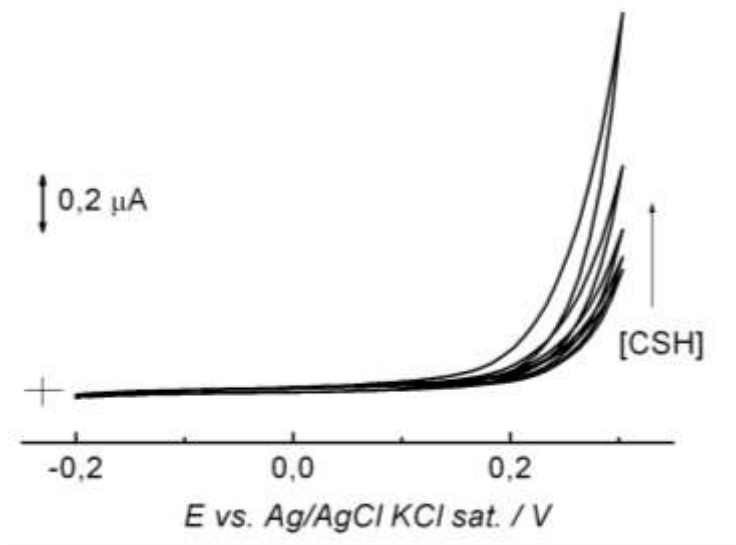


Figura 5: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de ouro após imersão em diferentes concentrações de CSH por 1 hora. Eletrólito suporte: solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2. $E_i = - 0,2 \text{ V}$; $E_l = + 0,3 \text{ V}$ e $E_f = - 0,2 \text{ V}$; $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$. $[\text{CSH}] = 2, 5; 10; 15 \text{ e } 20 \text{ mmol L}^{-1}$.

Os dados apresentados na Figura 5 mostram que não ocorre a adsorção direta de CSH sobre o eletrodo de ouro, uma vez que nenhum par redox pode ser detectado. Como discutido anteriormente, os grupos tiol perdem sua eletroatividade ao se ligar sobre a superfície metálica de ouro.

3.2. Ativação Eletroquímica dos Eletrodos Modificados de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH

Os primeiros ciclos voltamétricos obtidos com os eletrodos Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH, logo após o ancoramento das moléculas de CSH e GSH na superfície dos eletrodos de ouro recobertos com MPA, mostraram processos faradáicos correspondentes ao par redox R-SS-R/R-SH com intensidade muito baixa.

Por este motivo, realizaram-se os processos de ativação eletroquímica, conforme descrito no item 2.7. Para o eletrodo de Au/MPA/CSH os resultados são apresentados na Figura 6.

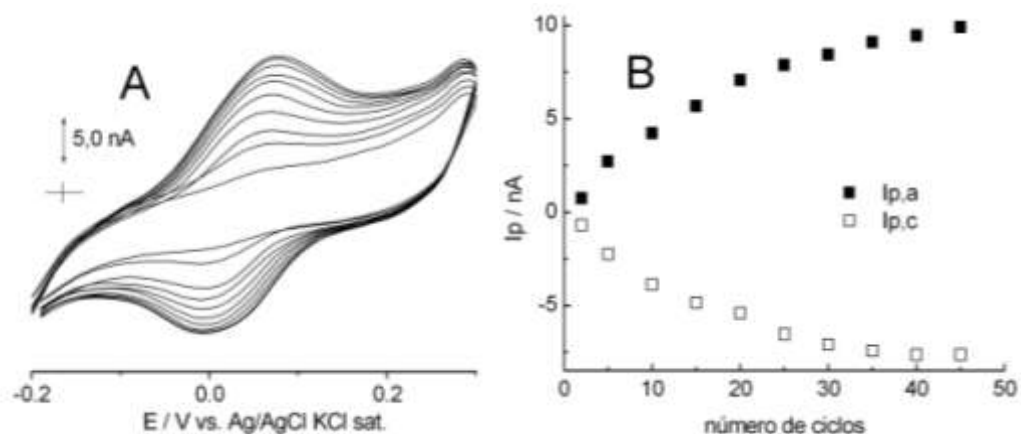
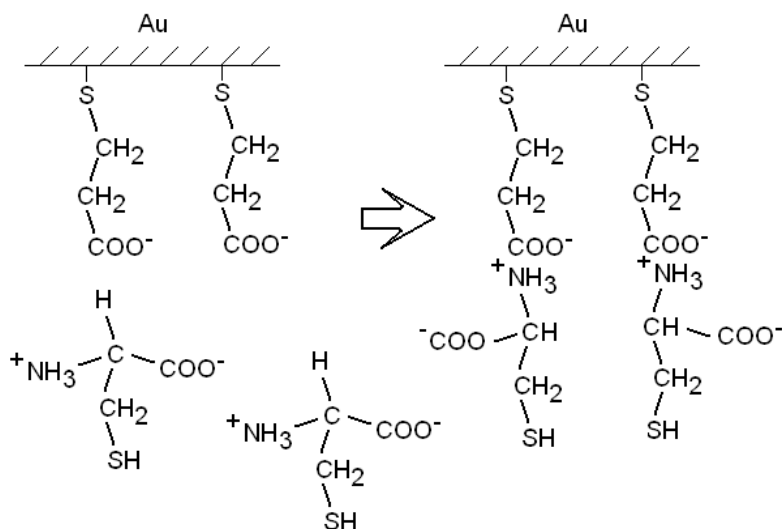


Figura 6: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo Au/MPA/CSH em solução tampão acetato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 na ausência de O_2 . Processo de Ativação do Eletrodo e (B) Corrente de pico versus número de ciclos. $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_f = +0,3 \text{ V}$ e $E_r = -0,2 \text{ V}$; $v = 0,01 \text{ V s}^{-1}$.

Na Figura 6 observa-se que as correntes de pico aumentam à medida que ciclos voltamétricos sucessivos são realizados em solução de eletrólito de suporte. Este processo faradáico não foi observado para eletrodo de ouro modificado apenas com MPA. O esquema 6 apresenta o mecanismo proposto para o ancoramento das moléculas de CSH sobre a CAA de MPA.



Esquema 6: Ancoramento das moléculas de CSH sobre a CAA de MPA presente na superfície do eletrodo de ouro.

O processo de ancoramento descrito no item 2.6 favorece a formação de um par iônico, pois nas condições de pH em que o procedimento de ancoramento foi realizado (tampão MES pH 6,2), os agrupamentos carboxila, presentes nas moléculas de MPA estão carregados negativamente e os grupos amino presentes em moléculas de CSH ou

GSH, carregados positivamente. O grupo carboxila presente no MPA se encontra desprotonado e com carga negativa em valores de pH acima de 5,49, enquanto o grupo amino da molécula de CSH se apresenta protonado e com carga positiva para valores de pH abaixo de 10,78. Para o grupo amino da molécula de GSH a situação é a mesma, porém os grupos estarão protonados para valores de pH abaixo de 9,65.

A ausência de espécies eletroativas em solução indica que o processo redox observado é resultante de moléculas adsorvidas sobre o eletrodo. O valor da diferença entre os potenciais de pico foi maior que 0,059 V, pois o processo redox observado é quase-reversível. A ausência de processos faradáicos para o eletrodo recoberto com MPA indica que as moléculas de CSH adsorvidas sobre o eletrodo são responsáveis pelo par redox observado.

O aumento gradativo das correntes de pico, observado na Figura 6A, demonstra que possivelmente, o processo de ancoramento ocorra por interação eletrostática, conforme o esquema 6. No entanto, posteriormente, após a aplicação de potencial, é passível a ocorrência de reações de eliminação de moléculas de água e formação de uma ligação amídica, com caráter covalente. Isto explica o aumento nas correntes de pico observadas nos voltamogramas cíclicos sucessivos, pois a formação da ligação amídica diminui a distancia a ser percorrida pelo elétron entre as moléculas de CSH e a superfície de ouro, possibilitando uma maior constante de transferência eletrônica. Conforme a Figura 6B, após um número de ciclos voltamétricos maior que 40 não são mais observados acréscimos significativos nas correntes de pico, indicando que as moléculas eletroativas sobre a superfície do eletrodo atingiram conformações ótimas para o processo de transferência eletrônica e equilíbrio de formação do par redox observado.

Devido às forças repulsivas dos grupos carregados negativamente, as moléculas superficiais de CSH na superfície do eletrodo se mantêm afastadas, umas das outras, durante o processo de ancoramento à CAA de MPA. A iniciação do processo redox altera a estrutura entrópica das espécies sobre a superfície, favorecendo a aproximação de espécies adjacentes, pois a formação da ponte de dissulfeto impede a geração de mais cargas negativas decorrentes do desprotonamento de grupos tiólicos participantes da reação.

Os resultados experimentais obtidos para o processo de ativação do eletrodo de MPA/GSH são apresentados na Figura 7.

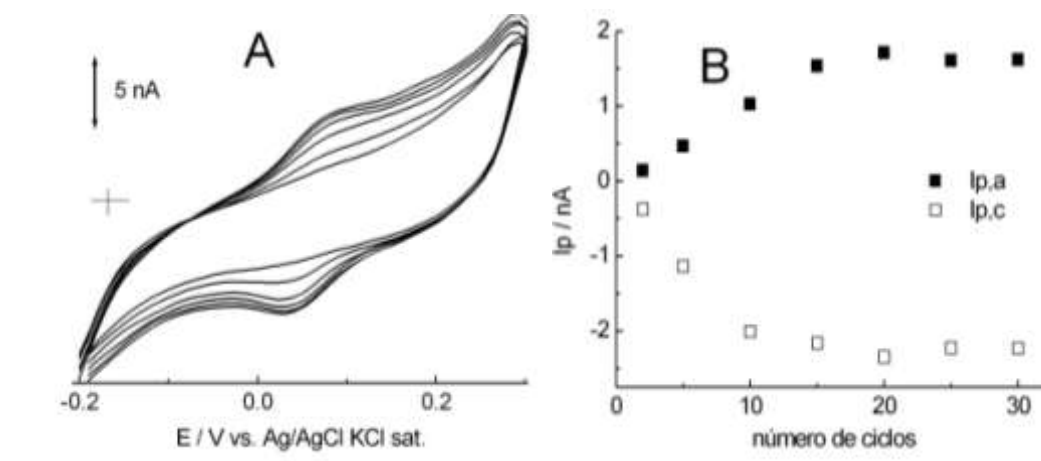


Figura 7: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo Au/MPA/GSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2. (B) Corrente de pico versus número de ciclos. $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_\lambda = 0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$; $\nu = 0,01 \text{ V s}^{-1}$.

Na Figura 7 similarmente ao observado na Figura 6, também se observou aumento nos níveis de corrente, porém até o 30º ciclo voltamétrico. Isto demonstra que para o eletrodo de MPA/GSH, rearranjos das espécies eletroativas na superfície do eletrodo também ocorrem. Apesar da semelhança entre os potenciais de pico observados para este eletrodo, diferenças no perfil voltamétrico foram observadas. A menor diferença entre os potenciais de pico indica maior reversibilidade do processo redox no eletrodo de Au/MPA/GSH em relação ao eletrodo de Au/MPA/CSH. Os menores níveis de corrente obtida após o processo de ativação indicaram menor quantidade de moléculas de GSH adsorvidas sobre a superfície do eletrodo.

Comparando-se as estruturas moleculares da CSH e GSH, observa-se que as moléculas de CSH são menores que as de GSH, apresentando menor volume molecular, de modo que considerando uma superfície com uma mesma área, um maior número de moléculas de CSH poderá estar superficialmente presente após o empacotamento molecular.

Para moléculas maiores como a GSH ocorre uma maior aproximação entre os grupos tiólicos superficiais favorecendo o processo de conformação molecular, necessário para a ocorrência da reação de transferência de carga e formação da ponte de dissulfeto. Isto explica a estabilização dos níveis de corrente após apenas 30 ciclos voltamétricos, além da maior reversibilidade do par redox observado no eletrodo de Au/MPA/GSH comparado ao de Au/MPA/CSH.

3.3. Otimização do Processo de Imobilização de CSH sobre a CAA de MPA sobre o Eletrodo de Ouro

Foram realizados experimentos com o objetivo de selecionar a melhor concentração de CSH a ser utilizada durante o ancoramento desta molécula sobre a CAA de MPA. Na Figura 8 são apresentados os valores máximos corrente obtidos após o processo de ativação do eletrodo de Au/MPA/CSH, preparado utilizando diferentes concentrações de CSH.

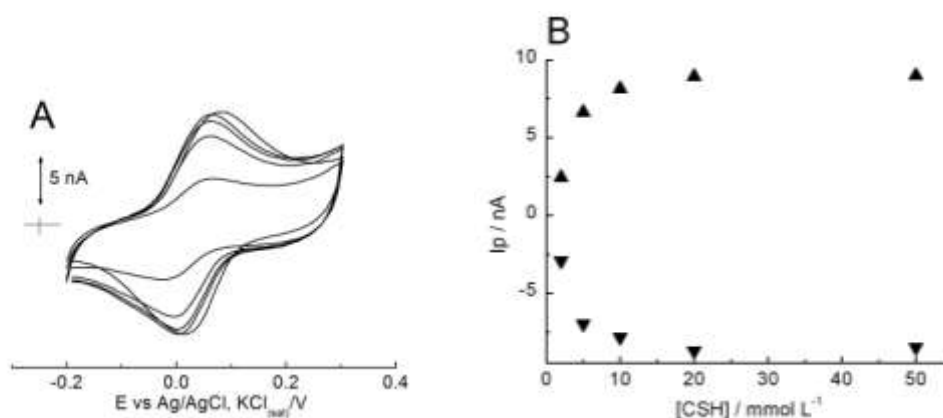


Figura 8: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2 utilizando eletrodos de Au/MPA/CSH preparados com diferentes concentrações de CSH. (B) Curva corrente de pico versus concentração de CSH. $E_i = -0,2$ V; $E_\lambda = 0,3$ V e $E_f = -0,2$ V; $v = 0,01$ V s⁻¹.

A partir dos valores de correntes de pico obtidas na Figura 8 e usando-se as equações (19), (20) e (24) calcularam-se os valores de recobrimento superficial (Γ) de CSH sobre o eletrodo de Au/MPA/CSH para cada concentração avaliada. Através destes valores foram construídas curvas isotermas, segundo os modelos de Langmuir e Frumkin. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 9.

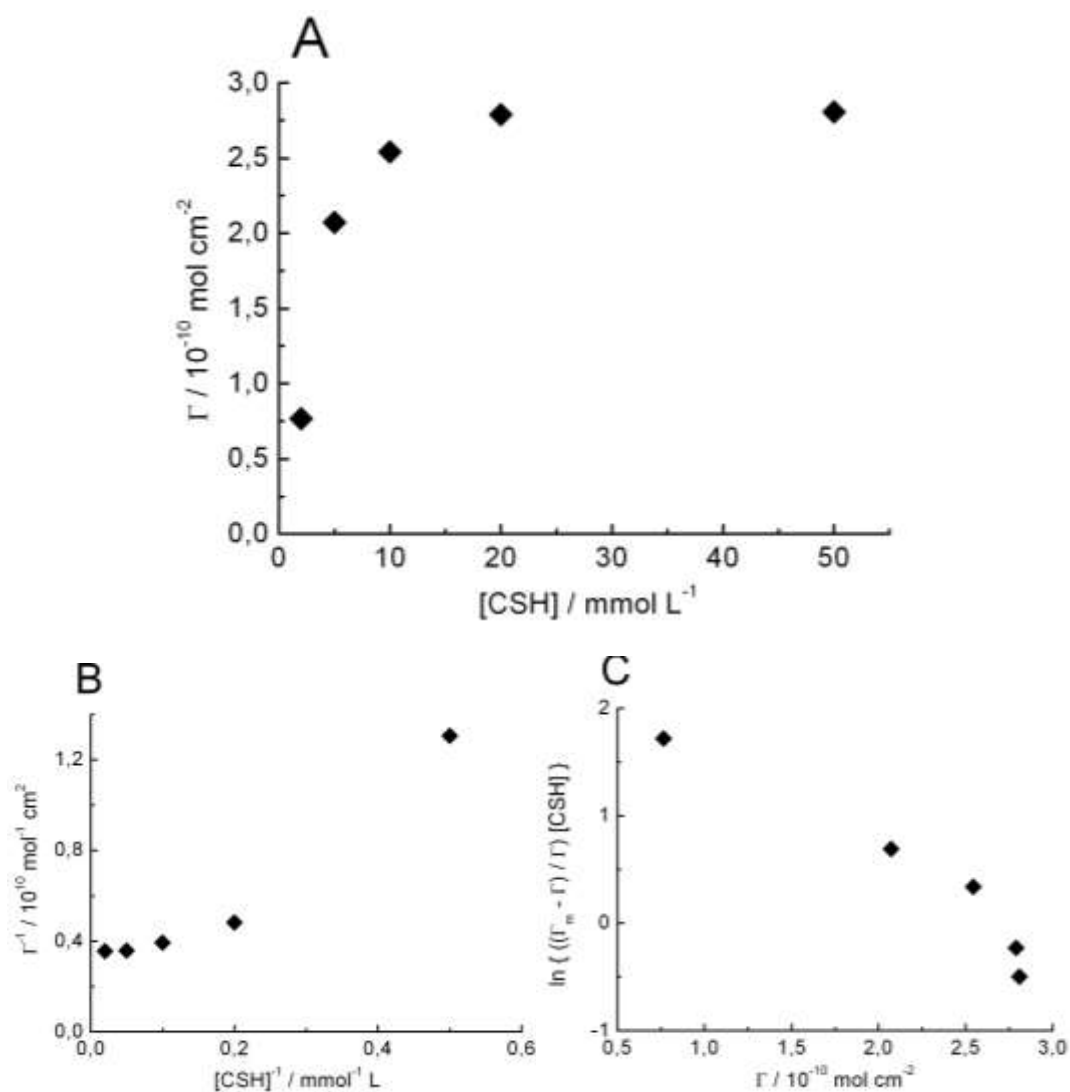


Figura 9: (A) Curva do recobrimento superficial de CSH calculado sobre o eletrodo de Au/MPA/CSH versus concentração de CSH utilizada para a adsorção. (B) Curvas Isotermas de Langmuir e (B) de Frumkin.

Os dados apresentados na Figura 9C mostram maior correlação com o modelo de Frumkin, do que com o de Langmuir, o que indica que as interações entre espécies adjacentes são de natureza repulsiva. Isto é justificado pelo processo de desprotonação dos grupos carboxila e tiólico, presentes na molécula de CSH. O valor obtido para o recobrimento superficial, $2,8 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$, usando a concentração de CSH de 50 mmol L^{-1} indica que a quantidade desta molécula sobre o eletrodo recoberto com MPA está em uma proporção aproximada de 1:1 com relação às moléculas de MPA ($2,2 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$). Isto indica que o processo de ancoramento de CSH sobre o eletrodo recoberto com CAA de MPA ocorre conforme o esquema 6, página 55.

O mesmo estudo foi realizado para o eletrodo de Au/MPA/GSH. Os voltamogramas obtidos após o processo de ativação, para cada concentração de GSH utilizada e os valores das correntes de pico obtidas são apresentados na Figura 10.

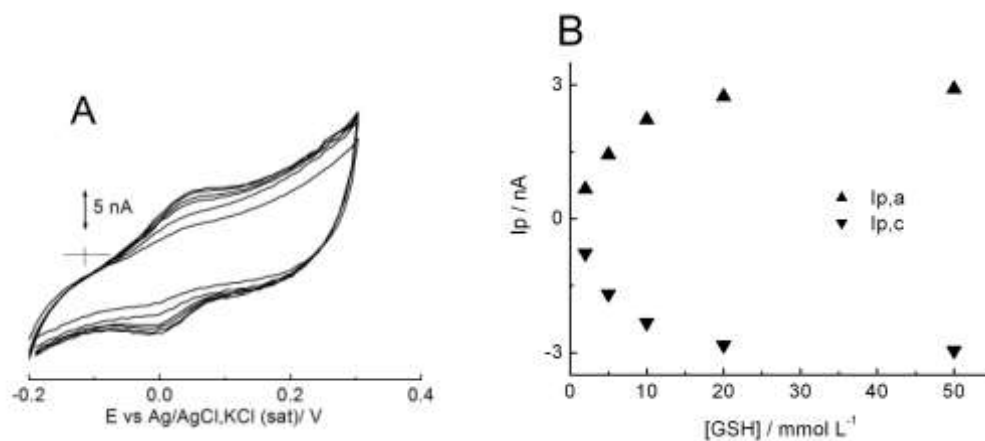


Figura 10: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2 utilizando eletrodo de Au/MPA/GSH preparados usando diferentes concentrações de GSH. (B) Curva de correntes de pico versus concentração de GSH. $E_i = -0,2$ V; $E_\lambda = 0,3$ V e $E_f = -0,2$ V; $v = 0,01$ V s⁻¹.

A partir dos valores de corrente obtidos na Figura 10B calcularam-se, para cada concentração de GSH utilizada, os valores de recobrimento superficial sobre o eletrodo de Au/MPA/GSH usando as equações (19), (20) e (27), Figura 11.

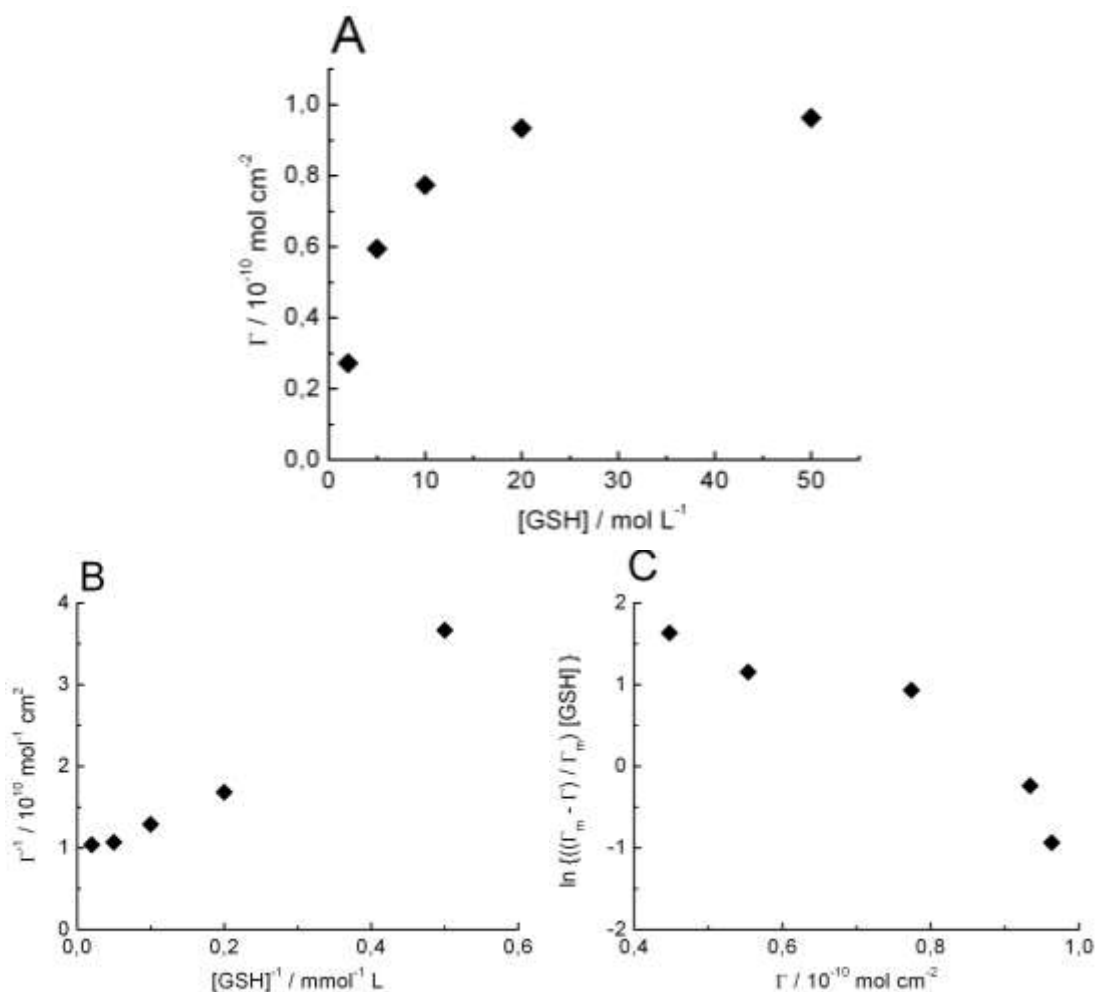


Figura 11: (A) Curva do recobrimento superficial de GSH sobre o eletrodo de Au/MPA/GSH versus concentração de GSH utilizada para a adsorção; (B) Isoterma de Langmuir e (C) Isoterma de Frumkin.

A partir dos valores de recobrimento superficial apresentados na Figura 11A construíram-se as isotermas, segundo os modelos de Langmuir e Frumkin. A partir do valor da regressão linear de Γ^{-1} versus $[\text{GSH}]^{-1}$, calculou-se o valor de $0,97 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ como o recobrimento superficial máximo de GSH sobre eletrodo de ouro de área plana recoberto com MPA. Este valor foi obtido para 50 mmol L^{-1} de GSH, o que indica que nesta concentração a superfície se apresenta praticamente saturada com esta molécula.

O comportamento decrescente da isoterma de Frumkin indica que a interação entre moléculas de GSH sobre a superfície do eletrodo de Au/MPA/GSH é de natureza repulsiva, já que a carga líquida da molécula ser negativa no intervalo de pH utilizado para os ensaios.

3.4. Determinação dos Grupos Funcionais Presentes na Superfície do Eletrodo de Au/MPA/CSH

A identificação dos grupamentos orgânicos superficiais capazes de sofrer processos de desprotonação foi realizada utilizando uma titulação voltamétrica, usando soluções de ferricianeto de potássio como sonda eletroquímica carregada negativamente, conforme descrito no item 2.8. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 12.

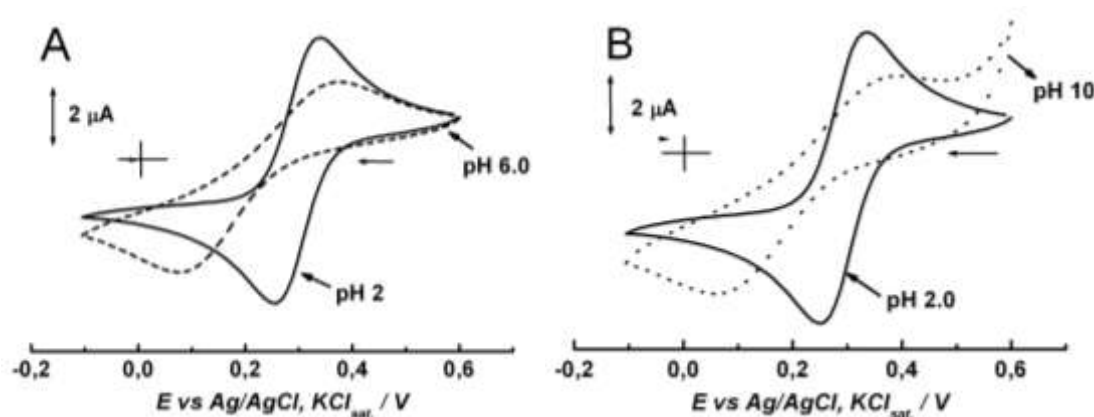


Figura 12: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ em solução tampão fosfato em diferentes valores de pH. (A) Au/MPA e (B) Au/MPA/CSH. $E_i = 0,6 \text{ V}$, $E_\lambda = -0,1 \text{ V}$, $E_f = 0,6 \text{ V}$, $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

Observou-se para o voltamograma obtido em pH 6,0, em relação ao voltamograma obtido em pH 2,0, uma diminuição significativa das correntes de pico de redução e oxidação do íon $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e aumento de ΔE_p ; resultado experimental este, observado em todos os voltamogramas obtidos em pH acima de 5,0, Figura 12A. Já para o eletrodo de Au/MPA/CSH estes resultados foram observados em pH maior que 9,0, Figura 12B.

Estes resultados são consequência do equilíbrio de desprotonação dos grupos funcionais presentes na superfície dos eletrodos. Quando o pH do eletrólito suporte tornou-se superior ao pK_a dos grupos $-\text{COOH}$ ou $-\text{SH}$, presentes nas moléculas de MPA e CSH, respectivamente, estes sofreram desprotonação. Consequentemente, a superfície adquiriu carga negativa dificultando a aproximação superficial e redução do íon $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$.

Desta forma, a dificuldade de aproximação do íon ferricianeto da superfície do eletrodo está diretamente ligada ao pH da solução de eletrólito de suporte na célula eletroquímica. As curvas $I_{p,c}$ versus pH e suas respectivas primeiras derivadas, são apresentados na Figura 13.

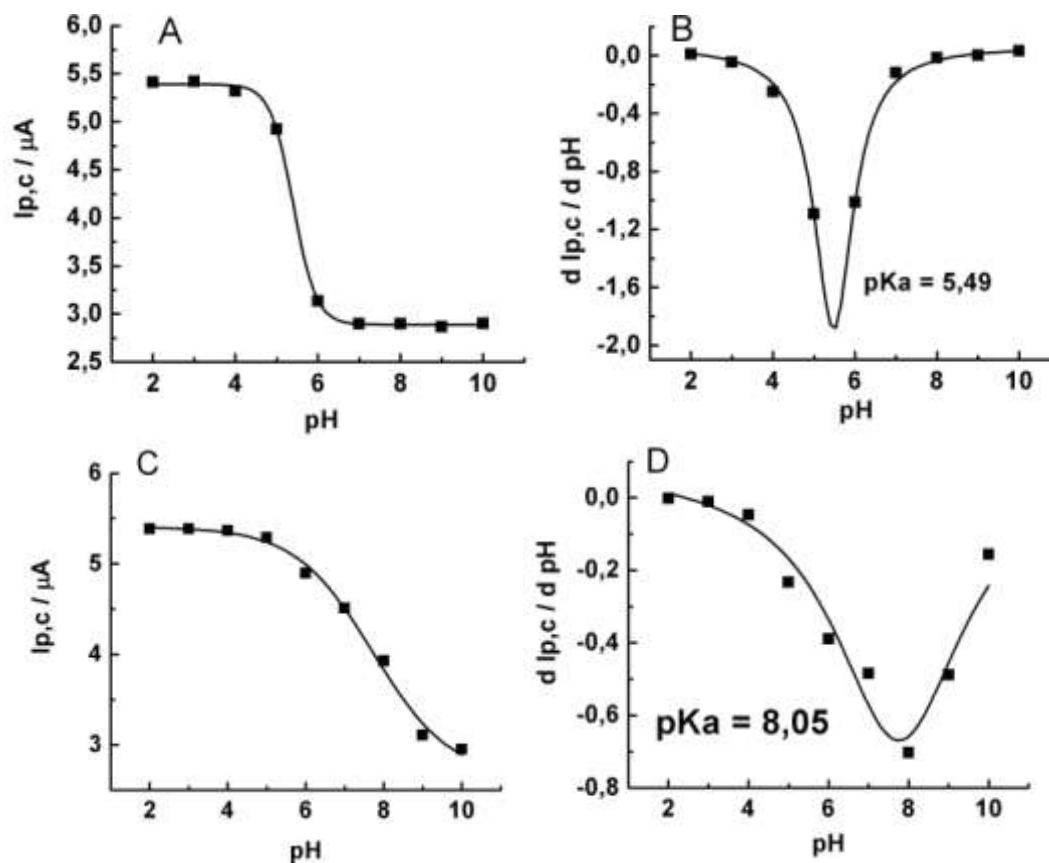
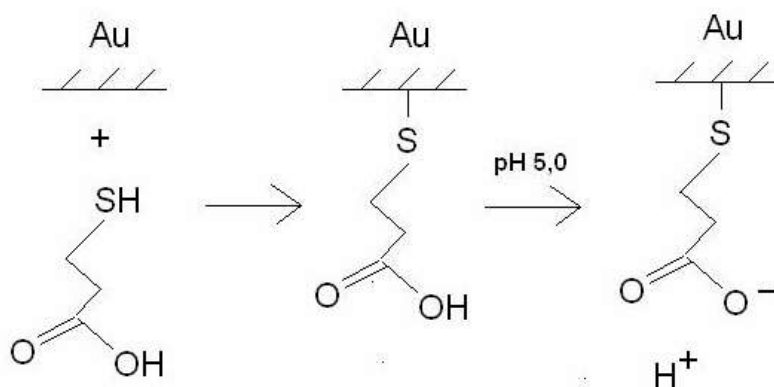


Figura 13: (A e C) Curva de $I_{p,c}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ versus pH das soluções de fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. (B e D) Curva de $\partial I_{p,c}/\partial \text{pH}$ versus pH. Resultados obtidos utilizando eletrodos de ouro modificados com (A e B) Au/MPA e (C e D) Au/MPA/CSH.

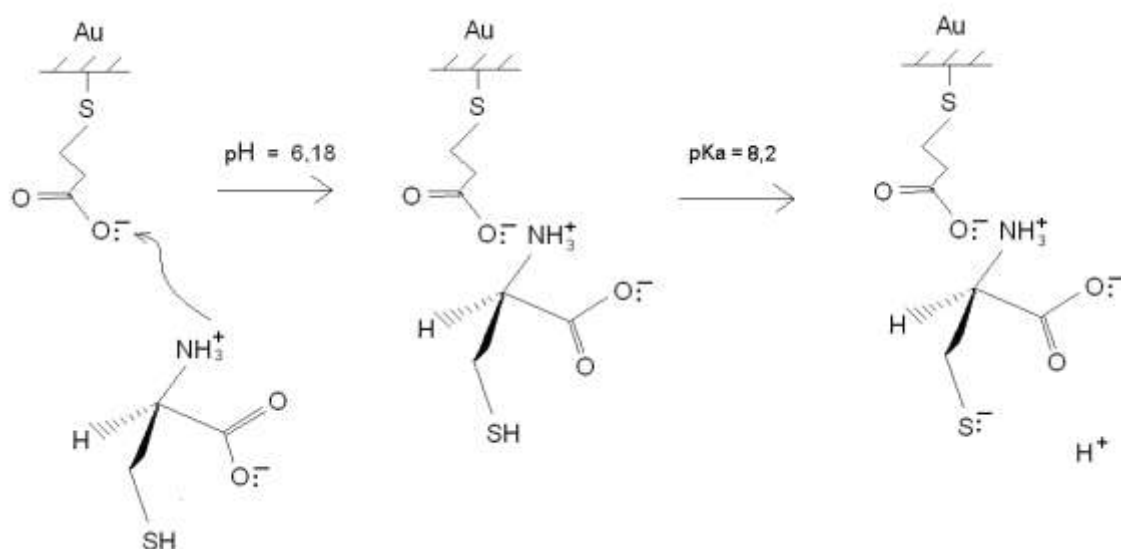
A partir dos dados apresentados na Figuras 13A, observou-se inflexão da curva de $I_{p,c}$ versus pH para valores de pH entre 5 e 6. O valor do pK_a obtido na Figura 13B, (5,49) apresentou concordância com o valor de pK_a do grupo carboxila ($-\text{COOH}$), presente na molécula de MPA. Este O valor obtido apresenta boa concordância com o apresentado na literatura, $5,40^{277}$. O processo de adsorção e desprotonação das moléculas de MPA sobre a superfície do eletrodo de ouro ocorre conforme o esquema 7.



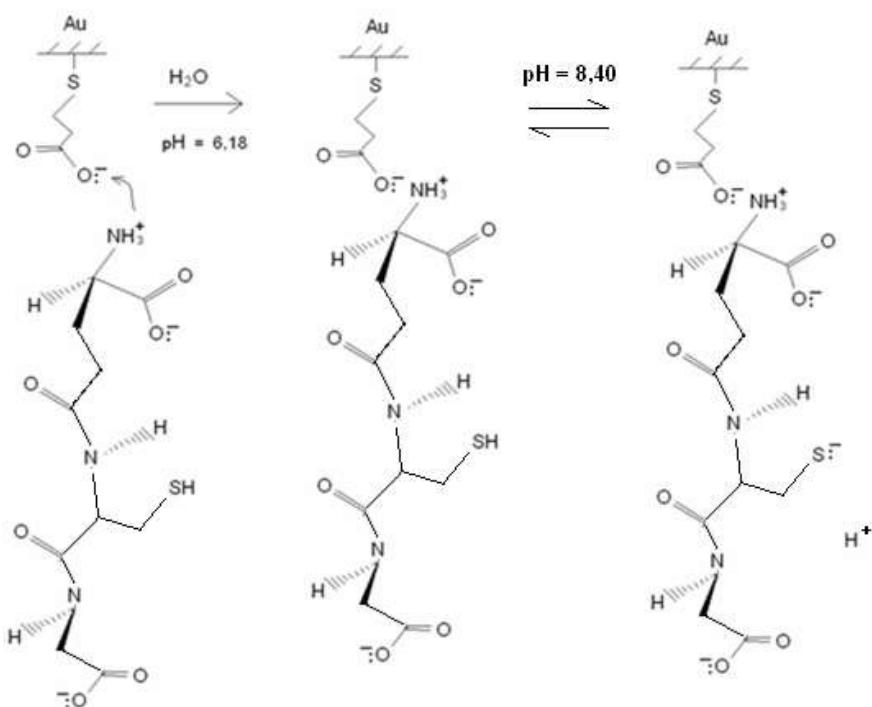
Esquema 7: Processo de adsorção e desprotonação das moléculas de MPA sobre a superfície do eletrodo de ouro.

A inflexão da curva de $I_{p,c}$ versus pH para o eletrodo de Au/MPA/CSH está localizada valores de pH entre 6 e 9 (Figura 13C) e a curva derivada correspondente (Figura 13D) forneceu o valor de 8,05 para o pK da CSH ancorada sobre o MPA. Este valor está em concordância com o valor teórico de pKa do grupo tiólico (-SH) 8,40²⁷⁸, presente na molécula de CSH.

Desta forma, o processo de desprotonação observado para o eletrodo de Au/MPA/CSH, caracterizado por um pKa de 8,05 é decorrente da desprotonação do grupo tiólico, presente na molécula de CSH, ancorada sobre a CAA de MPA, conforme a esquema 8. Resultados semelhantes foram obtidos com o eletrodo de Au/MPA/GSH.



Esquema 8: Processo de adsorção e desprotonação das moléculas de CSH sobre a superfície do eletrodo de ouro recoberto com MPA.



Esquema 9: Processo de adsorção e desprotonação das moléculas de GSH sobre a superfície do eletrodo de ouro recoberto com MPA.

Deste modo, a partir destes resultados concluiu-se que o recobrimento prévio da superfície do eletrodo de ouro com monocamadas de MPA é efetivo para imobilização de moléculas de CSH, mantendo o grupo tiólico (-SH) superficialmente livre e apto para participar de um processo redox.

3.5. Caracterização Espectroscópica dos Grupos Funcionais Presentes na Superfície dos Modificados de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH

A identificação das espécies participantes do equilíbrio redox observado para o eletrodo modificado com Au/MPA/CSH foi realizada através da determinação espectroscópica das ligações dos grupos funcionais, presentes na superfície do eletrodo através da Espectroscopia Raman de Superfície.

Após a limpeza da superfície plana do eletrodo de ouro, este foi submetido a tratamento eletroquímico para a formação de nanoestruturas responsáveis pelo efeito SERS, conforme o item 2.9. Na seqüência, realizaram-se as modificações da superfície dos eletrodos para formar as camadas de Au/MPA, Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH e ativação eletroquímica através de procedimentos semelhantes aos descritos nos itens 2.5, 2.6 e 2.7. Devido ao aumento da área superficial e para garantir que nenhuma molécula de CSH ou GSH adsorvesse diretamente sobre a superfície de ouro os tempos

de imersão em solução de MPA e CSH ou GSH foram alterados e a realização de um maior número de ciclos foi necessária, conforme o item 2.10. Durante o processo de ativação, correntes de pico constantes foram obtidas após a realização de 180 ciclos voltamétricos. Voltamogramas cíclicos obtidos com os eletrodos nanoestruturado e plano são mostrados na Figura 14.

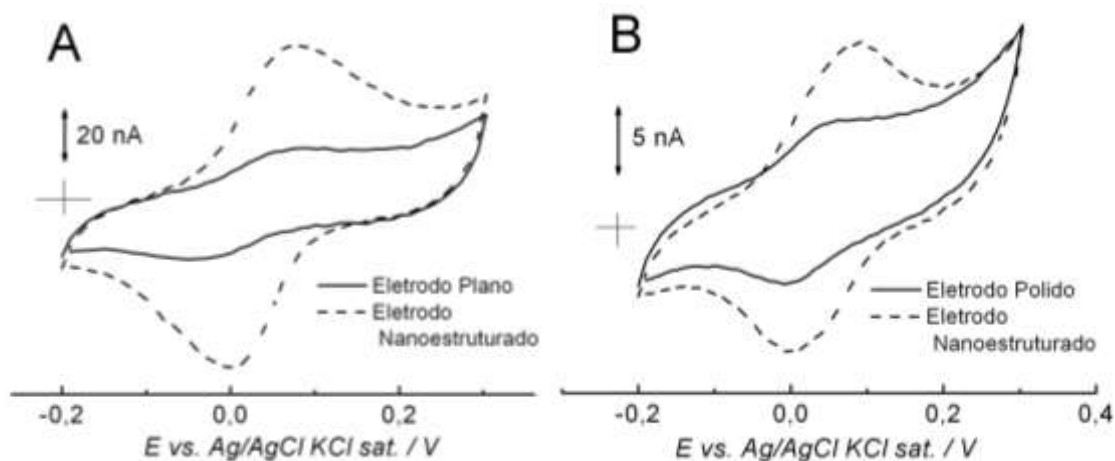


Figura 14: Voltamogramas cíclicos obtidos com os eletrodos: (A) Au/MPA/CSH e (B) Au/MPA/GSH polidos e após procedimento de nanoestruturação prévio antes da formação das camadas de MPA e CSH ou GSH, item 2.9. $E_i = -0,2$ V, $E_\lambda = +0,3$ V, $E_f = -0,2$ V; $\lambda = 0,01$ V s⁻¹.

Os resultados apresentados na Figura 14 demonstram que após o processo de aumento da rugosidade da superfície do eletrodo de ouro, necessário para a obtenção do efeito SERS, voltamogramas com perfil voltamétrico semelhante aos eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH preparados com área plana foram obtidos. O aumento das correntes de pico ocorre, pois o tratamento eletroquímico necessário para a observação do efeito SERS aumenta a área ativa do eletrodo, de modo que maior número de moléculas de CSH e GSH são adsorvidas sobre as moléculas de MPA. Variações dos potenciais de pico se devem a maior falta de uniformidade das CAA na condição de área com maior rugosidade. Os resultados voltamétricos obtidos indicaram que o mecanismo redox ocorrido na superfície dos eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH não são alterados pelo processo de nanoestruturação da superfície necessário para a obtenção dos espectros de SERS.

Para efeito de comparação, os espectros Raman de superfície obtidos com os eletrodos modificados foram comparados com aqueles obtidos em soluções de MPA, CSH e GSH. Nas Figuras 15, 16 e 17 são apresentados os resultados obtidos.

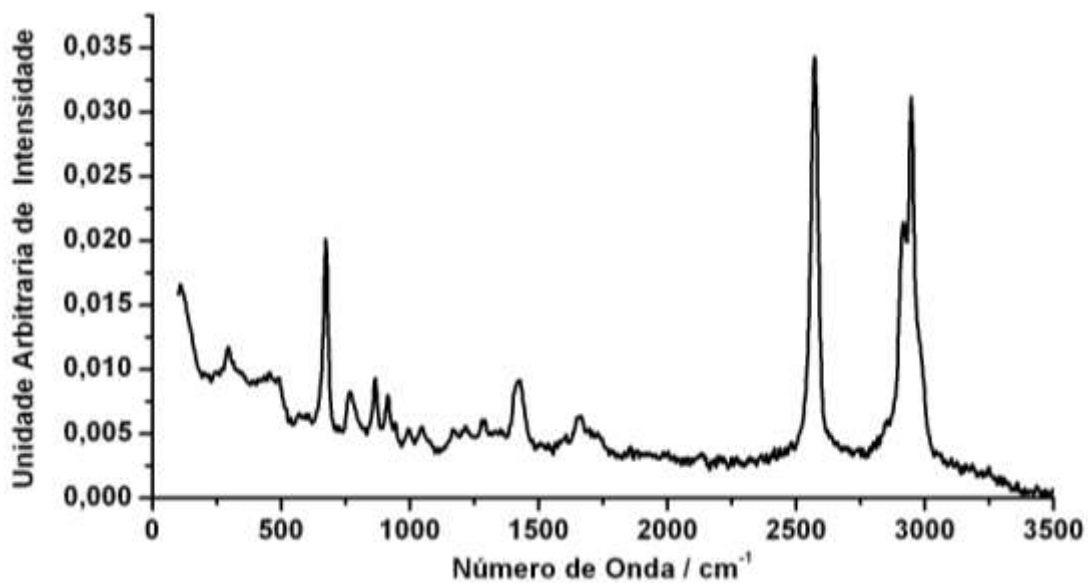


Figura 15: Espectros Raman de uma solução 10 mmol L⁻¹ de MPA.

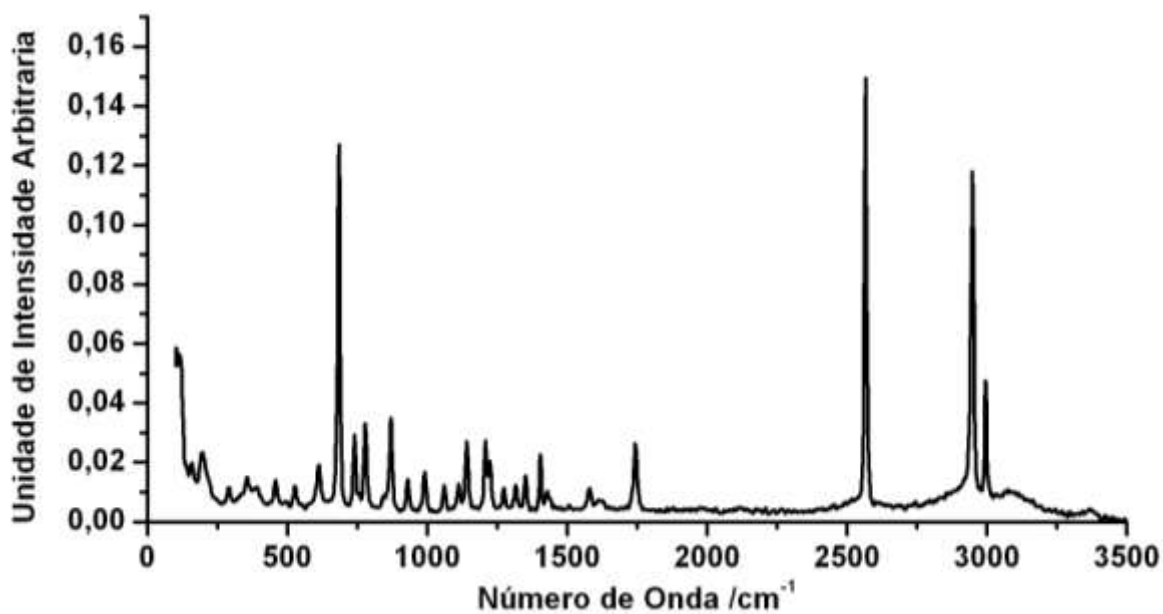


Figura 16: Espectros Raman de uma solução 10 mmol L⁻¹ de CSH.

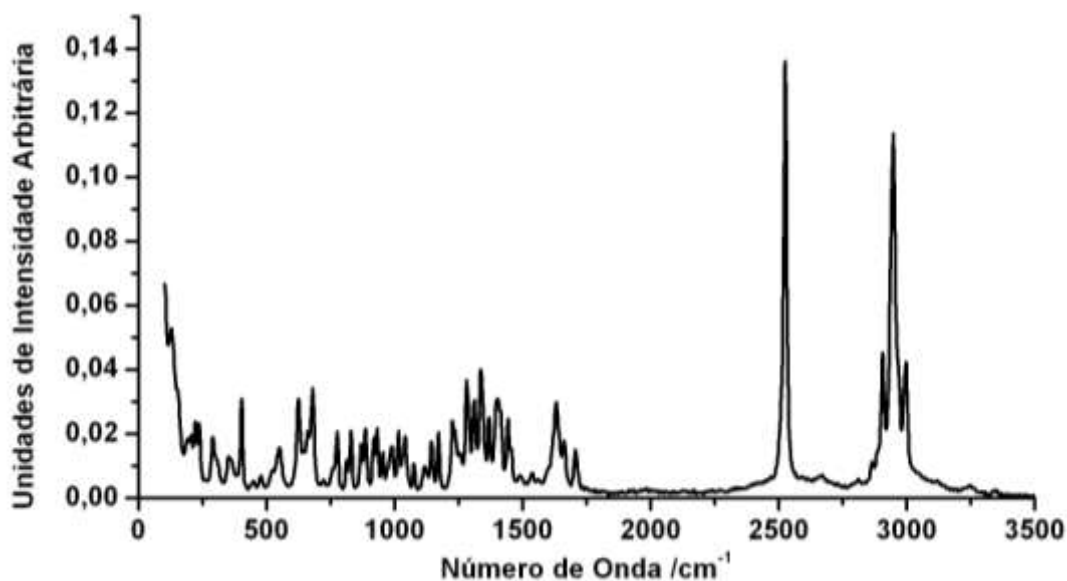


Figura 17: Espectros Raman de uma solução 10 mmol L⁻¹ de GSH.

Através do microscópio ótico acoplado ao espectrômetro Raman de superfície realizou-se a seleção de regiões apresentando homogeneidade. Em seguida procedeu-se ao registro dos espectros. Os espectros obtidos com os eletrodos de Au/MPA, Au/MPA/CSH e Au/MPA/CSH são apresentados na figura 18.

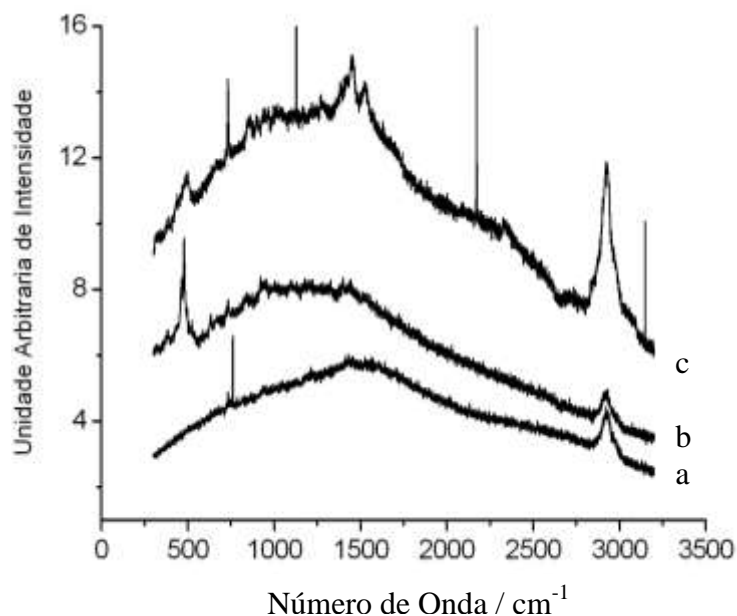


Figura 18: Espectros Raman de Superfície dos eletrodos de Au/MPA (a), Au/MPA/CSH (b) e Au/MPA/GSH (c). Condições experimentais da obtenção dos espectros conforme item 2.10.

Na Figura 18 observa-se no espectro do eletrodo modificado com Au/MPA/CSH uma banda intensa, por volta de 465 cm^{-1} , a qual não foi obtida no espectro do eletrodo modificado somente com MPA. Esta banda é resultante do estiramento da ligação correspondente a ponte de dissulfeto $\nu(\text{S-S})$. Este resultado confirma a presença da ponte de dissulfeto como participante do equilíbrio redox do eletrodo modificado com Au/MPA/CSH. A banda por volta de 2900 cm^{-1} , presente nos dois espectros é resultante do estiramento $\nu(\text{C-H})$, ligação presente na molécula de MPA. A banda por volta de 1400 cm^{-1} , pouco intensa refere-se ao estiramento $\nu(\text{C=O})$, o qual foi observado, com baixa intensidade, em ambos os eletrodos modificados.

A ausência de outras bandas referentes às ligações S-H, C-N, e N-H, presentes nas moléculas de CSH, além de, S-C, presente no MPA e na CSH, foram observadas nos espectros obtidos em solução devido ao efeito de polarização da superfície nanoestruturada, a qual é capaz de proporcionar o efeito SERS, somente para ligações que apresentam eixo de ligação paralelo a nanoestruturas em superfície. Apesar disso, nem todas as bandas que ocorrem em espectros Raman obtidos em solução necessariamente aparecem em espectros SERS, pois o efeito de intensificação não é o mesmo para todas as ligações presentes na molécula.

3.6. Determinação dos Mecanismos de Reação dos Eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH em Função do pH

Conforme a representação proposta nos esquemas 8 e 9, existe relação entre os equilíbrios ácido-base dos grupos tiólicos (-SH), presentes nas moléculas de CSH e o processo redox, observado para as espécies eletroativas na superfície do eletrodo. Desta forma, foram realizados experimentos voltamétricos com os eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH utilizando como eletrólito de suporte soluções de diferentes pH, para determinação das etapas do mecanismo redox, onde há o envolvimento de prótons. Na Figura 19 são apresentados os resultados obtidos com o eletrodo de Au/MPA/CSH.

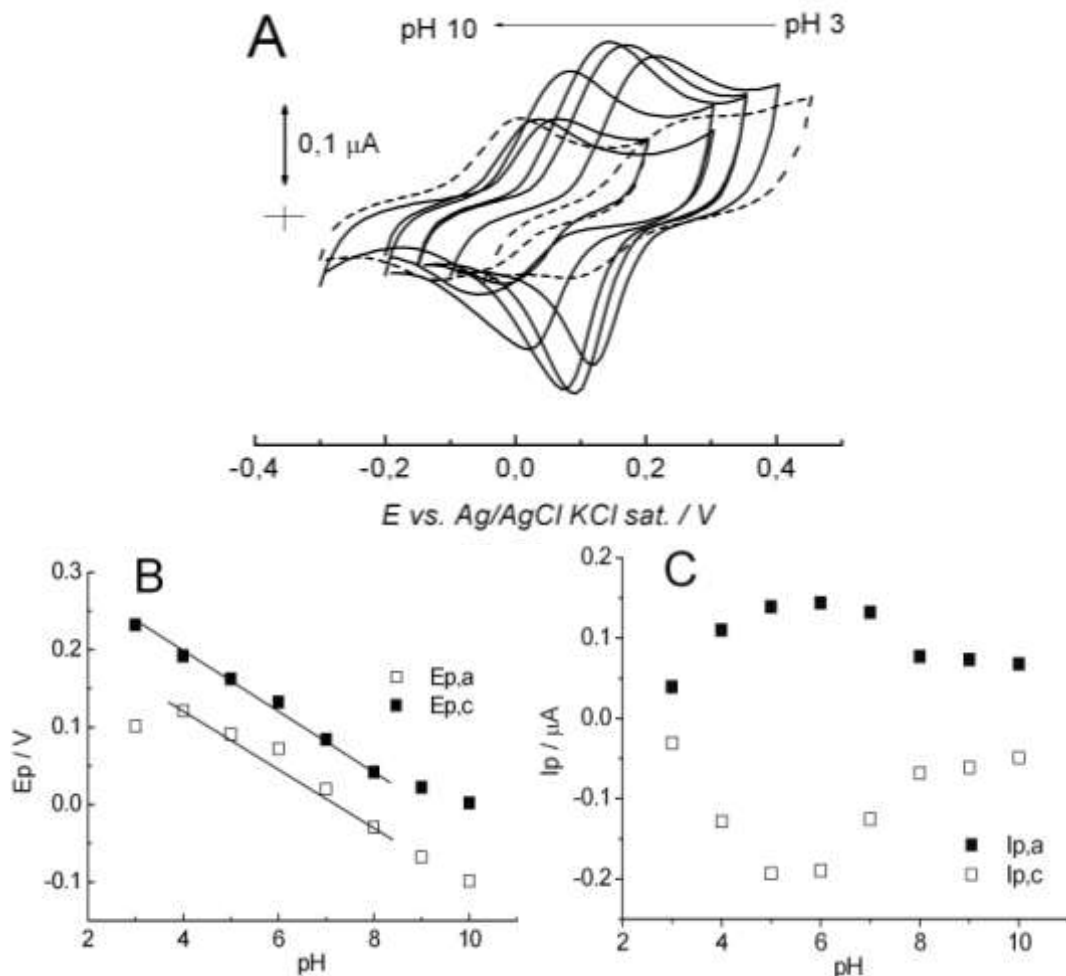
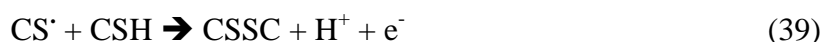


Figura 19: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ sob diferentes pH. $E_i = -0,2$ V; $E_{\square} = +0,3$ V e $E_f = -0,2$ V; $v = 0,1$ V s⁻¹. (B) Curvas de E_p versus pH ($E_{p,c} = 0,287 - 0,039$ pH e $E_{p,a} = 0,346 - 0,037$ pH). (C) I_p versus pH.

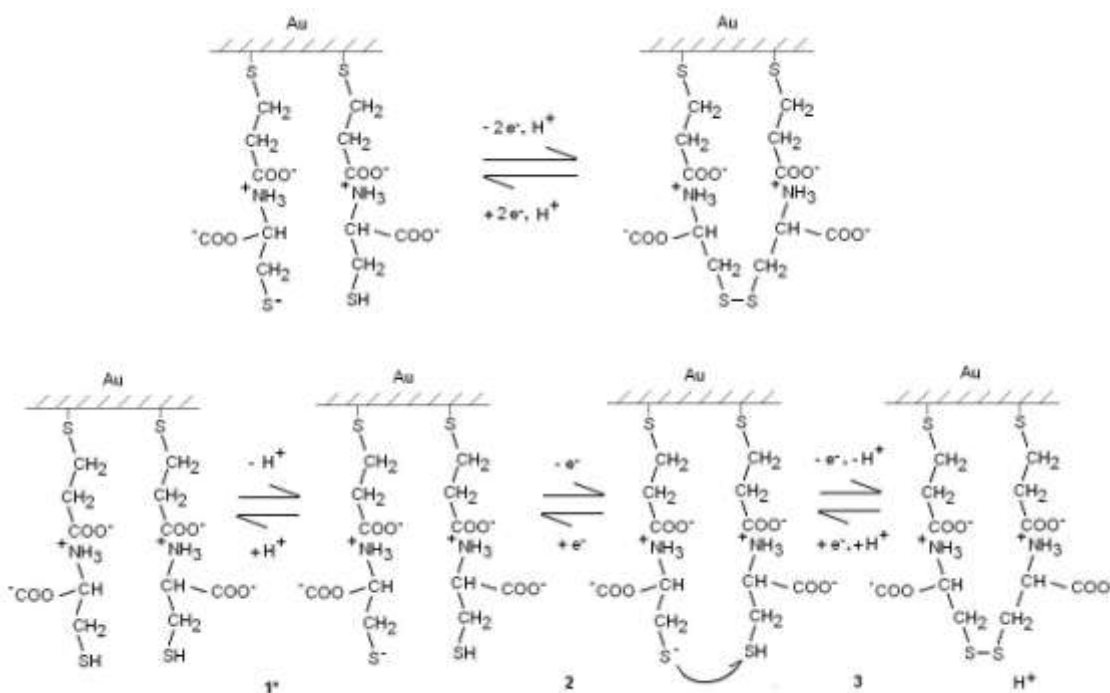
A Figura 19 mostra o deslocamento dos potenciais de pico em função do pH. Tanto os processos anódicos como catódicos são deslocados na direção negativa em função do aumento de pH da solução de eletrólito. Através das inclinações das curvas de E_p versus pH, presentes na Figura 19B, obteve-se o parâmetro $\Delta E_p / \Delta \text{pH}$ que substituído nas equações (30) e (31) permitiu o cálculo da relação de número de prótons / número de elétrons: $n(\text{H}) / n$, sendo igual a 0,64. Isto indica uma proporção aproximada de 1 próton para 2 elétrons na reação global redox.

Na figura 19C, observa-se a variação das correntes de pico em função do pH, que conforme demonstrado, está relacionada ao processo de desprotonação no equilíbrio redox observado para o eletrodo modificado. Para baixos valores de pH as correntes de pico observadas na figura 19C tendem a zero. Para valores de pH maiores que 8,0 as

correntes de pico tendem a metade dos valores máximos obtido, em pH entre 5,0 e 6,0. Isto indica que o processo faradáico é iniciado a partir da espécie desprotonada, cuja concentração superficial diminui para valores baixos de. Na condição máxima de pH, as espécies desprotonadas predominam. O fato de o processo ocorrer com metade da corrente máxima indica que quando a espécie protonada não está presente o processo global não é completo. Na condição intermediária de pH, ambas as espécies predominam, sendo observadas correntes de pico com o dobro da intensidade da condição extrema de pH. O mecanismo capaz de explicar os eventos é a ocorrência de um processo redox em uma primeira etapa, onde ocorre a oxidação do íon tiolato desprotonado, formando um radical tioil. Sequencialmente, o radical formado ataca um grupo tiólico adjacente, gerando uma espécie intermediária que rapidamente é oxidada em uma segunda etapa, formando a ponte de dissulfeto e liberando um próton. O alvo do radical formado é a espécie protonada, justificando os maiores valores de corrente obtidos em intervalos de pH onde ambas as espécies coexistem em proporções equivalentes. Os passos deste mecanismo são enumerados conforme as reações abaixo:



Desta forma, o valor de 0,64 obtido para a relação $n(\text{H})/n$ é explicável pelos equilíbrios (23), (38) e (39). Apesar de o processo global envolver a formação de dois prótons e dois elétrons, e no equilíbrio (13) ocorrer liberação de apenas um próton para formação do íon tiolato, nesta etapa não ocorre transferência eletrônica, de forma que esta atua apenas como uma reação acoplada ao processo, precursora do equilíbrio redox. Como a formação do radical tioil (RS^\cdot) é muito lenta, a concentração de íons tiolato influencia pouco a velocidade da reação em meio alcalino, de modo que o deslocamento deste equilíbrio pouco influencia o processo global. Com isso, o mecanismo do processo redox observado para as espécies eletroativas sobre o eletrodo de Au/MPA/CSH pode ser sumarizado, conforme o esquema 10.



Esquema 10: Etapas do mecanismo de transferência eletrônica do processo redox observado para o eletrodo de ouro modificado com Au/MPA/CSH.

A reação entre dois radicais tioil é mais efetiva em pH mais elevado, já que, quanto maior for a quantidade de grupos tiolato (RS^-), maior será a probabilidade de se formarem radicais em moléculas de CSH adjacentes na superfície sobre a CAA de MPA. Com isso, em valores de pH mais elevados seria de se esperar a queda de corrente, com o mecanismo redox podendo ocorrer conforme as etapas abaixo:



A partir dos valores de $E_p - E_p/2$, obtidos dos voltamogramas registrados em pH 7,0 e 10, calculou-se um número de elétrons e α através das equações (11) e (12) como sendo $n = 2,2$ com $\alpha = 0,52$ e $n = 1,3$ com $\alpha = 0,41$, respectivamente. Estes resultados corroboram a possibilidade de ocorrência das reações descritas pelas reações (38) e (39).

O equilíbrio (40) não envolve a transferência de elétrons ao eletrodo, sendo uma etapa de terminação de um mecanismo de reação em cadeia envolvendo radicais. O

ataque do radical tioil a um grupo tiólico protonado, gera uma espécie radicalar com poder redutor mais alto, que perde rapidamente seu elétron para a superfície do eletrodo.



As reações (41) e (42) são etapas intermediárias passíveis de ocorrer resultando na reação (39), porém com velocidade muito alta, devido à instabilidade dos produtos intermediários formados como, por exemplo, o radical $[\text{CSSC}]^\cdot$.

Na figura 20 são apresentados os resultados obtidos para experimento similar utilizando o eletrodo de ouro modificado com Au/MPA/GSH.

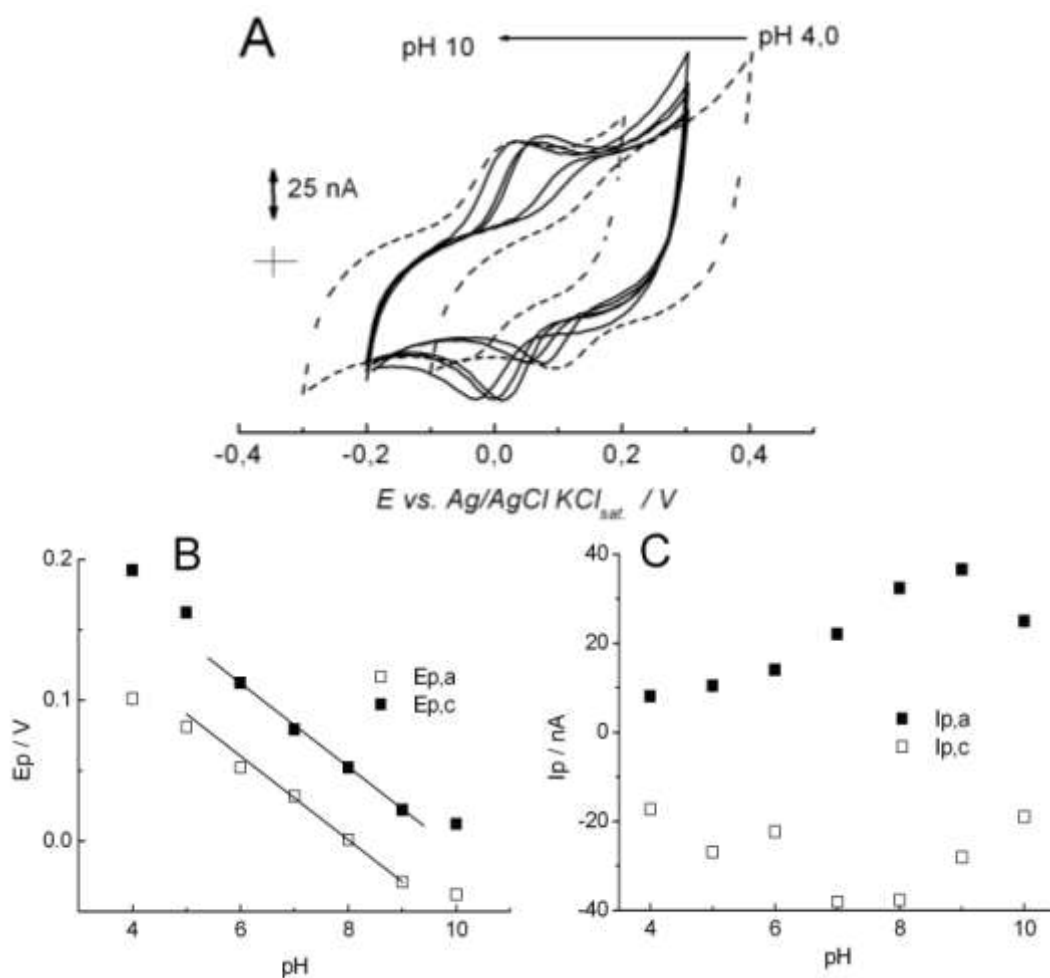
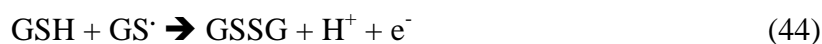


Figura 20: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/GSH em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em diferentes valores de pH. E_i = -0,2 V; E_λ = +0,3 V e E_f = -0,2 V; v = 0,1 V s⁻¹. (B) Curvas de Ep versus pH (Ep,c = 0.212 - 0.027 pH e Ep,a = 0.289 - 0.030 pH). (C) Ip versus pH.

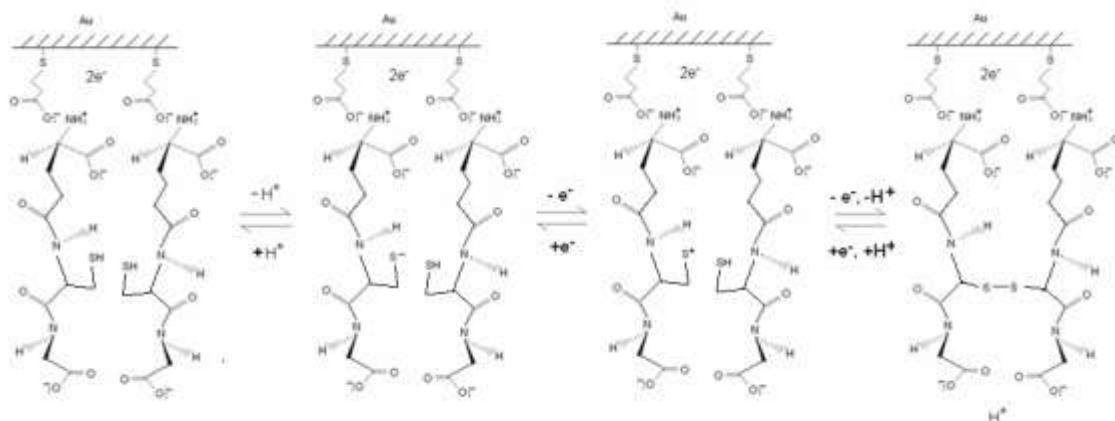
Os dados apresentados na figura 20 mostraram que o eletrodo modificado com Au/MPA/GSH tem comportamento similar ao de Au/MPA/CSH, de modo que a explicação para o fenômeno observado na Figura 19 também se aplica ao resultado observado na Figura 20. Após substituição do valor médio de $\Delta E_p/\Delta pH$ obtidos na figura 20B nas equações (30) e (31) calculou-se a relação de prótons e elétrons para o eletrodo de Au/MPA/GSH sendo igual a 1 próton para cada 2 elétrons. Isto indica que o mecanismo redox envolvendo as espécies eletroativas sobre o eletrodo de Au/MPA/GSH é semelhante ao que ocorre no eletrodo de Au/MPA/CSH.

As maiores correntes de pico observadas com o eletrodo de Au/MPA/GSH foram observadas em valores de pH maiores do que 8,0, como consequência da menor acidez da molécula de GSH ($pI = 5,70$) em relação a de CSH ($pI = 5,02$). Em outras palavras, em pH 8,0 a glutatona possuirá maior quantidade de grupos tiólicos protonados do que a cisteína.

O maior valor de pI da molécula de GSH proporciona menor perda de prótons em relação a molécula de CSH para um mesmo pH, o que diminui a repulsão entre moléculas adjacentes. Desta forma, em valores intermediários de pH o processo redox estabelecido para o eletrodo de Au/MPA/GSH pode ser descrito pelas reações abaixo:



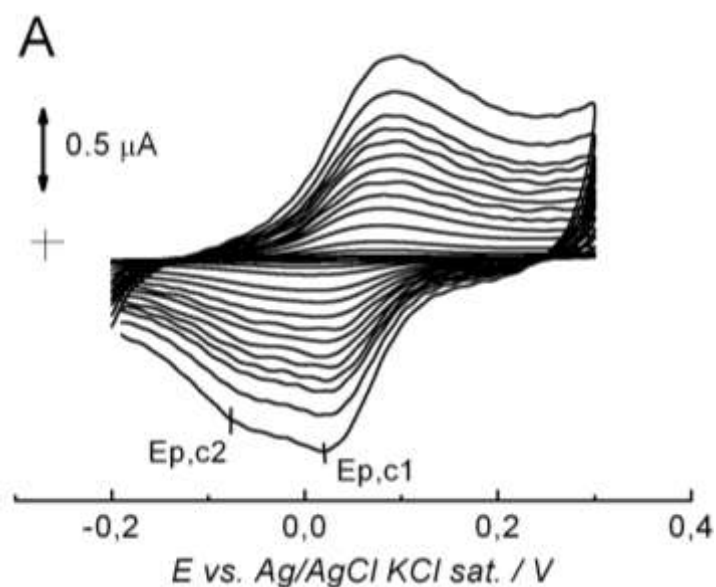
O fato de as correntes de picos máximas anódica e catódica terem disso obtidas em valores de pH diferentes ocorre por conta de a condição mais alcalina favorecer a oxidação e a mais ácida a redução. O mecanismo do processo redox envolvendo a formação de pontes de dissulfeto é sumarizado no esquema 11.



Esquema 11: Etapas do mecanismo de transferência eletrônica do processo redox observado para o eletrodo de ouro modificado com Au/MPA/GSH.

3.7. Eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH – Parâmetros Cinéticos

A cinética da reação de transferência de carga para o par redox RSSR/RSH nos eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH, após o processo de ativação, foi estudada em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,2, utilizando voltametria cíclica e diferentes velocidades de varredura. Os resultados obtidos para o eletrodo de Au/MPA/CSH são mostrados na figura 21.



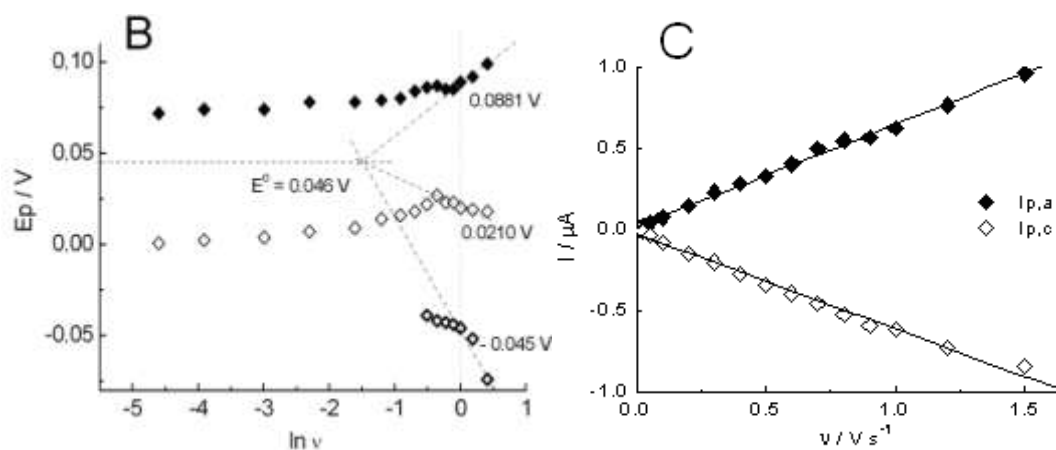


Figura 21: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2, em diferentes velocidades de varredura. $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_\lambda = +0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$. (B) Curvas de E_p versus $\ln v$ e (C) I_p versus v . $I_{p,a} = (0,628 \pm 0,008) 10^{-6} \text{ A/V s}^{-1} v$, $R = 0,9952$; $I_{p,c} = (0,585 \pm 0,007) 10^{-6} \text{ A/V s}^{-1} v$, $R = 0,9934$.

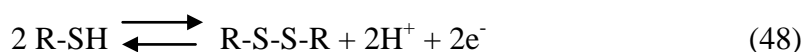
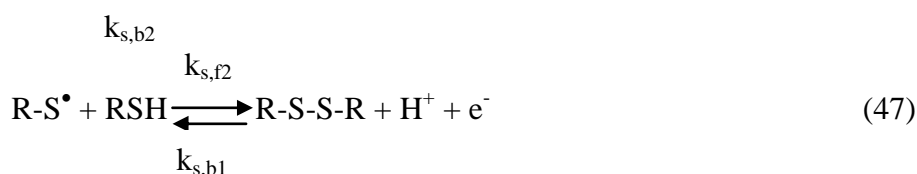
A correlação linear entre os valores das correntes de pico versus a velocidade de varredura, apresentados na figura 21C, demonstra que os processos faradáicos observados ocorrem por conta de espécies eletroativas confinadas na superfície do eletrodo de Au/MPA/CSH.

A partir dos valores obtidos das inclinações das retas de $I_{p,a}$ e $I_{p,c}$ versus v foram calculados os valores de α e Γ_0 , através das equações (21) e (22). Desta forma, foram obtidos os valores de $\Gamma_0 = 1,2 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ e $\alpha = 0,52$. Através da equação (24) calculou-se o valor do recobrimento superficial de CSH sobre o eletrodo de Au/MPA/CSH como sendo igual a $\Gamma_{\text{CSH}} = 2,0 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$. O valor de α obtido apresenta semelhança ao valor encontrado na sessão 3.6., indicando que não houve variação significativa neste parâmetro no intervalo de velocidades de varredura estudado. A diminuição do valor do excesso superficial, em relação ao valor obtido na seção 3.3, ocorre por conta da limitação temporal para a ocorrência do mecanismo redox em altas velocidades de varredura.

A figura 21A também mostra que para maiores velocidades de varredura ocorre desdobramento do processo redox de redução. Isto ocorre em consequência da segunda etapa de redução, que corresponde à redução do radical tioil, formado após a quebra da ponte de dissulfeto que, sendo mais lenta que a primeira etapa, irá ocorrer em potenciais mais negativos que o primeiro processo. A ausência de desdobramento de picos para o processo de oxidação, indica que a primeira etapa deste processo, referente à formação

do radical tioil a partir do íon tiolato é lenta em comparação à segunda etapa, que ocorre simultaneamente ao ataque do radical formado a um grupo tiólico protonado adjacente, conforme a reação (39).

O conjunto de equilíbrios com suas respectivas constantes de velocidade, envolvidos nos esquemas 10 e 11 são:



(Reação Global do Redox – Transferência Eletrônica)

Usando-se as equações (34) e (35) e os valores de $E_{p,a}$; $E_{p,c1}$ e $E_{p,c2}$ obtidos das curvas de E_p versus $\ln v$, na figura 21B, calcularam-se as correspondentes constantes de velocidades das etapas de transferência eletrônica.

O valor de $E^{o'}$ = 0,046 V foi obtido da extrapolação das curvas de E_p versus $\ln v$. Os valores de 8.5 s^{-1} , 14.5 s^{-1} e 3.2 s^{-1} foram obtidos para $k_{s,f1}$, $k_{s,b1}$ e $k_{s,b2}$, respectivamente, através da aplicação dos valores de E_p para $\ln v = 0$. Os valores das constantes de velocidade obtidas demonstram que o processo redox resultante das espécies adsorvidas sobre a superfície do eletrodo apresenta cinética moderada, com exceção do ataque radicalar aos grupos tiólicos adjacente, cuja contante de velocidade não pode ser determinado, pois se trata de uma reação com cinética muito rápida.

A constante de velocidade $k_{s,b1}$ foi determinada considerando-se a reação (49) como uma reação de pseudo-primeira ordem. Embora a reação tenha natureza bimolecular com ordem real igual a 2, a concentração de íons H^+ é praticamente constante durante o experimento. Com isso, a reação (49) (reação à esquerda do

equilíbrio 47) apresenta constante de velocidade bimolecular calculada com base na concentração hidrogeniônica da solução de eletrólito, conforme as reações abaixo:



$$v_3 = k_{s,b1} \cdot \Gamma_{\text{R-S-S-R}} \cdot [\text{H}^+] \quad (50)$$

$$v_3 = k_{s,b1} \cdot \Gamma_{\text{R-S-S-R}} \quad (51)$$

$$k_{s,b1} = k_{s,b1} \cdot [\text{H}^+] \quad (52)$$

Usando a equação (52), o valor obtido de $k_{s,b1}$ e o pH da solução de eletrólito, 7,2; calculou-se o valor da constante de velocidade da reação bimolecular de quebra da ponte de dissulfeto como sendo igual a $2.3 \times 10^8 \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Este resultado demonstra que em condições de acidez elevada a quebra da ponte de dissulfeto é muito rápida e como consequência apresenta valor insignificante em condições de alta alcalinidade.

O mesmo tratamento foi feito para o eletrodo de Au/MPA/GSH e os dados obtidos são apresentados na figura 22.

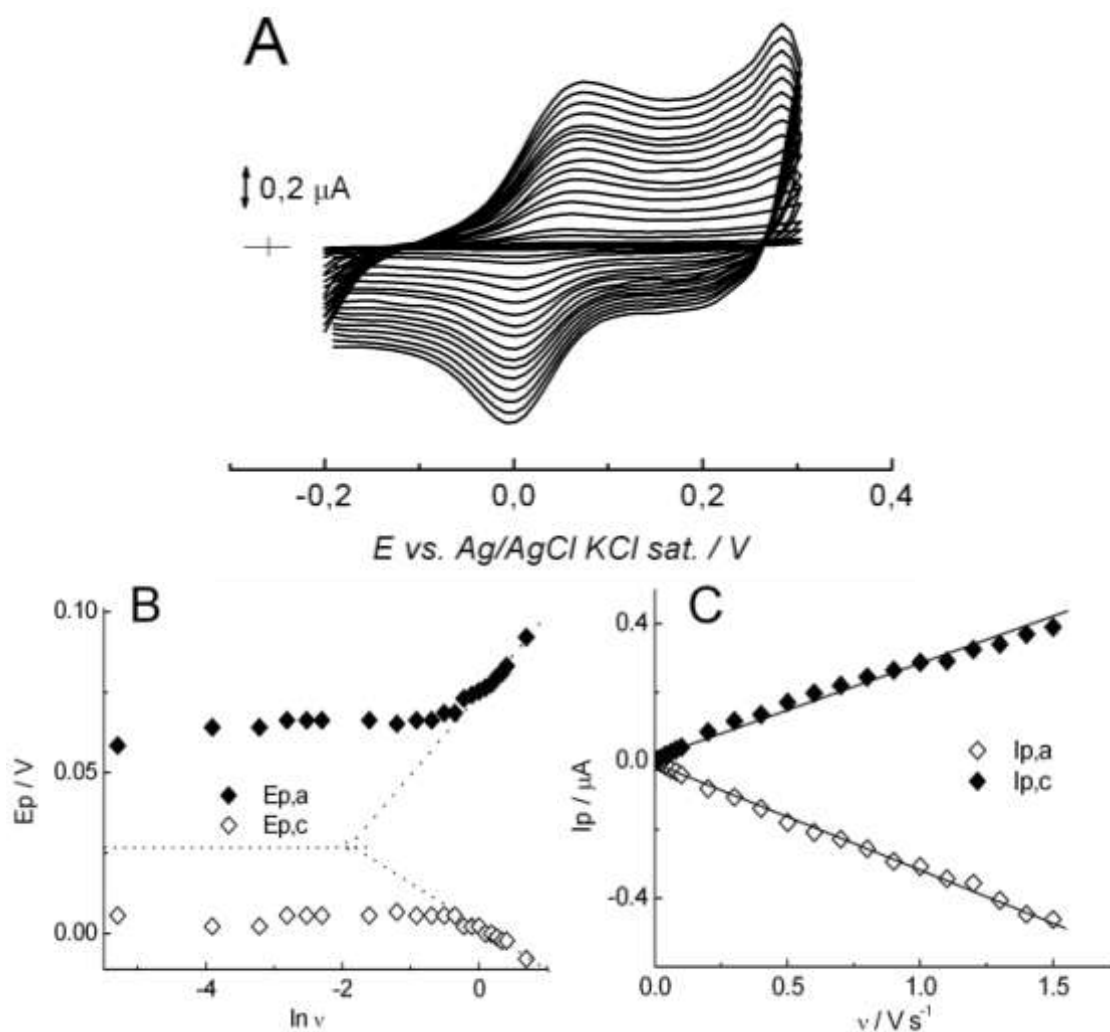


Figura 22: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/GSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2; sob diferentes velocidades de varredura. $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_\lambda = +0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$. (B) Curvas de E_p versus $\ln v$ e (C) I_p versus v . $I_{p,a} = (0,242 \pm 0,008) 10^{-6} v$, $R = 0,9952$; $I_{p,c} = -(0,305 \pm 0,004) 10^{-6} v$, $R = 0,9934$.

A linearidade do gráfico de I_p versus v , observada na figura 22C, demonstra que o processo redox observado ocorre em função de espécies adsorvidas sobre a superfície do eletrodo de Au/MPA/GSH.

Os valores de $\alpha = 0,56$ e $\Gamma_0 = 0,56 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ para o eletrodo de Au/MPA/GSH foram calculados usando as inclinações das curvas $I_{p,a}$ e $I_{p,c}$ versus v e as equações (21) e (22).

A partir da equação (27) e do valor de Γ_0 calculado, estimou-se a quantidade total de moléculas de GSH, correspondente aos grupos tiólicos desprotonados, sobre o eletrodo de Au/MPA/GSH como sendo $\Gamma_{\text{GSH}} = 0,88 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$. A diminuição deste valor em relação ao valor obtido na sessão 3.3., pode ser atribuída a uma limitação

da cinética de reação, causada pela utilização de altas velocidades de varredura empregadas. O resultado líquido é a diminuição nas inclinações das curvas de I_p versus v .

Não se observou desdobramento do processo redox sobre o eletrodo de Au/MPA/GSH, o que demonstra que, possivelmente, a etapa de quebra da ponte de dissulfeto é mais lenta do que a redução do radical formado. As constantes de velocidade de transferência eletrônica para o eletrodo de Au/MPA/GSH foram calculadas usando as equações (34) e (35) e os valores de $E_{p,c}$ e $E_{p,a}$ para $\ln v = 0$, de α e E° . Os resultados foram $9,2 \text{ s}^{-1}$ e $10,3 \text{ s}^{-1}$, para $k_{s,f}$ e $k_{s,b}$ respectivamente.

A constante de velocidade de segunda ordem relativa à quebra da ponte de dissulfeto foi calculada usando a equação (52), assim como a constante de pseudo-primeira ordem, $k_{s,b}$. O valor calculado foi $1,6 \times 10^8 \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, valor inferior ao obtido para o eletrodo de Au/MPA/CSH, o que indica que em pH 7,2, o processo de redução do radical tioil pode ter velocidade mais elevada ou semelhante à velocidade da reação de quebra da ponte de dissulfeto. O maior valor obtido de $k_{s,f}$ para este eletrodo, em comparação ao de Au/MPA/CSH, indica que o processo de formação do radical tioil, que inicia o processo redox, é mais rápido para o eletrodo de Au/MPA/GSH em relação ao de Au/MPA/CSH.

3.8. Redução Eletrocatalítica de H_2O_2 em Eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH

O processo de redução de H_2O_2 sobre a superfície de eletrodos de ouro é um processo não muito trivial, pois além do alto sobrepotencial necessário para favorecer a reação de redução, o seu potencial padrão de redução, em si, é elevado. O peróxido de hidrogênio altera o equilíbrio entre as espécies participantes do ciclo redox dos eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH e, portanto o perfil voltamétrico de transferência eletrônica do grupo RSH. Com isso, a quantificação indireta de H_2O_2 se torna possível, já que a relação entre as correntes de pico em ambos os eletrodos se altera como função da concentração do H_2O_2 na solução de eletrólito suporte. Na figura 23 são apresentados voltamogramas obtidos na presença e ausência de H_2O_2 utilizando-se os eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH, como eletrodos de trabalhos.

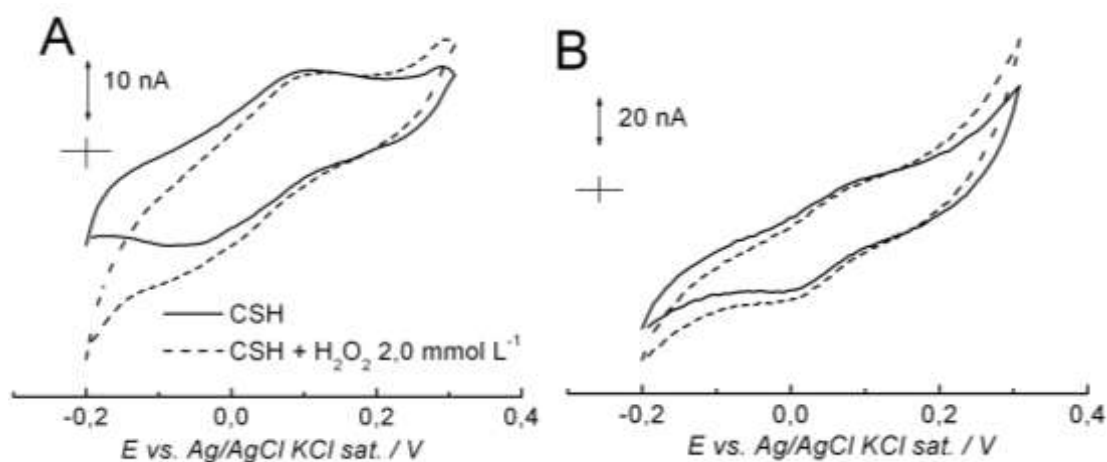
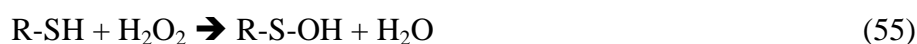
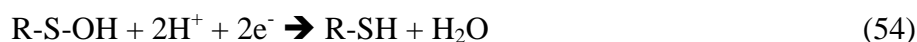


Figura 23: Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando os eletrodos de (A) Au/MPA/CSH e (B) Au/MPA/GSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a $0,01 \text{ V s}^{-1}$ na ausência e na presença de $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2 . $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_f = 0,3 \text{ V}$ e $E_r = -0,2 \text{ V}$.

Ambos os eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH apresentaram sensibilidade ao H_2O_2 para o processo de redução. Desta forma, as reações da molécula de H_2O_2 com os grupos eletroativos, presentes nas moléculas de CSH e GSH podem ser esquematizadas, conforme os equilíbrios abaixo:



Com isso, o processo de redução observado para os eletrodos modificados com CSH e GSH em presença de peróxido de hidrogênio na solução de eletrólito é resultante da redução do ácido sulfênico (R-S-OH) formado na reação (53). A redução desta espécie regenera o tiol, que novamente reage com moléculas de peróxido de hidrogênio, caracterizando o mecanismo de eletrocatalise, conforme abaixo:



Desta forma, o processo de oxidação durante a varredura reversa é suprimido, conforme se observou no voltamograma da figura 23A.

Foram realizados experimentos voltamétricos em diferentes velocidades de varredura. Na figura 24 são apresentados os resultados obtidos para o eletrodo de Au/MPA/CSH.

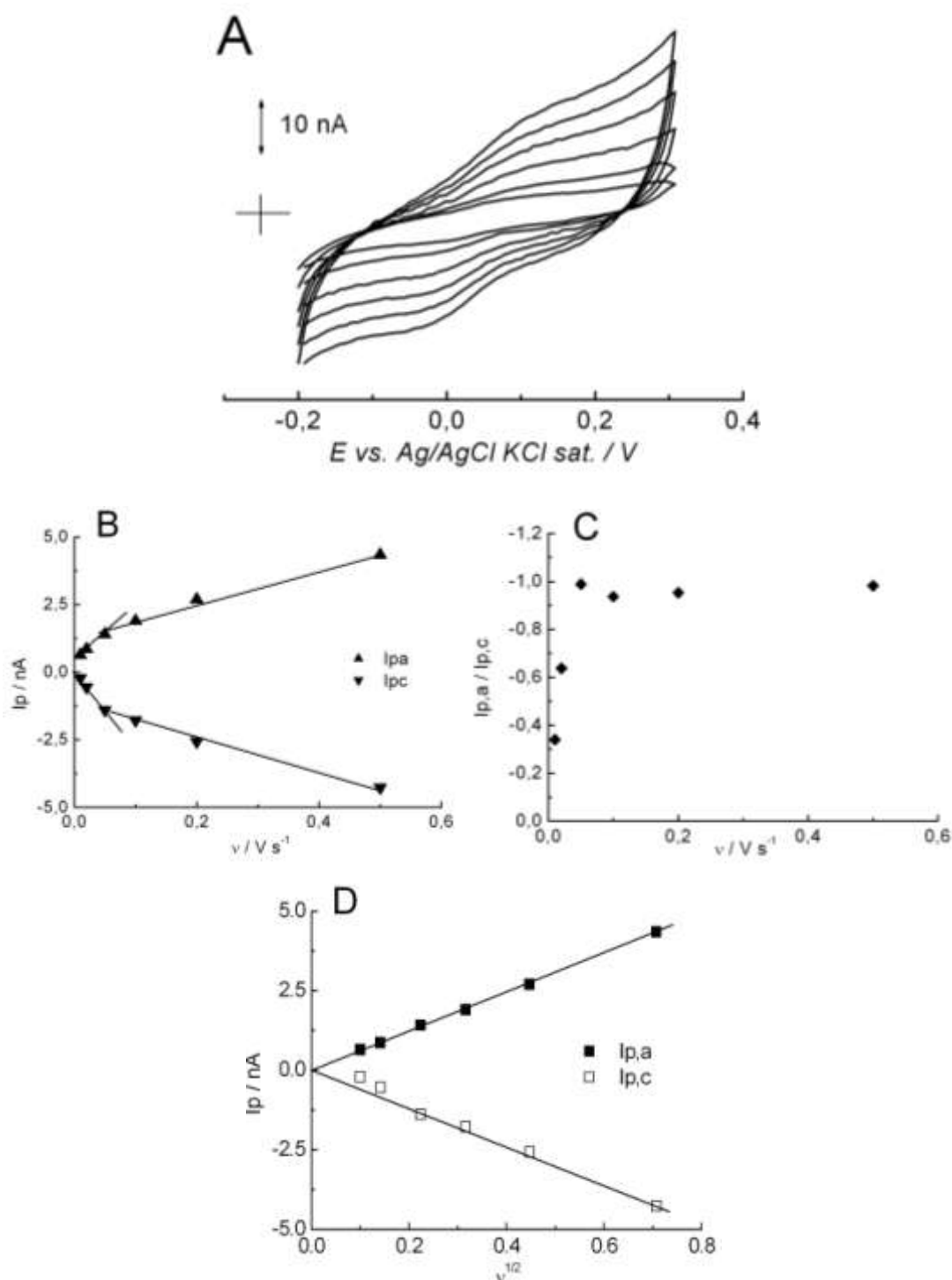
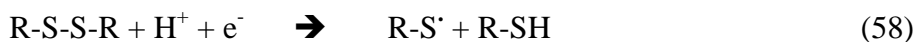
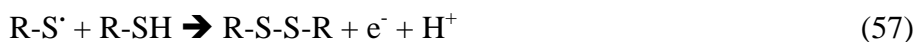


Figura 24: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 na presença de 10 mmol L^{-1} de H_2O_2 à diferentes velocidades de varredura. $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_f = +0,3 \text{ V}$ e $E_r = -0,2 \text{ V}$. (B) Curva de I_p versus v . (C) Curva de I_{pa}/I_{pc} versus v . (D) I_p versus $v^{1/2}$.

Os resultados apresentados na figura 24 mostram que para baixas velocidades de varredura a relação I_{pa}/I_{pc} apresenta baixo valor, indicando que I_{pc} é maior que I_{pa} em consequência do processo electrocatalítico.

Para valores de velocidade de varredura maiores que $0,05 \text{ V s}^{-1}$ a relação $I_{p,a}/I_{p,c}$ tende a unidade, demonstrando que o efeito eletrocatalítico não ocorre em velocidades de varredura elevadas. A linearidade das curvas de I_p versus $v^{1/2}$ demonstra que a molécula de peróxido de hidrogênio participa do processo redox, mesmo a velocidades de varredura maiores que $0,05 \text{ V s}^{-1}$, reação (56).

Uma das hipóteses para explicar o comportamento do eletrodo em velocidades de varredura superiores a $0,050 \text{ Vs}^{-1}$, seria considerar que a reação do H_2O_2 com os grupos RSH na superfície do eletrodo para formar o ácido sulfênico, responsável pelo efeito catalítico, reações (53) a (55), ocorre em diversas etapas, que podem ser descritas pelas reações (56) a (59). Um aumento na velocidade de varredura acarretaria, como consequência, a detecção de uma etapa intermediária, em que apenas 1 elétron está envolvido, reações (57) e (58). Em outras palavras, não haveria tempo para que a espécie responsável pelo efeito catalítico, o ácido sulfênico, RSOH, fosse formado.



Nesta condição as reações (57) e (58) seriam as etapas responsáveis pela relação de i_{pa}/i_{pc} próxima à unidade, condição em que o efeito eletrocatalítico não é observado.

Os mesmos experimentos foram realizados para o eletrodo de Au/MPA/GSH. Na figura 22 são apresentados os resultados obtidos.

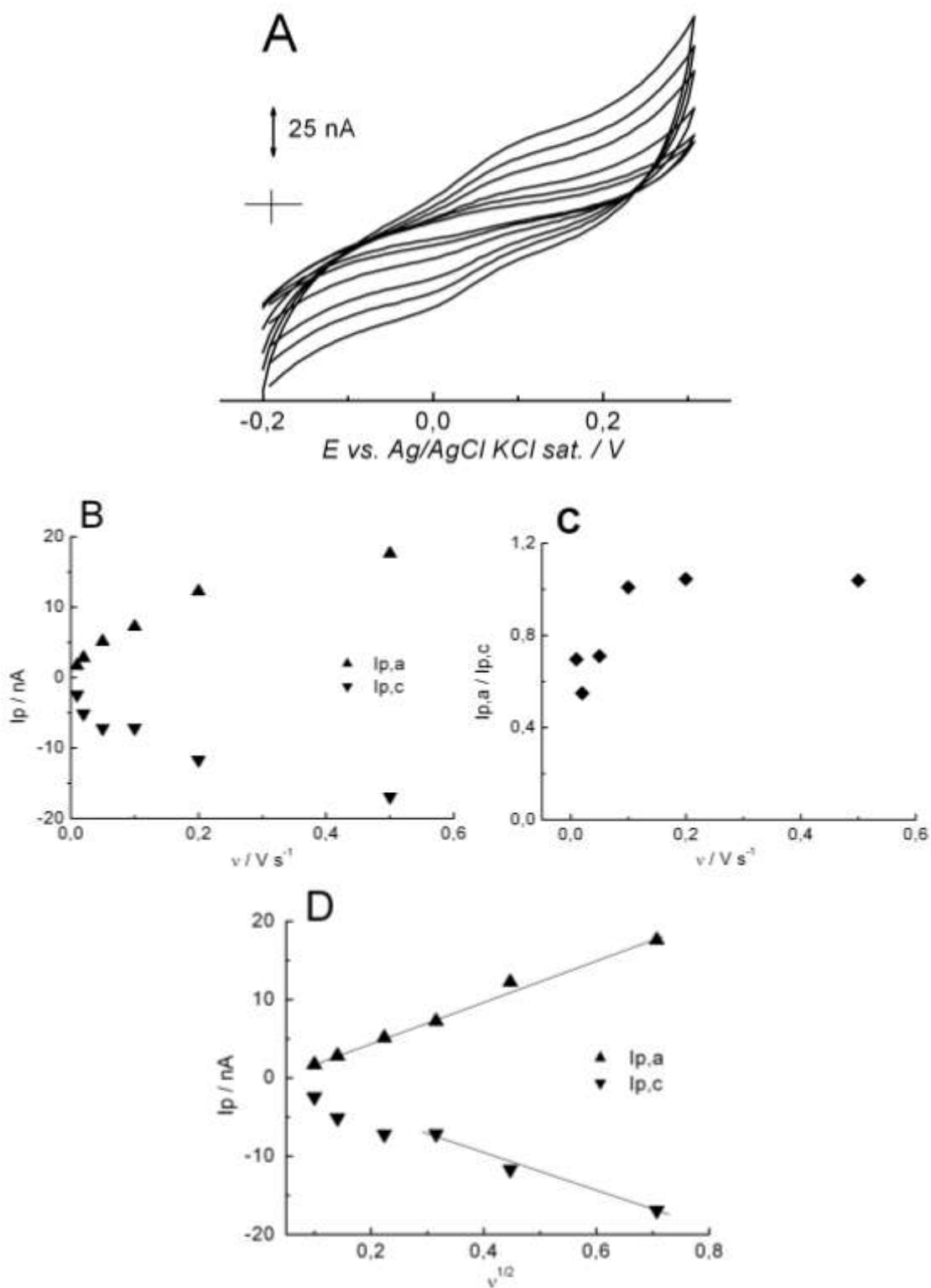


Figura 25: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/GSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de 10 mmol L^{-1} de H_2O_2 a diferentes velocidades de varredura. $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_f = 0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$. (B) Curva de I_p versus v . (C) Curva de $I_{p,a}/I_{p,c}$ versus v . (D) I_p versus $v^{1/2}$.

Como observado anteriormente na Figura 24, também na Figura 25, variações significativas na relação $I_{p,a} / I_{p,c}$, foram observadas para baixas velocidades de

varredura. A linearidade das curvas de I_p versus $v^{1/2}$ visualizada na figura 25D indica que a molécula de GSH age de maneira semelhante a de CSH e ambas reagem com H_2O_2 conforme a reação (56). A figura 25C mostra que a razão i_{pa}/i_{pc} tende à unidade a partir da velocidade de $0,1 \text{ Vs}^{-1}$, indicando que a reação (59) é mais rápida para a molécula de GSH e que o eletrodo de Au/MPA/GSH permite a determinação electrocatalítica de H_2O_2 , via formação de ácido sulfênico, reações (54) e (55), quando mais altas velocidades de varredura são utilizadas ($0,100 \text{ Vs}^{-1}$ para Au/MPA/GSH vs $0,050 \text{ Vs}^{-1}$ para Au/MPA/CSH). O fato da reação (59) ser mais rápida no eletrodo de Au/MPA/GSH em relação ao eletrodo de Au/MPA/CSH coincide com o maior poder antioxidante do GSH frente ao CSH.

Avaliou-se então, o efeito da concentração do peróxido de hidrogênio sobre os processos faradáicos obtidos nos eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH. Na figura 26 são apresentados os resultados obtidos para o eletrodo de Au/MPA/CSH.

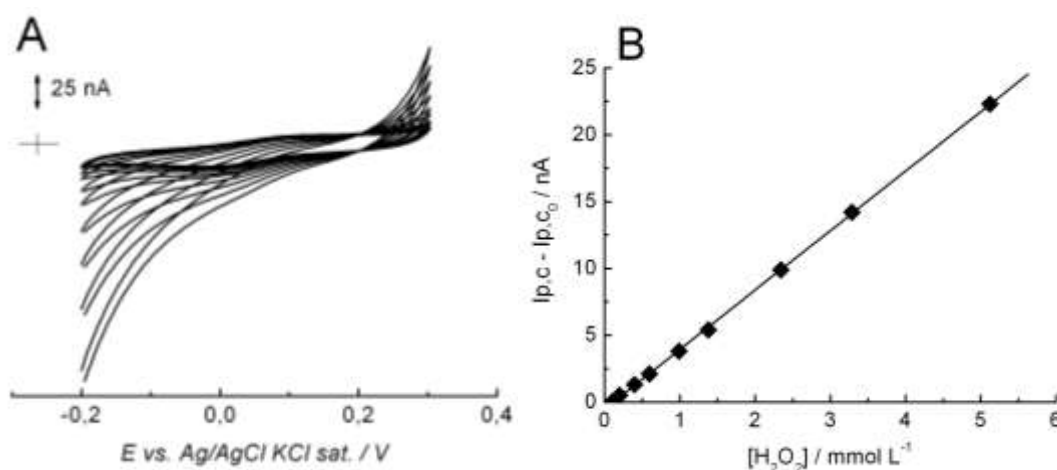


Figura 26: (A) Voltamogramas cíclicos do obtidos com o eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de diferentes concentrações de H_2O_2 . (B) Curva de $I_{p,c}$ versus $[H_2O_2]$. $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_f = 0,3 \text{ V}$ e $E_r = -0,2 \text{ V}$; $v = 0,01 \text{ V s}^{-1}$. $I_{p,c} = (0,519 \pm 0,054) \text{ nA} + (4,45 \pm 0,02)[H_2O_2 / \text{mmol L}^{-1}]$

À medida que a concentração de H_2O_2 solução aumenta, ocorre aumento significativo principalmente na corrente catódica visualizada na figura 26A. A partir da equação da regressão linear entre a corrente de pico catódica e a concentração de H_2O_2 foram calculados os limites de detecção, quantificação e a sensibilidade do eletrodo de Au/MPA/CSH para esta molécula.

$$I_{p,c} = (0,52 \pm 0,054) \text{ nA} + (4,45 \pm 0,02)[H_2O_2 / \text{mmol L}^{-1}]$$

$$\text{Sensibilidade} = \Delta I_{p,c} / \Delta [H_2O_2] / \text{Área} = 4,45 / 0,071 = \mathbf{0,063 \mu A \text{ mmol}^{-1} L \text{ cm}^{-2}}$$

$$\text{Limite de Detecção} = 3 \times 0,054 / 4,45 = \mathbf{0,036 \text{ mmol L}^{-1}}$$

$$\text{Limite de Quantificação} = 10 \times 0,054 / 4,45 = \mathbf{0,12 \text{ mmol L}^{-1}}$$

$$\text{Faixa Linear de Concentração: } \mathbf{0,12 - 5,1 \text{ mmol L}^{-1}}$$

O mesmo estudo foi realizado com o eletrodo de Au/MPA/GSH. Os resultados são mostrados na figura 27.

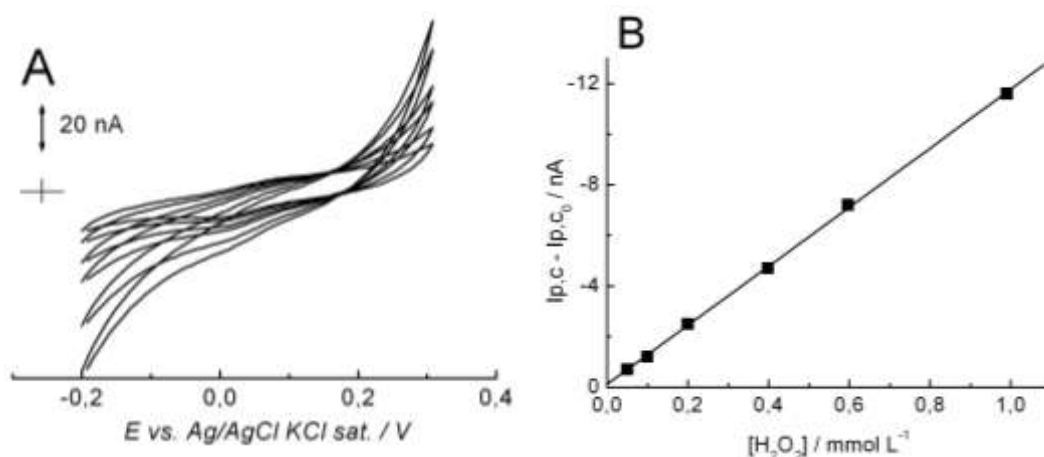


Figura 27: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de MPA/GSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de diferentes concentrações de H_2O_2 . (B) Curva de $I_{p,c}$ versus $[H_2O_2]$. $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_1 = 0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$; $v = 0,01 \text{ V s}^{-1}$. $I_{p,c} = (0,112 + 0,058) \text{ nA} + (11,66 + 0,12)[H_2O_2 / \text{mmol L}^{-1}]$

Na figura 27 são observados efeitos similares aos visualizados na figura 26. Ocorre aumento gradativo da corrente faradáica de redução com o aumento da concentração de H_2O_2 , de modo que, o mecanismo de redução eletrocatalítica do H_2O_2 no eletrodo de Au/MPA/GSH é semelhante ao ocorrido para o de Au/MPA/CSH (figura 26). A regressão linear apresentada na figura 27B foi obtida utilizando os valores de corrente para cada concentração de peróxido de hidrogênio. As medições de corrente foram efetuadas em potenciais correspondentes aos potenciais de pico do sistema GSSG/GSH, na ausência de H_2O_2 .

$$I_{p,c} = (0,112 + 0,058) \text{ nA} + (11,66 + 0,12)[\text{H}_2\text{O}_2 / \text{mmol L}^{-1}]$$

$$\text{Sensibilidade} = \Delta I_{p,c} / \Delta[\text{H}_2\text{O}_2] / \text{Área} = 11,7 / 0,071 = \mathbf{0,17 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}}$$

$$\text{Limite de Detecção} = 3 \times 0,058 / 11,66 = \mathbf{0,015 \text{ mmol L}^{-1}}$$

$$\text{Limite de Quantificação} = 10 \times 0,058 / 11,66 = \mathbf{0,050 \text{ mmol L}^{-1}}$$

$$\text{Faixa Linear de Concentração Detectável: } \mathbf{0,050 - 1,0 \text{ mmol L}^{-1}}$$

Os valores dos parâmetros obtidos demonstram que é possível realizar a determinação de peróxido de hidrogênio por voltametria cíclica utilizando ambos os eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH. A maior sensibilidade do eletrodo de Au/MPA/GSH em relação ao de Au/MPA/CSH ocorre em consequência da maior velocidade de reação de formação do ácido sulfênico (reação 59) para a molécula de GSH em relação à CSH.

3.9. Determinação Amperométrica de H₂O₂ usando os eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH

O processo de redução de H₂O₂ sobre os eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH em baixos valores de potenciais de trabalho facilita a eliminação de interferentes que supostamente seriam reduzidos em potenciais mais negativos. Quanto menos negativo for o potencial aplicado, menor é a chance de ocorrerem processos paralelos. Deste modo, a técnica amperométrica foi utilizada na determinação de H₂O₂ com os eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH. Os resultados obtidos usando os eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH são apresentados nas figuras 28 e 29, respectivamente.

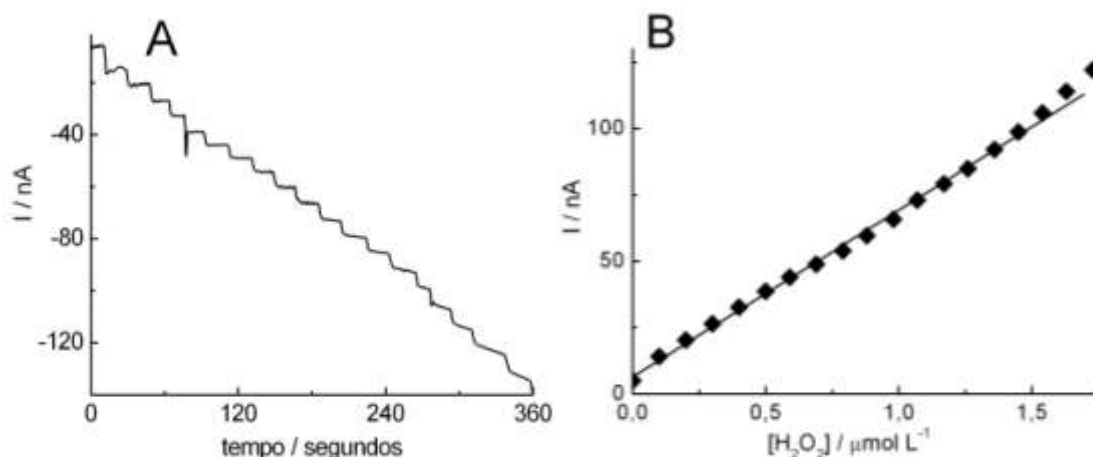


Figura 28: (A) Amperograma obtido usando o eletrodo de Au/MPA/CSH - Detecção de H_2O_2 em uma célula eletroquímica contendo solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2. $E_{ap} = -0,1 \text{ V}$. (B) Curva Analítica: $I_{\text{catódica}}$ versus $[\text{H}_2\text{O}_2]$.

A figura 28 mostra que a corrente de redução varia linearmente com a concentração de H_2O_2 até o valor de $1,45 \text{ mmol L}^{-1}$. Através dos valores inclinação e intercepto da curva obtida pela regressão foi possível determinar a sensibilidade do método e o limite de detecção.

$$I_f = (6,41 \pm 0,69) (10^{-9} \text{ A}) + (62,82 \pm 0,76) (10^{-9} \text{ A} / \mu\text{mol L}^{-1}) [\text{H}_2\text{O}_2]$$

$$\text{Sensibilidade} = \Delta I_{p,c} / \Delta [\text{H}_2\text{O}_2] / \text{Área} = 62,82 / 0,071 = \mathbf{0,89 \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}}$$

$$\text{Limite de Detecção} = 3 \times 0,69 / 62,82 = \mathbf{0,033 \mu\text{mol L}^{-1}}$$

$$\text{Limite de Quantificação} = 10 \times 0,69 / 62,82 = \mathbf{0,11 \mu\text{mol L}^{-1}}$$

$$\text{Faixa Linear de Concentração Detectável: } \mathbf{0,11 \text{ a } 1,45 \mu\text{mol L}^{-1}}$$

O mesmo procedimento foi realizado usando o eletrodo modificado de Au/MPA/GSH. Os resultados obtidos são apresentados na figura 29.

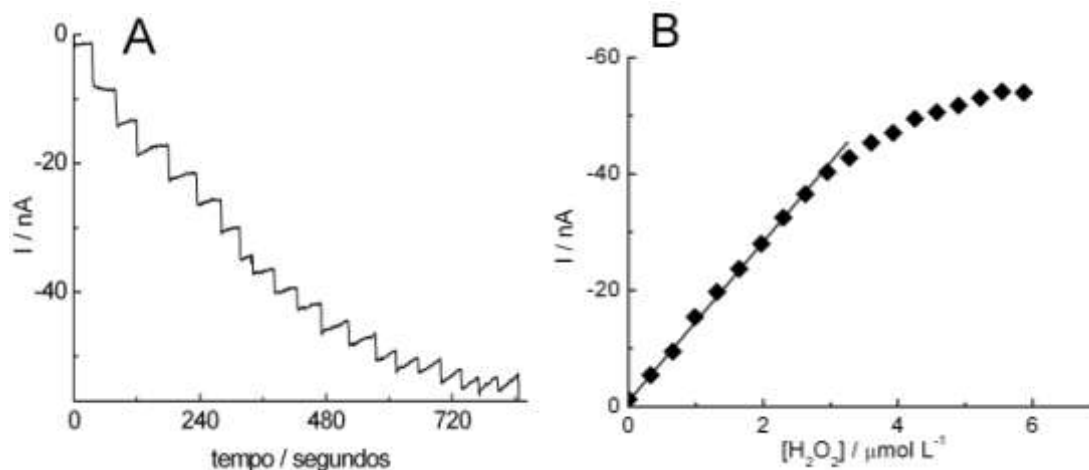


Figura 29: (A) Amperograma obtido usando o eletrodo de Au/MPA/GSH – Detecção de H_2O_2 em uma célula eletroquímica contendo solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2. $E_{ap} = -0,1 \text{ V}$. (B) Curva Analítica: $I_{\text{catódica}}$ versus $[\text{H}_2\text{O}_2]$.

A Figura 29 mostra que para concentrações de H_2O_2 maiores que $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ a corrente de redução deixa de variar linearmente com a concentração permanecendo constante. A sensibilidade e o limite de detecção para o método desenvolvido foram calculados com base nos valores de inclinação e intercepto da curva analítica obtida.

$$I_f = (1,38 \pm 0,317) (10^{-9} \text{ A}) + (13,41 \pm 0,18) (10^{-9} \text{ A} / \mu\text{mol L}^{-1}) [\text{H}_2\text{O}_2]$$

$$\text{Sensibilidade} = \Delta I_{p,c} / \Delta [\text{H}_2\text{O}_2] / \text{Área} = 13,41 / 0,071 = \mathbf{0,19 \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}}$$

$$\text{Limite de Detecção} = 3 \times 0,317 / 13,41 = \mathbf{0,071 \mu\text{mol L}^{-1}}$$

$$\text{Limite de Quantificação} = 10 \times 0,317 / 13,41 = \mathbf{0,24 \mu\text{mol L}^{-1}}$$

$$\text{Faixa Linear de Concentração Detectável: } \mathbf{0,24 \text{ a } 3,0 \mu\text{mol L}^{-1}}$$

Os dados obtidos demonstram que os eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH podem ser utilizados para detecção amperométrica de H_2O_2 . O eletrodo de Au/MPA/CSH apresentou maior sensibilidade e menor limite de detecção em relação ao eletrodo de Au/MPA/GSH, porém este último apresenta maior faixa de resposta linear.

3.10. Adsorção de íons Cu^{2+} sobre os Eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH

Ambos os eletrodos, Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH, podem favorecer a adsorção de metais, realizou-se a adsorção de íons Cu^{2+} sobre a superfície dos mesmos, conforme descrito no item 2.13, avaliando-se o efeito do metal sobre os processos redox dos grupos CSH e nos dois eletrodos modificados. Os voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/CSH após adsorção de Cu^{2+} são apresentados na figura 30.

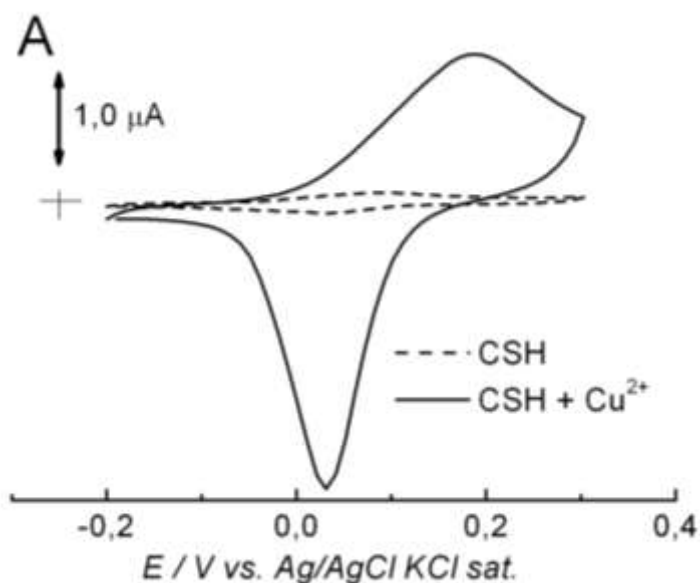


Figura 30: Voltamogramas cíclicos obtido com o eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 antes e após a adsorção de íons cobre, conforme descrito no item 2.13. $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_l = 0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$; $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

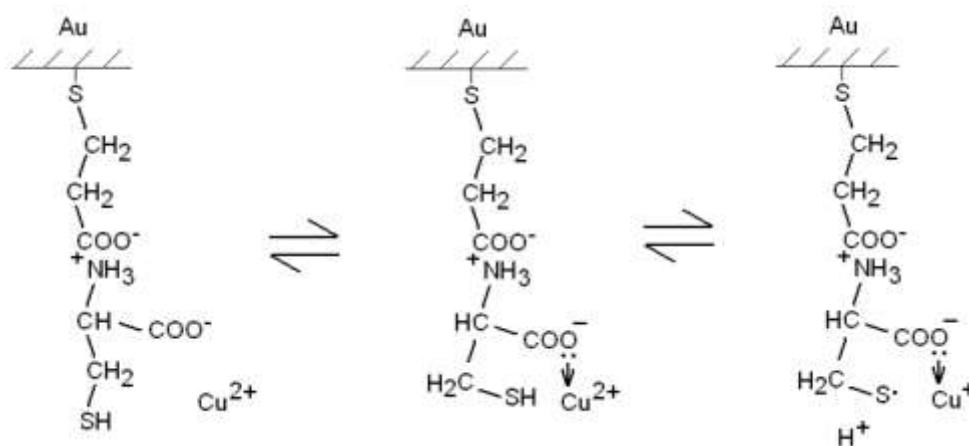
Observou-se, conforme a Figura 30, que após a imersão do eletrodo de Au/MPA/CSH em solução de Cu^{2+} por 5 minutos, ocorre aumento das correntes de pico anódica e catódica em relação ao voltamograma obtido antes imersão. Este fato se deve à incorporação de íons Cu^{2+} sobre a superfície do eletrodo de Au/MPA/CSH. Um novo processo redox passa a fazer parte do processo de transferência eletrônica já existente. Foram calculados os valores de α e n' usando os valores de E_p e $E_p/2$, correspondentes ao processo catódico e anódico após a adsorção de íons Cu^{2+} (sessão 2.13) sobre o eletrodo de Au/MPA/CSH.

Os valores obtidos de 0,70 e 2,17 para α e n' demonstraram que o novo processo redox estabelecido na superfície do eletrodo de Au/MPA/CSH após a adsorção de íons cobre é mais favorecido na direção catódica. O acréscimo da intensidade das

correntes de pico, em relação aos resultados obtidos na sua ausência do metal se deve ao aumento do número de elétrons por mol de espécies envolvidas na reação redox.

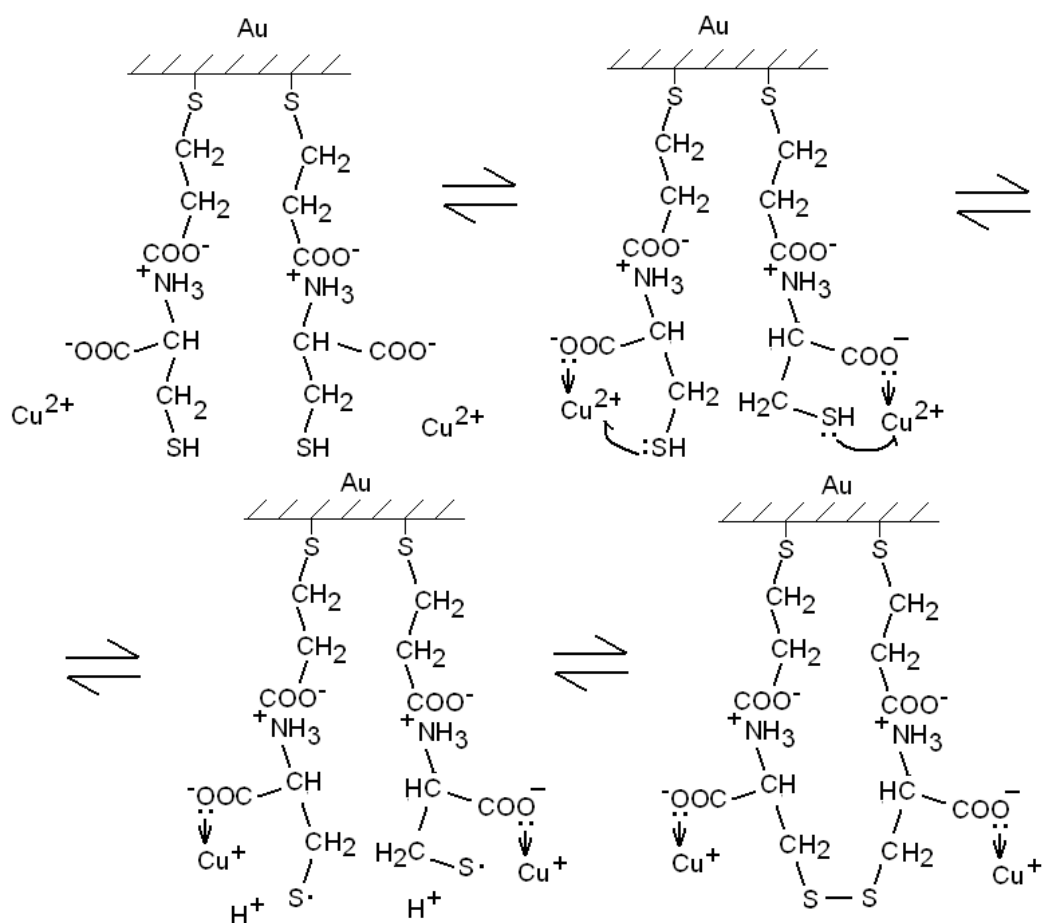
Através da equação (14), calculou-se o recobrimento superficial correspondente à espécie responsável pelo processo redox sobre a superfície do eletrodo, sendo o valor encontrado igual a $1,98 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$. Este valor é próximo ao calculado para o eletrodo de Au/MPA/CSH na ausência do metal e pode indicar que cada íon Cu^{2+} se liga a uma molécula de CSH e que, na condição de máxima saturação de metal, a adsorção pode ocorrer independente do grau de desprotonação dos grupos tiólicos. Se esta hipótese for correta o processo de adsorção pode ocorrer via coordenação do metal com o grupo carboxila ($-\text{COOH}$) que, na condição de pH experimental utilizada, está completamente ionizado e portanto na forma de carboxilato ($-\text{COO}^-$).

Uma possibilidade para descrever o processo de adsorção de Cu^{2+} sobre o eletrodo de Au/MPA/CSH é apresentada no esquema 12.



Esquema 12: Adsorção de íons Cu^{2+} sobre o eletrodo de Au/MPA/CSH.

A proximidade dos íons Cu^{2+} do grupo tiólico da molécula de CSH pode favorecer a oxidação deste grupo, originando o radical tioil à custa da redução do íon Cu^{2+} a Cu^+ , conforme é proposto esquema 12. Isto demonstra o efeito oxidante do íon Cu^{2+} , pois à medida que o processo de formação do radical tioil é facilitado, a formação da ponte de dissulfeto também é favorecida, justamente pela presença de radicais em moléculas de cisteína em moléculas adjacentes. Este mecanismo é esquematizado na no esquema 13.



Esquema 13: Mecanismo de formação da ponte de dissulfeto após a adsorção de íons Cu^{2+} sobre o eletrodo de Au/MPA/CSH.

Após a adsorção de Cu^{2+} , o potencial de pico catódico observado no voltamograma cíclico obtido com o eletrodo de Au/MPA/CSH é semelhante ao observado na ausência do metal. Isto indica, que em ambas as situações a reação de redução corresponde à quebra da ponte de dissulfeto. Após a adsorção de cobre, o processo de oxidação foi observado em potencial mais positivo do que aquele observado na ausência de metal. Este é um indicativo de que a reação anódica ocorre através de reação diferente da observada para o eletrodo antes da incorporação do metal. Assim, o processo anódico foi atribuído à oxidação de íons Cu^+ , produzidos durante a reação entre os grupos tiólicos, CSH, e o metal. O deslocamento do potencial de pico pode decorrer da dificuldade do tunelamento de elétrons entre o íon de Cu^+ solvatado e a superfície do eletrodo. A figura 31 mostra o espectro de SERS da superfície do eletrodo de Au/MPA/CSH antes e após a adsorção de íons Cu^{2+} .

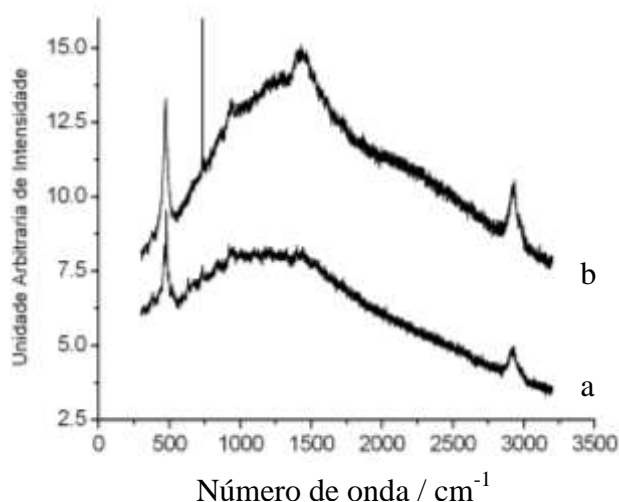


Figura 31: Espectros de Raman de superfície do eletrodo de Au/MPA/CSH obtidos antes (a) e após (b) a adsorção de íons Cu^{2+} a sua superfície.

A figura 31 mostra a presença de uma banda por volta de 500 cm^{-1} , atribuída à formação da ponte de dissulfeto, presente tanto antes como depois da adsorção do metal. O aumento significativo da intensidade de corrente de pico de redução da ponte de dissulfeto pode ser devido ao efeito oxidante do íon Cu^{2+} , que favorece a formação de radicais tioil, precursores da formação da ponte (RSSR).

Íons Cu^{2+} foram também adsorvidos na superfície de eletrodos de Au/MPA/GSH como previamente descrito no item 2.13. Os voltamogramas obtidos antes e após a imersão do eletrodo de Au/MPA/GSH em solução de Cu^{2+} são apresentados na figura 32.

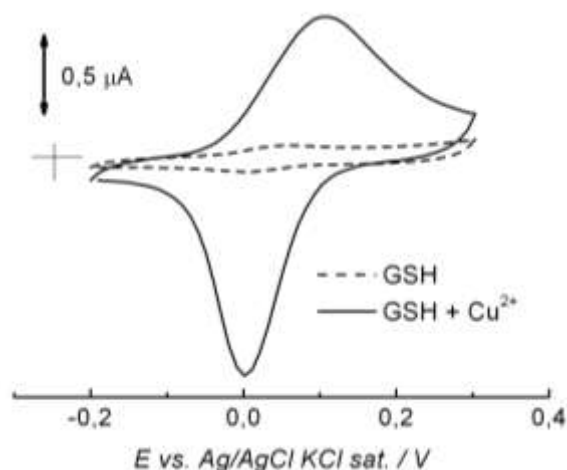


Figura 32: Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/GSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ antes e após adsorção de íons cobre conforme descrito no item 2.13. Condições Experimentais: $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_f = 0,3 \text{ V}$ e $E_r = -0,2 \text{ V}$. $\nu = 0,10 \text{ V s}^{-1}$.

No eletrodo de MPA/GSH, observou-se fenômeno semelhante ao já observado com o eletrodo de Au/MPA/CSH, figura 30. Usando-se os valores de E_p e $E_p/2$ determinaram-se os valores de 0,61 e 2,2 para α e n' , respectivamente, para o eletrodo de Au/MPA/GSH após a adsorção de Cu^{2+} . O valor de α mais baixo indica que o efeito de deslocamento do equilíbrio redox, causado pelo aumento a espécie oxidada (RSSR), após a adsorção de Cu^{2+} , é menos intenso que o observado para o eletrodo de Au/MPA/CSH. Também foram obtidos espectros SERS da superfície deste eletrodo antes e após a adsorção do metal. Os resultados são apresentados na figura 33.

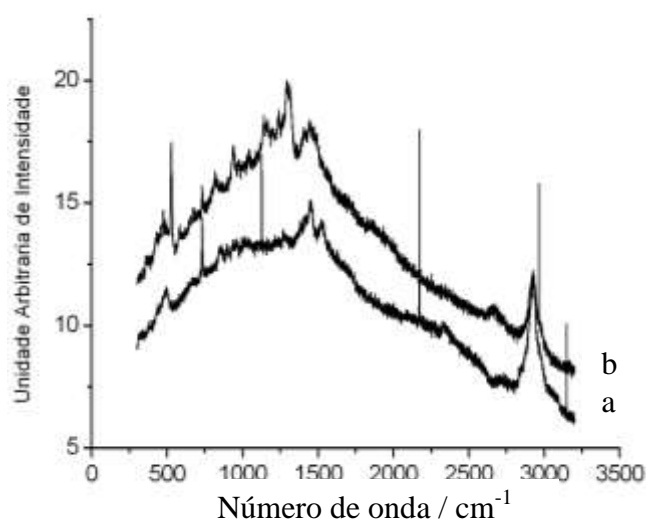


Figura 33: Espectros Raman de superfície do eletrodo de Au/MPA/GSH obtidos antes (a) e após (b) a adsorção de íons Cu^{2+} a sua superfície.

Devido ao efeito complexante da molécula de GSH, que atua de maneira a manter uma esfera de coordenação rígida do metal, observou-se que a banda a 500 cm^{-1} , devido à presença da ponte de dissulfeto após a adsorção de íons Cu^{2+} , possui menor intensidade em relação àquela apresentada na figura 30. Deste modo, a formação de pontes de dissulfeto entre radicais adjacentes é dificultada, sendo possível que estes participem da esfera de coordenação do átomo de cobre adsorvido sobre o eletrodo de Au/MPA/GSH.

Correntes de pico menores para o eletrodo de Au/MPA/GSH em relação ao de Au/MPA/CSH eram esperadas devido à menor quantidade de moléculas de GSH na superfície do eletrodo, indicativo de que a espécie GSH é, em tese, responsável pela adsorção dos íons Cu^{2+} sobre os eletrodos. A figura 34 apresenta as comparações entre os voltamogramas obtidos com os eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH antes e após imersão em solução de Cu^{2+} .

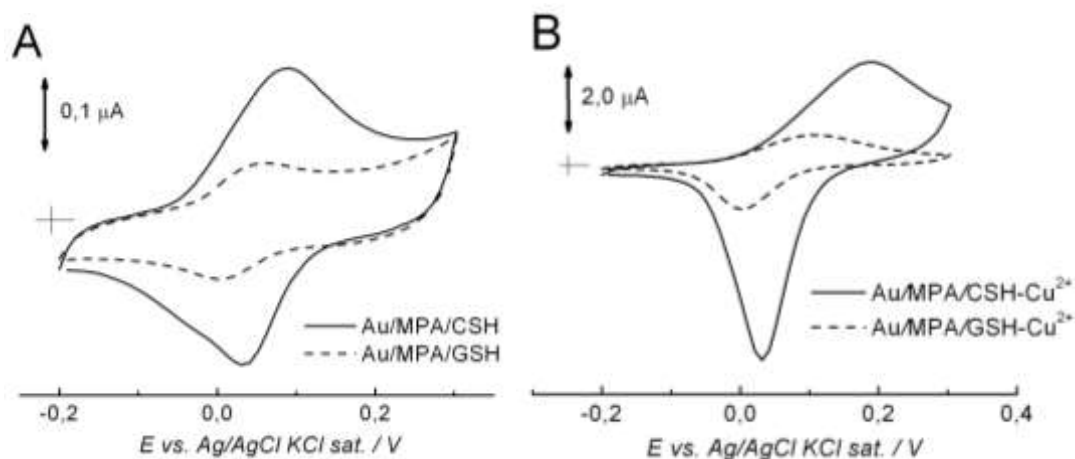


Figura 34: Voltamogramas cíclicos obtidos com os eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 (A) antes e (B) após adsorção de íons cobre conforme o item 2.13. $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_\lambda = 0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$; $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

3.11. Eletrodos Modificados com Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH após adsorção de íons de Cu^{2+} - Parâmetros Termodinâmicos

Para a determinação do mecanismo da reação redox sobre os eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH após a adsorção de íons Cu^{2+} , efetuada conforme descrito no item 2.13, voltamogramas cíclicos foram obtidos como função do pH do meio, avaliando-se a variação dos potenciais e correntes de pico. Os resultados obtidos com o eletrodo de Au/MPA/CSH são apresentados na figura 35.

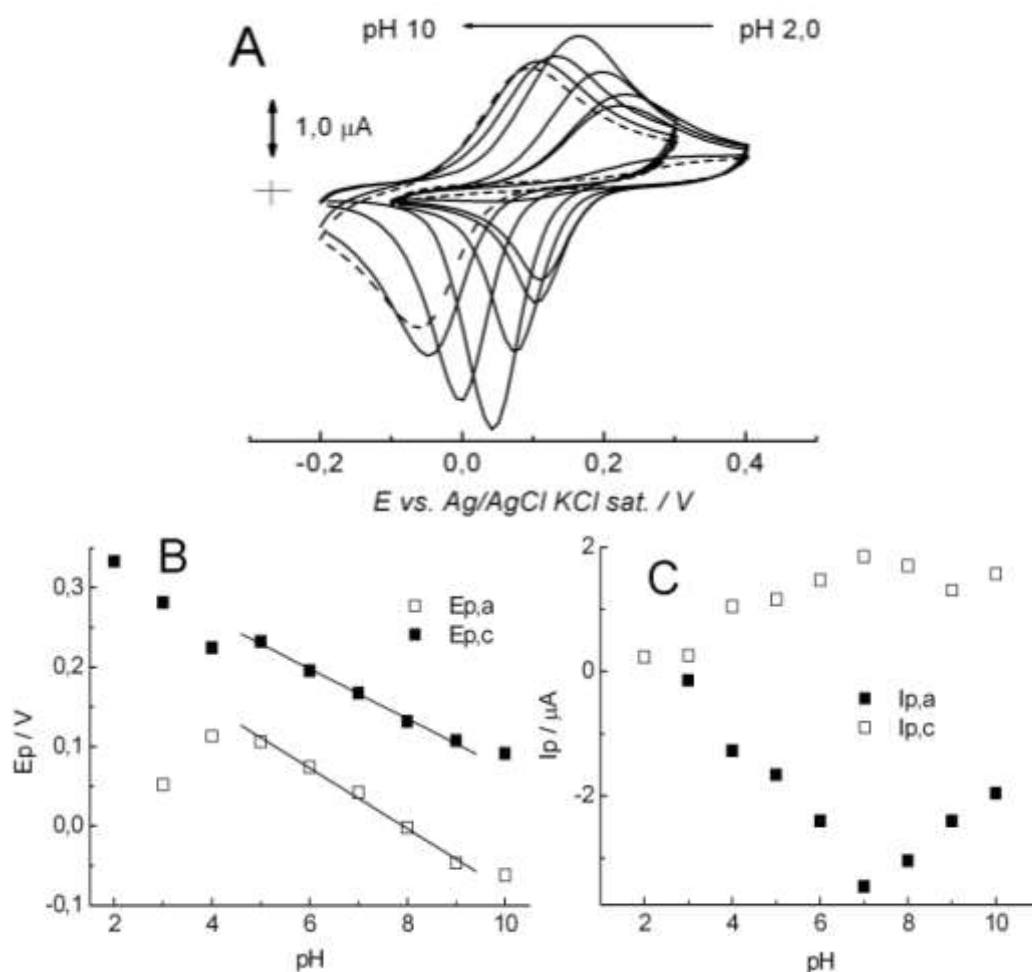


Figura 35: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em diferentes valores de pH com o eletrodo de Au/MPA/CSH, após adsorção de íons cobre. (B) Curvas de E_p versus pH ($E_{p,c} = 0.302 - 0.038 \text{ pH}$ e $E_{p,a} = 0.386 - 0.031 \text{ pH}$). (C) I_p versus pH. $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_\lambda = +0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$; $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

A figura 35 mostra que ao variar o pH do meio, os valores de potenciais e correntes de pico sofrem alteração significativa. Em $5,0 \leq \text{pH} \leq 9,0$ os potenciais de pico variam linearmente com o pH (Figura 35 B), enquanto para valores de pH menores que 3,0 ocorre queda brusca do valor das correntes de pico, fato atribuído à protonação do grupo carboxila, presente na moléculas de CSH, com subsequente lixiviamento do íon Cu^{2+} da superfície do eletrodo. De maneira semelhante à realizada no item 3.6., o número de prótons participantes das etapas de transferência eletrônica envolvidas no equilíbrio redox foram calculados a partir dos valores das inclinações das curvas E_p versus pH.

O valor determinado de $n(\text{H}) / n = 0,59$ indica que um próton está acoplado à transferência de dois elétrons no processo redox, o que é característico do mecanismo de

redução e quebra da ponte de dissulfeto. O valor obtido foi mais baixo do que aquele observado na ausência de íons Cu^{2+} . Devido ao efeito oxidante do cobre, a presença deste metal favorece deslocamento do equilíbrio redox RSSR/RSH na direção anódica. Como consequência, a formação da espécie radicalar tioil, em uma etapa química, também é favorecida. Evidentemente, a influência do pH sobre o processo redox reflete a participação de íons H^+ na reação de quebra da pontes de dissulfeto, o que explica a queda de correntes de redução para valores mais elevados de pH.

Por sua vez, o efeito estabilizador dos íons Cu^{2+} sobre os radicais tioil sobre justifica a variação do potencial de pico anódico para regiões mais positivas de potencial e faz com que ocorra pouca variação de intensidade da corrente anódica como função do pH, figura 35C. A diminuição acentuada do valor da corrente de pico catódica em função do aumento de pH está diretamente ligada à baixa acidez do meio, já que o íon H^+ participa da quebra e redução da ponte de dissulfeto. Para valores de pH elevados ocorre a formação de hidróxido de cobre sobre a superfície do eletrodo que, por consequência, minimiza o efeito do metal sobre o equilíbrio de formação de pontes de dissulfeto, estabilização dos radicais tioil podendo ainda bloquear a superfície do eletrodo.

Na figura 36 são apresentados os resultados obtidos com o eletrodo de Au/MPA/GSH.

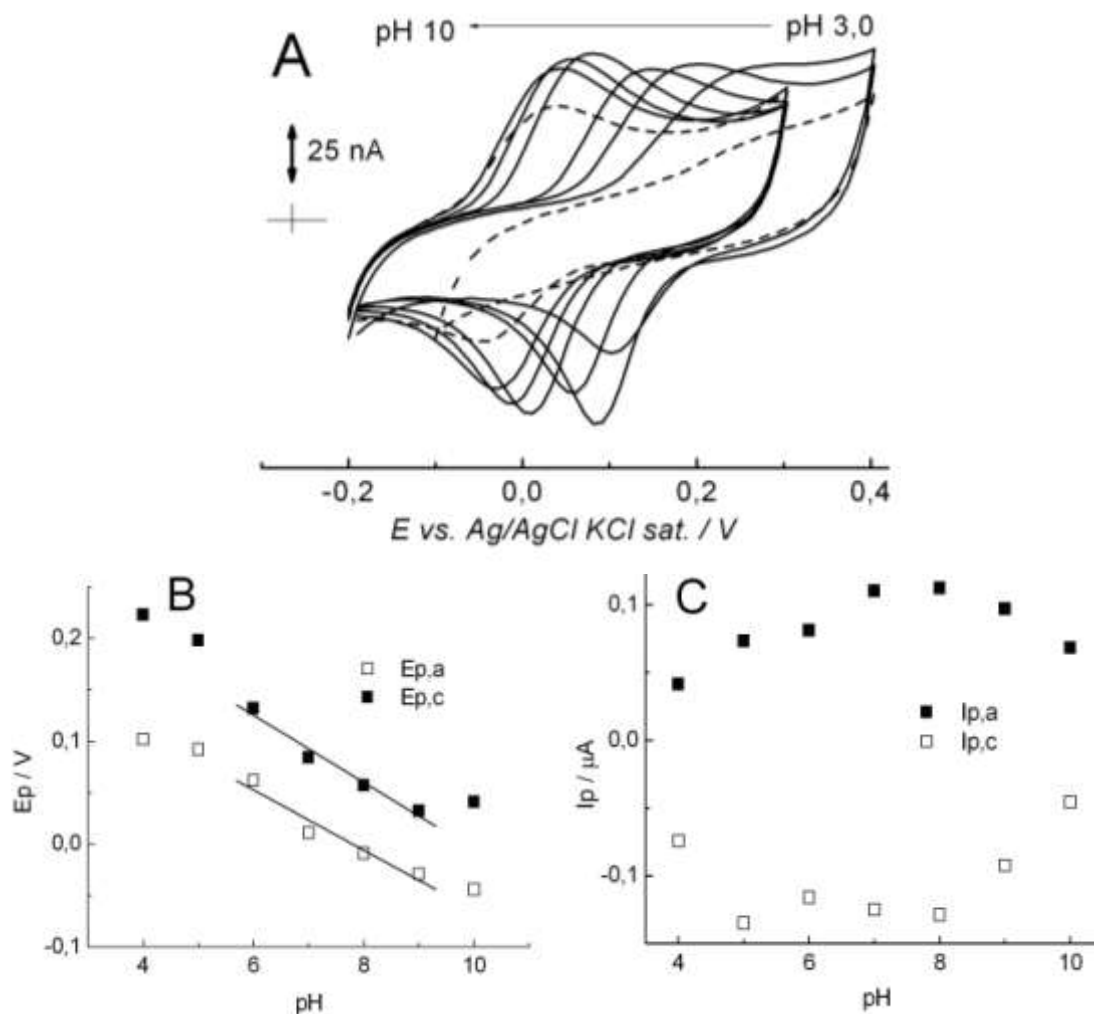


Figura 36: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/GSH, após adsorção de íons Cu^{2+} , em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores pH (B) Curvas de E_p versus pH ($E_{p,c} = 0,228 - 0,029 \text{ pH}$ e $E_{p,a} = 0,322 - 0,033 \text{ pH}$). (C) Curvas I_p versus pH. Condições Experimentais: $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_\lambda = 0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$ e $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

Fenômenos semelhantes aos observados para o eletrodo de Au/MPA/CSH foram observados também para o eletrodo de Au/MPA/GSH, figura 36. A partir dos valores de $\Delta E_p / \Delta \text{pH}$ calculou-se a relação entre prótons e elétrons durante as etapas de transferência eletrônica.

A partir das equações (30) e (31) obteve-se o valor de 0,52 para a relação de $n(\text{H}) / n^e$. Isto indica que as considerações feitas para o eletrodo de Au/MPA/CSH valem também quando o tiol é a glutathiona. A figura 36C mostra que as correntes de pico catódicas variam pouco no intervalo de pH entre 5,0 e 8,0, provavelmente devido à maior quantidade de grupos quelantes na molécula de GSH em comparação à de CSH, são 2 grupos carboxilatos na molécula de GSH contra 1 na molécula de CSH. Isto

dificulta o deslocamento do metal por efeito de protonação dos grupos quelantes, pois caso um grupo carboxilato esteja protonado em determinado pH, o outro poderá estar disponível para alojar o íon positivo de cobre. Para valores de pH maiores que 8,0 ocorre diminuição das correntes do pico catódico, pois não há concentração suficiente de íons H^+ em solução, necessária para o processo de redução e quebra da ponte de dissulfeto. Como anteriormente, a diminuição das correntes de oxidação para valores de pH mais elevados se deve à formação de hidróxidos de cobre, evitando assim a oxidação dos grupos tiólicos da molécula de GSH aos respectivos tioradicaís.

3.12. Eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH após Adsorção de íons de Cu^{2+} - Estudo Cinético

A determinação dos parâmetros cinéticos associados às reações que descrevem o mecanismo de resposta dos eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH após a adsorção dos íons Cu^{2+} , foi realizada de maneira semelhante àquela descrita no item 3.7., usando os valores de potenciais e correntes de pico. Na figura 37 são apresentados os resultados obtidos para o eletrodo de Au/MPA/CSH após adsorção de Cu^{2+} .

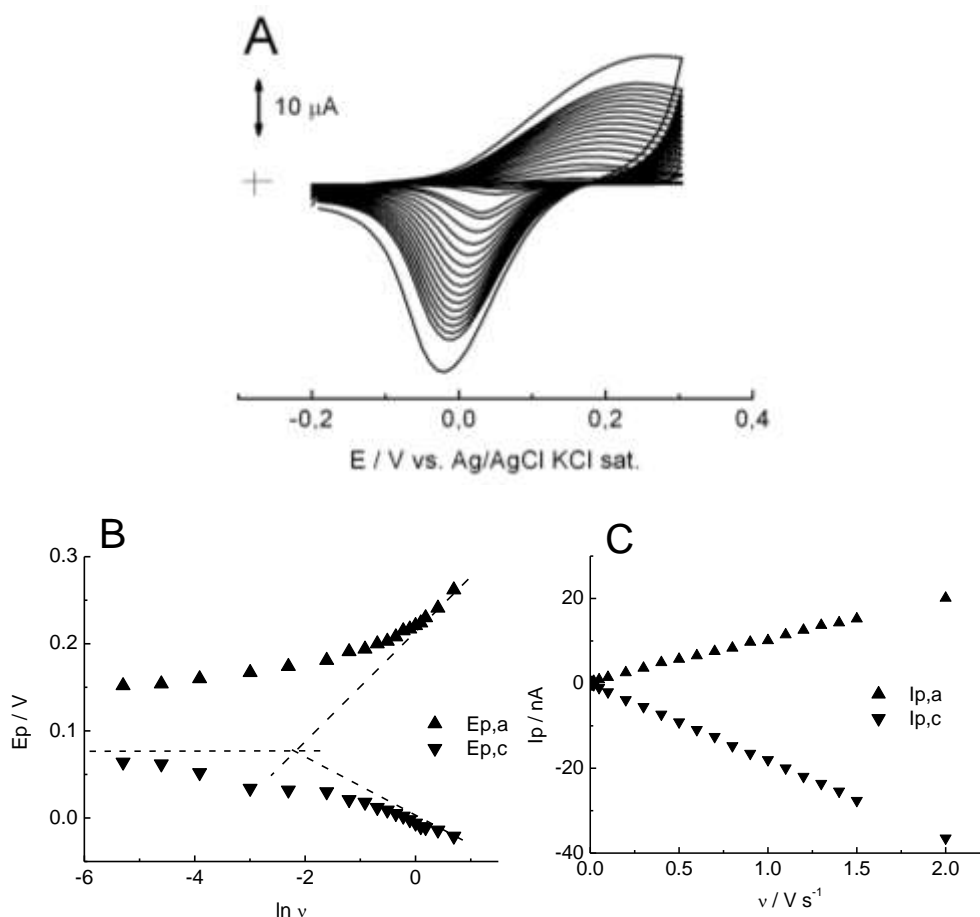


Figura 37: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/CSH, após adsorção de íons cobre, em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes velocidades de varredura. (B) Curvas de E_p versus $\ln v$ e (C) I_p versus v . ($I_{p,c} = - (17,97 \pm 0,8) 10^{-6} (\text{A} / \text{V s}^{-1}) v$ $R = 0,9992$; $I_{p,a} = (10,08 \pm 0,30) 10^{-6} (\text{A} / \text{V s}^{-1}) v$ $R = 0,9994$). Condições Experimentais: $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_\lambda = 0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$.

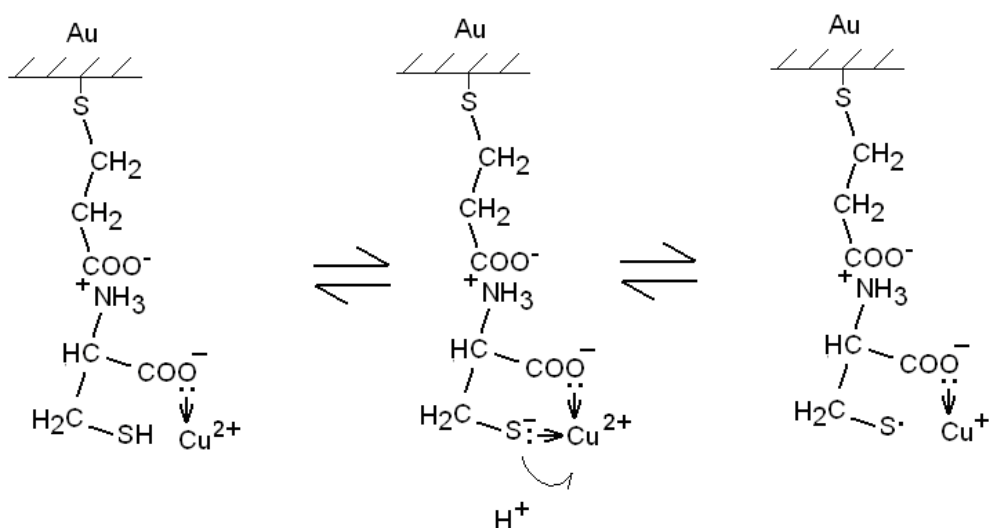
A figura 37 mostra que as correntes de pico variam linearmente com a velocidade de varredura de modo que o processo redox observado ocorre com o envolvimento de espécies adsorvidas sobre a superfície do eletrodo. Para valores de velocidade de varredura maiores que $1,0 \text{ V s}^{-1}$ ocorre perda da linearidade das curvas de $I_{p,a}$ e $I_{p,c}$ em função de v , pois não há tempo para que as reações químicas acopladas ao processo eletroquímico se processem. A partir das inclinações das curvas $I_{p,a}$ e $I_{p,c}$ versus v , para velocidades de varredura menores que $1,0 \text{ V s}^{-1}$, calculou-se o valor da quantidade de material eletroativo presente na superfície do eletrodo utilizando as equações (19) e (20). Foram obtidos os valores de $\Gamma_0 = 2,80 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ e $\alpha = 0,64$.

O valor determinado de α está em boa concordância com o valor obtido usando os dados apresentados na Figura 21, obtidos em pH 7,2, sessão 3.7; enquanto o valor de

Γ_0 é equivalente à quantidade de moléculas de CSH sobre o eletrodo. Estes dados indicam que o íon Cu^{2+} age deslocando o próton do grupo tiólico presente na molécula de CSH. Conforme já discutido na sessão 3.7, o processo redox é iniciado por moléculas desprotonadas de CSH.

A obtenção das constantes de transferência eletrônica entre as moléculas eletroativas e a superfície do eletrodo de Au/MPA/CSH, após a adsorção de Cu^{2+} , foi realizada a partir dos valores de $E_{p,a}$ e $E_{p,c}$ registrados na condição onde $\ln v = 0$. Através das equações (32) e (33) os valores das constantes $k_{s,f}$ e $k_{s,b}$ foram calculados. O valor de E° foi obtido através da figura 37B.

Os valores obtidos para $k_{s,f}$ e $k_{s,b}$ foram $1,84 \text{ s}^{-1}$ e $3,49 \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Estes resultados indicam uma diminuição das velocidades de transferência eletrônica entre as moléculas eletroativas e a superfície do eletrodo. O valor de $k_{s,b}$ é semelhante ao valor de $k_{s,b2}$ obtido com o eletrodo de Au/MPA/CSH na ausência de cobre, admitindo-se então que este valor corresponde à redução de radicais tioil formados. A ausência do primeiro processo de redução $k_{s,b1}$ indica que a redução do radical tioil a íon tiolato ocorre diretamente, de modo que a quebra da ponte de dissulfeto ocorre em etapa química anterior ao processo de redução, sendo esta uma reação química mediada pelos íons Cu^{2+} , gerados no processo de oxidação. Este fato mostra que o metal exerce efeito semelhante ao do íon H^+ na quebra da ponte de dissulfeto, efeito este que se propõe, ocorra de acordo com o Esquema 14.



Esquema 14: Mecanismo proposto de manutenção dos grupos tioil sobre o eletrodo de Au/MPA/CSH exercido por íons de cobre.

Admite-se que, nesta condição, $k_{s,f}$ se refere a oxidação do íon Cu^+ que é formado após oxidar os íons tiolato ao respectivo radical tioil. A variação significativa do potencial de pico anódico após a adsorção do íon Cu^{2+} mostra que o processo de eletrodo é diferente daquele observado na ausência do íon Cu^{2+} . O efeito estabilizador do íon Cu^{2+} sobre os radicais tioil pode ser resumido pela reação:



Os resultados obtidos com o eletrodo de Au/MPA/GSH são apresentados na figura 38.

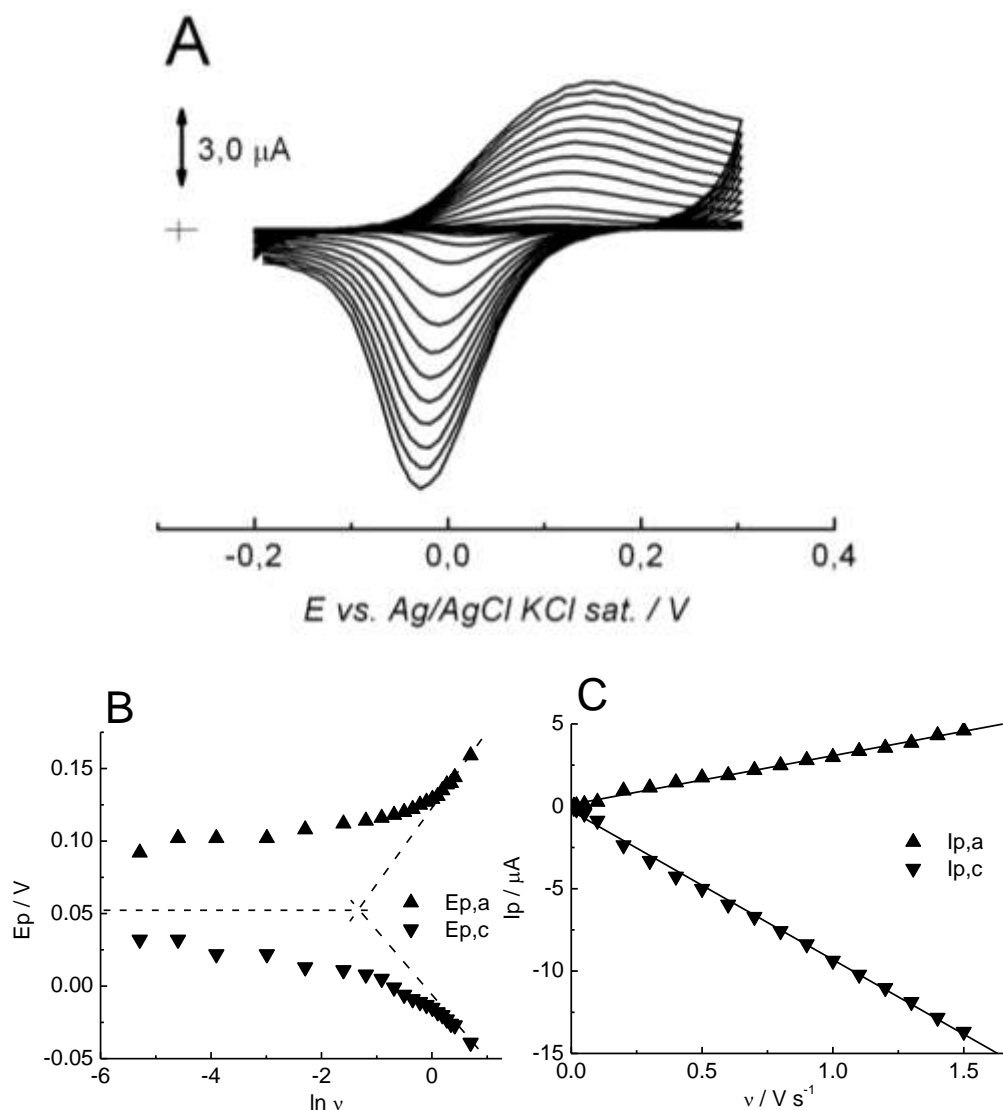


Figura 38: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/GSH, após adsorção de íons cobre, em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 em diferentes velocidades de varredura (B) Curvas de E_p versus $\ln v$ e (B) I_p versus v . $I_{p,c} = - (9,04 \pm 0,03) 10^{-6} (\text{A} / \text{V s}^{-1}) v$; $R = 0,9988$; $I_{p,a} = (2,96 \pm 0,02) 10^{-6} (\text{A} / \text{V s}^{-1}) v$; $R^2 = 0,9969$. Condições Experimentais: $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_\lambda = 0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$.

A figura 38 mostra que ocorre comportamento semelhante ao observado para o eletrodo de Au/MPA/CSH, quando íons Cu^{2+} são adsorvidos sobre a superfície do eletrodo de Au/MPA/GSH. Os cálculos das grandezas cinéticas como α e Γ_0 foram efetuados substituindo as inclinações das curvas de I_p versus v nas equações (21) e (22). Desta forma, foram obtidos os valores de $\Gamma_0 = 1,16 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ e $\alpha = 0,75$.

A partir dos valores de $E^{0'}$ extrapolado da figura 38B e dos valores de $E_{p,a}$ e $E_{p,c}$ para $\ln v = 0$ foram determinados os valores de $2,56 \text{ s}^{-1}$ e $8,29 \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ respectivamente para $k_{s,f}$ e $k_{s,b}$, usando as equações (34) e (35). O valor de $k_{s,b}$ foi menor que o obtido na ausência de íons cobre, indicando que a presença do metal dificulta o processo de redução dos grupos tiólicos. O processo de oxidação observado com o eletrodo de Au/MPA/GSH mostrou menor variação nos valores de potencial de pico em relação ao eletrodo sem cobre. Isto demonstra que pode ocorrer ligação direta entre os radicais tioil e íons cobre, após redução do íon Cu^{2+} a Cu^+ e oxidação dos grupos $-\text{S}^-$ a $-\text{S}^{\cdot}$:



Devido ao favorecimento da reação anódica já que o equilíbrio RSSR/RSH foi deslocado no sentido da formação de um aduto, um aumento significativo na corrente de pico catódica em relação ao observado para este eletrodo na ausência de metal. O efeito total se assemelha a uma etapa de pré-concentração do metal na superfície do eletrodo. Efeito similar foi observado com o eletrodo de Au/MPA/CSH após a adsorção superficial de Cu^{2+} .

3.13. Avaliação da Estabilidade dos Eletrodos Modificados com Au/MPA/CSH/ Cu^{2+} e Au/MPA/GSH/ Cu^{2+}

A estabilidade do metal na superfície dos eletrodos foi avaliada pela realização de voltamogramas cíclicos consecutivos em soluções tampão em pH 7,2, onde o grupos carboxilato das moléculas de CSH e GSH se encontram desprotonados e em pH 3.0, onde estes se encontram totalmente protonados. Os resultados para o eletrodo de Au/MPA/CSH são apresentados na figura 39.

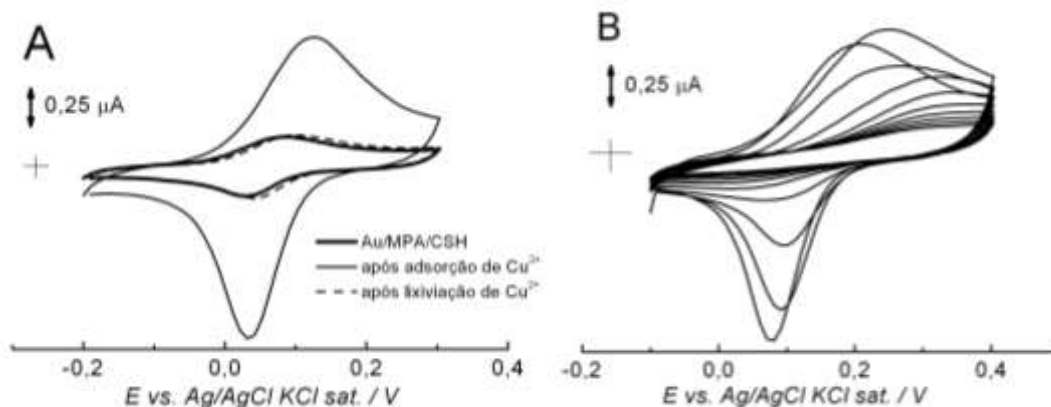


Figura 39: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2 a $0,1 \text{ V s}^{-1}$ antes, após adsorção de íons cobre e após realização de vários ciclos. (B) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3,0, com o eletrodo de Au/MPA/CSH após adsorção de íons cobre. $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_\lambda = 0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$. $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

A Figura 39A mostra que após a adsorção do metal, o eletrodo modificado de Au/MPA/CSH pode ser ciclado em pH 7,2 sem que nenhuma diferença significativa seja observada em relação ao voltamograma inicial. No entanto, se o pH do eletrólito suporte é ajustado em 3,0, condição em que os grupos tiol das moléculas deCSH podem ser protonados, as correntes de pico diminuem até atingirem valores insignificantes, como resultado do processo de lixiviação dos íons de cobre adsorvidos inicialmente sobre o eletrodo.

A figura 40 apresenta os resultados obtidos com o eletrodo de Au/MPA/GSH.

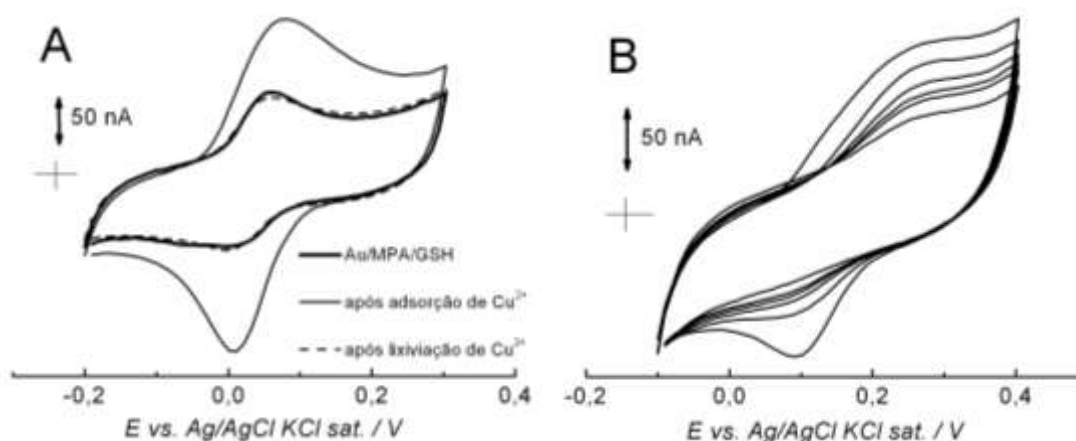
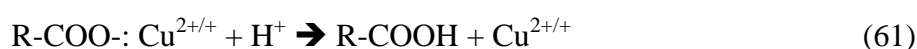


Figura 40: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2, a $0,1 \text{ V s}^{-1}$ utilizando o eletrodo de Au/MPA/GSH antes, após adsorção de íons cobre, conforme item 2.13. (B) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,0, com o eletrodo de MPA/GSH após adsorção de íons cobre. $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_\lambda = 0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$. $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

A figura 40 demonstra que o eletrodo de Au/MPA/GSH comporta-se de maneira semelhante ao eletrodo de Au/MPA/CSH. Em eletrólito de pH = 3,0 os íons cobre foram completamente lixiviados da superfície do eletrodo.

Estes resultados demonstram que a processo de adsorção de cobre sobre os eletrodos é função das condições de protonação dos grupos presentes nas moléculas de CSH e GSH. O valor de pH 3,0 usado representa uma condição de acidez suficiente para causar protonação dos grupos responsáveis pela ligação dos íons de cobre, impedindo que este permaneça adsorvido ao eletrodo.



Foi necessário um pH menor que o pKa dos grupos presentes nas moléculas de CSH e GSH para poder deslocar os íons cobre dos grupos carboxilatos nas moléculas de CSH e GSH, devido a ordem de grandeza da constante de estabilidade do complexo formado pelos íons de cobre os grupos quelantes presentes nas moléculas sobre os eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH, de modo que em pH 3 foi possível a completa lixiviação do metal em ambos os eletrodos.

3.14. Determinação de H₂O₂ utilizando os Eletrodos Modificados com Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH após adsorção de íons de Cu²⁺

A título de comparação aos resultados obtidos com os eletrodos modificados após a adsorção de Cu²⁺, Au/MPA/CSH/Cu²⁺ e Au/MPA/GSH/Cu²⁺, no desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de H₂O₂. Na figura 41 são apresentados os resultados obtidos com o eletrodo de Au/MPA/CSH/Cu²⁺.

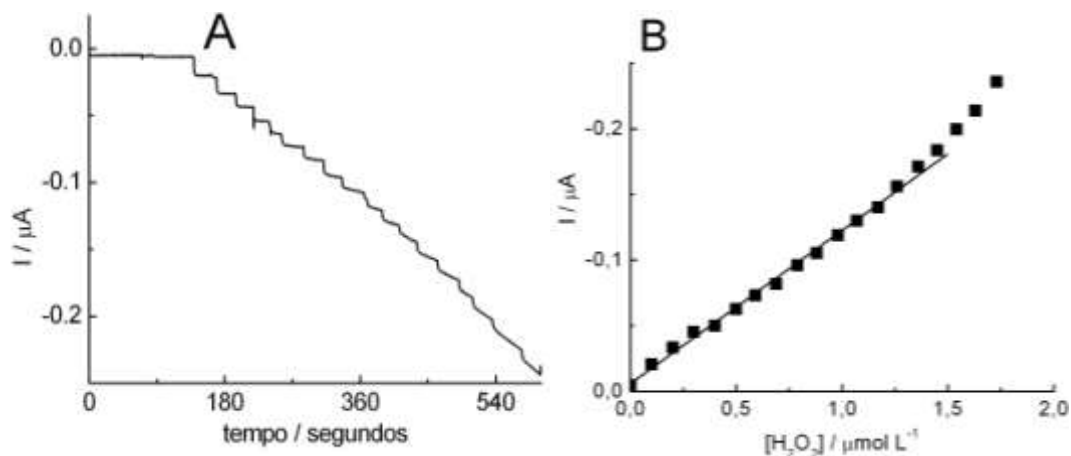


Figura 41: (A) Amperograma obtido em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2, após adições de solução padrão de H_2O_2 . Eletrodo de trabalho: Au/MPA/CSH/ Cu^{2+} ; $E_{\text{ap}} = -0,2 \text{ V}$. (B) Curva analítica de corrente catódica versus concentração de H_2O_2 na célula eletroquímica. $I_f = (0,90 \pm 0,30) (10^{-9} \text{ A}) + (126,6 \pm 3,0) (10^{-9} \text{ A} / \mu\text{mol L}^{-1}) [\text{H}_2\text{O}_2]$ e $R^2 = 0,9954$.

A figura 41 mostra que existe correlação entre as correntes faradáticas obtidas e a concentração de H_2O_2 , porém, o limite superior de linearidade para o eletrodo de Au/MPA/CSH/ Cu^{2+} nestas condições é de $1,25 \text{ mmol L}^{-1}$. Para concentrações superiores a este valor, a corrente não aumenta linearmente como função da concentração de H_2O_2 . Fato semelhante foi observado para este eletrodo modificado na ausência do metal, conforme a figura 28.

Em mais altas concentrações de peróxido de hidrogênio produtos radicalares, provenientes da reação eletroativa, como o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), podem iniciar reações em cadeia, sendo capazes de colapsar a estrutura organizada das moléculas sobre o eletrodo.



A equação da curva analítica de peróxido de hidrogênio para o eletrodo de Au/MPA/CSH obtida foi:

$$I_f = (0,903 \pm 0,302) (10^{-9} \text{ A}) + (126,6 \pm 2,9) (10^{-9} \text{ A} / \mu\text{mol L}^{-1}) [\text{H}_2\text{O}_2] \quad R^2 = 0,9954$$

A partir desta equação foram calculados o limite de detecção e a sensibilidade para a determinação de peróxido de hidrogênio usando eletrodo de Au/MPA/CSH/ Cu^{2+} :

$$\text{Sensibilidade} = \Delta I_{p,c} / \Delta [\text{H}_2\text{O}_2] / \text{Área} = 126,6 / 0,071 = 1,79 \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$$

$$\text{Limite de Detecção} = 3 \times 0,302 / 126,57 = 0,0072 \mu\text{mol L}^{-1}$$

$$\text{Limite de Quantificação} = 10 \times 0,302 / 126,57 = 0,0239 \mu\text{mol L}^{-1}$$

$$\text{Faixa de Concentração: } 0,024 \text{ a } 1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$$

Os resultados obtidos demonstram em relação aos obtidos no item 3.5, que ocorre um aumento de sensibilidade para detecção de H_2O_2 , atingindo-se um menor limite de detecção consequentemente. Este fato mostra que o metal em sua forma reduzida, Cu^+ , pode intermediar a redução do H_2O_2 , regenerando Cu^{2+} , que entra novamente no ciclo catalítico.

Na figura 42 são apresentados os resultados obtidos com o eletrodo de Au/MPA/GSH.

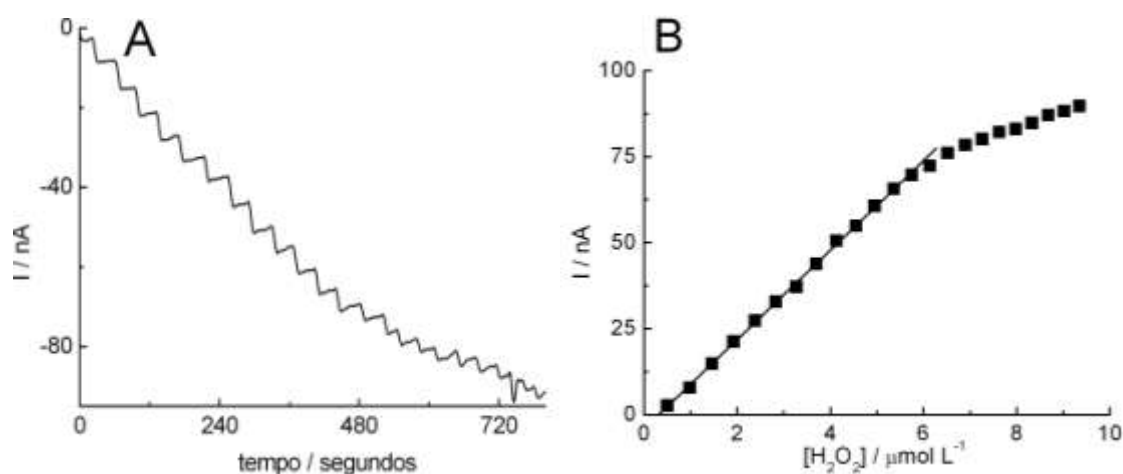


Figura 42: (A) Amperograma obtido em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2, após adições de solução padrão de H_2O_2 . Eletrodo de trabalho: Au/MPA/GSH/ Cu^{2+} ; $E_{ap} = -0,2 \text{ V}$. (B) Curva analítica de corrente catódica versus concentração de H_2O_2 na célula eletroquímica. $I_f = (-4,07 \pm 0,39) (10^{-9} \text{ A}) + (13,98 \pm 0,11) (10^{-9} \text{ A} / \mu\text{mol L}^{-1}) [\text{H}_2\text{O}_2]$ e $R^2 = 0,9996$.

A figura 42 mostra que existe correlação entre as correntes faradáicas obtidas e a concentração de H_2O_2 , porém, o limite superior de linearidade para o eletrodo de Au/MPA/GSH/ Cu^{2+} nestas condições é de $5,72 \mu\text{mol L}^{-1}$. Para o eletrodo de Au/MPA/GSH, a saturação para a curva de I versus $[\text{H}_2\text{O}_2]$ ocorreu em $2,96 \mu\text{mol L}^{-1}$, conforme a figura 29.

A sensibilidade e o limite de detecção, obtidos para este eletrodo foram calculados a partir da equação da curva analítica, conforme abaixo:

$$I_f = (-4,07 \pm 0,39) (10^{-9} \text{ A}) + (12,98 \pm 0,11) (10^{-9} \text{ A} / \mu\text{mol L}^{-1}) [\text{H}_2\text{O}_2] \quad R^2 = 0,9996$$

$$\text{Sensibilidade} = \Delta I_{p,c} / \Delta [\text{H}_2\text{O}_2] / \text{Área} = 12,98 / 0,071 = \mathbf{0,18 \mu\text{A L} \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-2}}$$

$$\text{Limite de Detecção} = 3 \times s(b) / b = 3 \times 0,394 / 12,98 = \mathbf{0,0911 \mu\text{mol L}^{-1}}$$

$$\text{Limite de Quantificação} = 10 \times s(b) / b = 10 \times 0,394 / 12,98 = \mathbf{0,304 \mu\text{mol L}^{-1}}$$

$$\text{Faixa de Concentração Detectável: } \mathbf{0,30 \text{ a } 5,72 \mu\text{mol L}^{-1}}$$

Os resultados obtidos demonstram que ocorreu acréscimo na faixa de concentração detectável, em relação à obtida para o eletrodo de Au/MPA/GSH, para o eletrodo de Au/MPA/GSH/Cu²⁺. Isto ocorreu, pois a quantidade de grupos tiólicos eletroativos na superfície do eletrodo aumentou devido à presença do metal. Variações significativas em relação aos valores de sensibilidade e limite de detecção, em relação aos dados obtidos com o eletrodo de Au/MPA/GSH, não foram obtidas. Este fato indica que no eletrodo de Au/MPA/GSH/Cu²⁺, o metal não reage diretamente com o H₂O₂, como foi observado para o eletrodo de Au/MPA/CSH/Cu²⁺.

3.15. Interação do Eletrodo de Au/MPA/CSH com Moléculas de Oxigênio

Conforme observado na figura 4 a CAA de MPA funciona como uma barreira para as moléculas de O₂, de modo que estas não conseguem sofrer redução diretamente sobre a superfície do eletrodo. No entanto, devido ao efeito oxidante do O₂, realizaram-se experimentos com o objetivo de avaliar a capacidade do mesmo no deslocamento do equilíbrio redox do par CSSC/CSH, das moléculas eletroativas sobre a superfície do eletrodo de Au/MPA/CSH. Para tanto, o gás foi borbulhado na célula eletroquímica por diferentes intervalos de tempo.

Na figura 43 são apresentados os voltamogramas obtidos após cada intervalo de 5 minutos de tempo de purga de gás oxigênio sobre a solução de eletrólito.

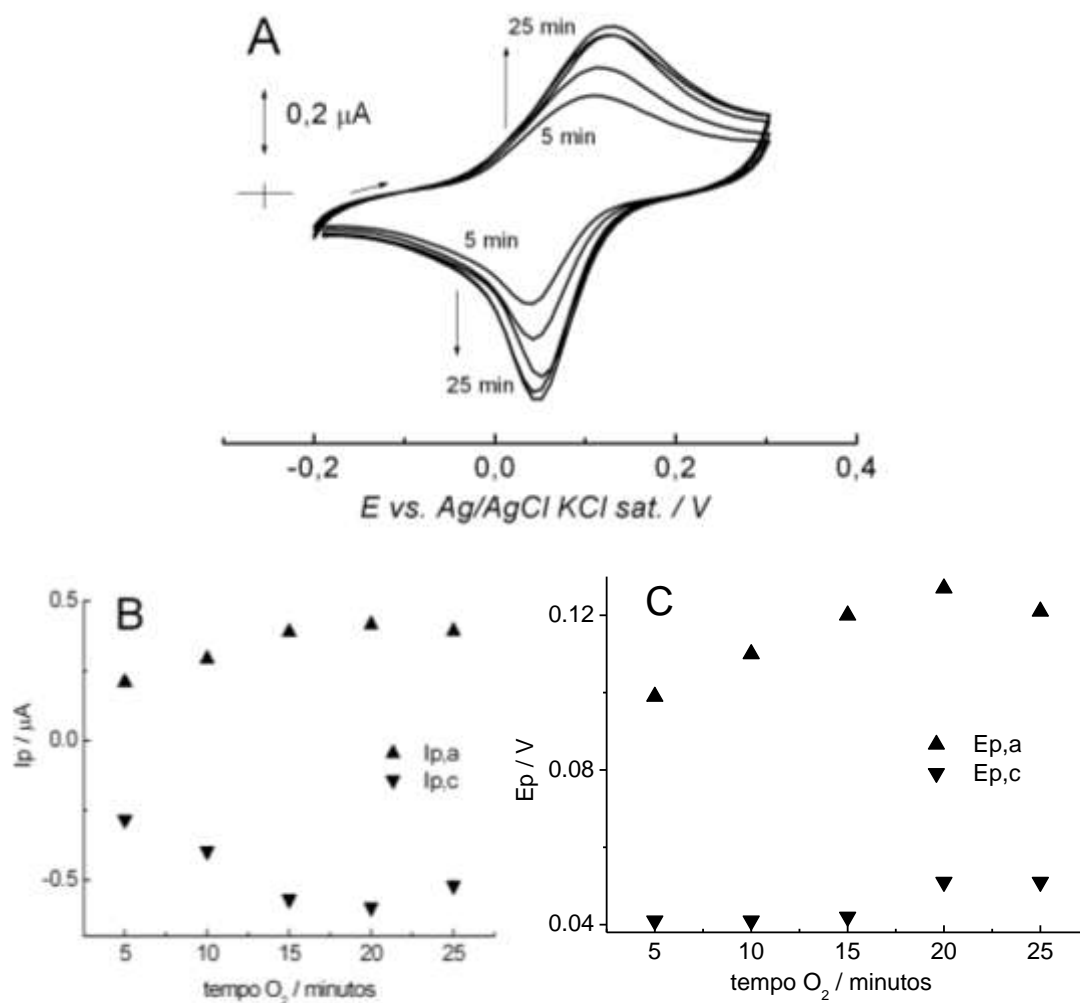


Figura 43: (A) Voltamogramas Cíclicos obtidos com eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2. $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_\lambda = 0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$; $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$. (B) I_p versus tempo de O_2 . (C) E_p versus tempo de O_2 . Voltamogramas registrados após borbulhamento de O_2 por tempos variáveis.

A figura 43 mostra que as correntes de pico anódica e catódica aumentam em decorrência do acréscimo de O_2 na solução de eletrólito e atingem um limite após 20 minutos de tempo de borbulhamento. Diminuições das correntes de pico, em relação a medidas realizadas após tempos de borbulhamento mais elevados, ocorrem devido ao acréscimo de oxigênio na solução perturbar o equilíbrio instável da solução supersaturada. A reação entre moléculas de O_2 e as moléculas de CSH sobre a superfície do eletrodo de Au/MPA/CSH são descritas a seguir:



Este processo favorece a formação do radical tioil e do íon superóxido, devido a capacidade oxidante do O_2 , que sofre redução monoelétrica. O radical tioil formado é

capaz de se oxidar a CSSC ou se reduzir a CS^- , justificando o aumento tanto das correntes anódicas como catódicas. Desta forma, o aumento das correntes de pico ocorre por conta do deslocamento do equilíbrio de formação do radical tioil, a etapa lenta mecanismo envolvendo a formação das pontes de dissulfeto. Como a geração do radical tioil depende da concentração de íons tiolato que é pequena em pH em torno de 7,0 e costuma ser lenta nesta condição de acidez, o oxigênio age avançando uma etapa do mecanismo, gerando a espécie que participa tanto do processo de oxidação como redução, aumentando as velocidades das reações catódicas e anódicas.

A variação dos potenciais de pico ocorre devido à alteração das concentrações das espécies participantes do processo redox na superfície do eletrodo, causando alteração nos sobrepotenciais de concentração destas espécies.

O aumento das correntes de pico após acréscimo de O_2 na solução de eletrólito é notório, porém, é inferior ao efeito da adsorção de íons Cu^{2+} sobre o eletrodo. O processo oxidativo exercido pelas moléculas de O_2 é limitado por sua difusão, do seio da solução à superfície do eletrodo, situação diferente dos íons Cu^{2+} que podem ser adsorvidos e se mantêm na superfície do eletrodo. Desta forma, o transporte de massa limita a ação das moléculas de oxigênio sobre o par redox, que resultado do equilíbrio de formação e quebra da ponte de dissulfeto sobre a superfície do eletrodo de Au/MPA/CSH.

Para avaliar o efeito da manutenção dos níveis de correntes de pico nos voltamogramas após a saturação da solução de eletrólito suporte com O_2 , realizaram-se ciclos sucessivos em eletrólito suporte após o borbulhamento deste gás na célula eletroquímica por 30 minutos. Na figura 44 são apresentados os resultados obtidos.

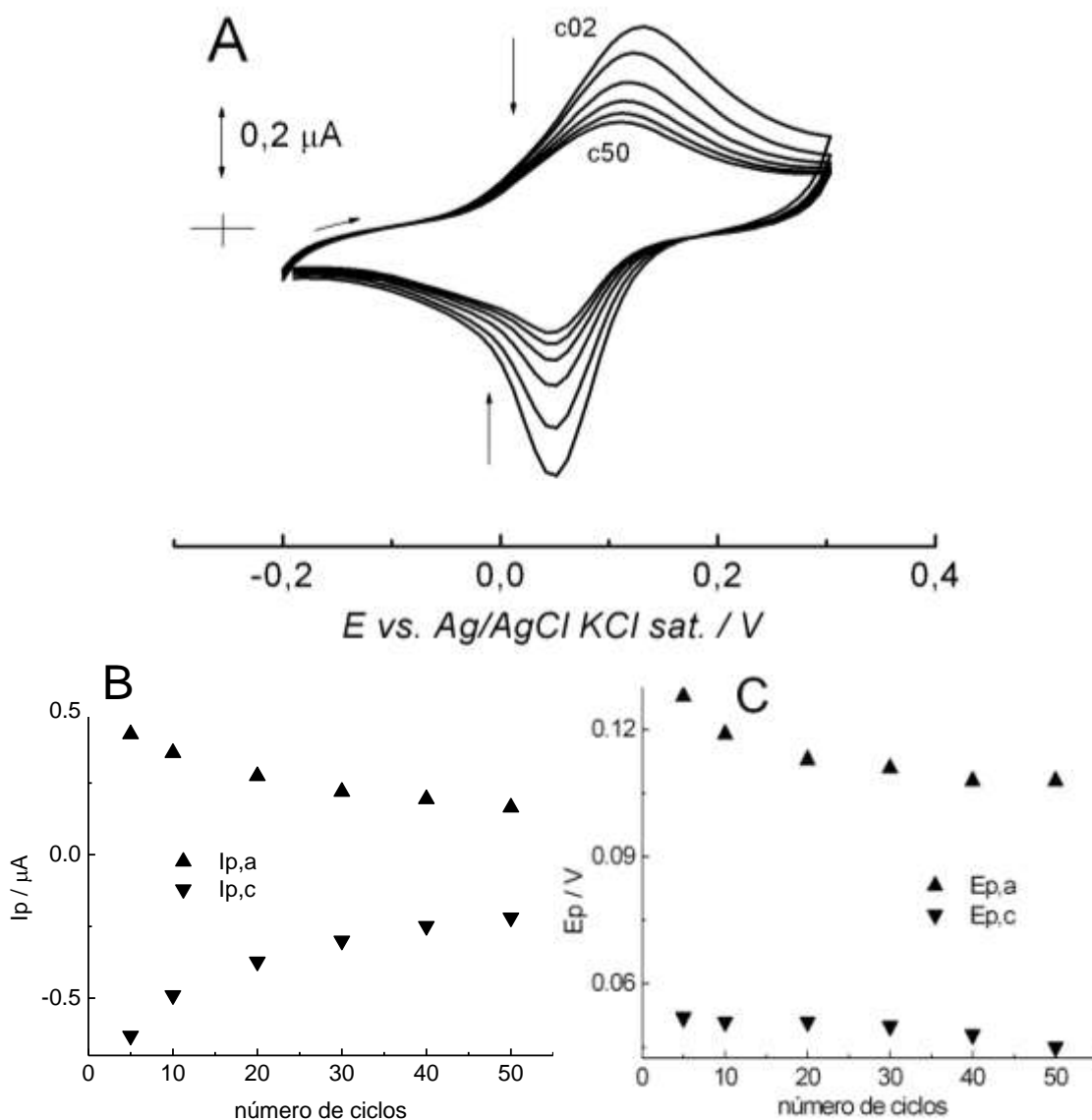


Figura 44: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando eletrodo de $\text{Au}/\text{MPA}/\text{CSH}$ em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2, após borbulhamento de O_2 por 30 minutos. $E_i = -0,2 \text{ V}$; $E_\lambda = 0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$; $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$. (B) I_p versus tempo de O_2 . (C) E_p versus tempo de O_2 .

A figura 44 mostra que ocorre diminuição das correntes de pico até valores basais. Os potenciais de pico também sofrem ligeiras variações, sugerindo alterações nas concentrações superficiais dos participantes do equilíbrio redox dos grupos eletroativos na superfície do eletrodo. Este comportamento ocorre devido ao retorno para a condição limite, onde o consumo de moléculas de oxigênio não consegue ser suprido pela sua difusão do seio da solução a superfície do eletrodo. Isto indica que a reação apresentada no equilíbrio (63) é mais rápida que a difusão de O_2 a superfície do eletrodo, indicando que o processo é controlado pela difusão do gás e sua concentração,

na superfície do eletrodo, é nula. Na figura 45 o mesmo experimento foi repetido, porém, realizando os ciclos voltamétricos a $1,0 \text{ V s}^{-1}$.

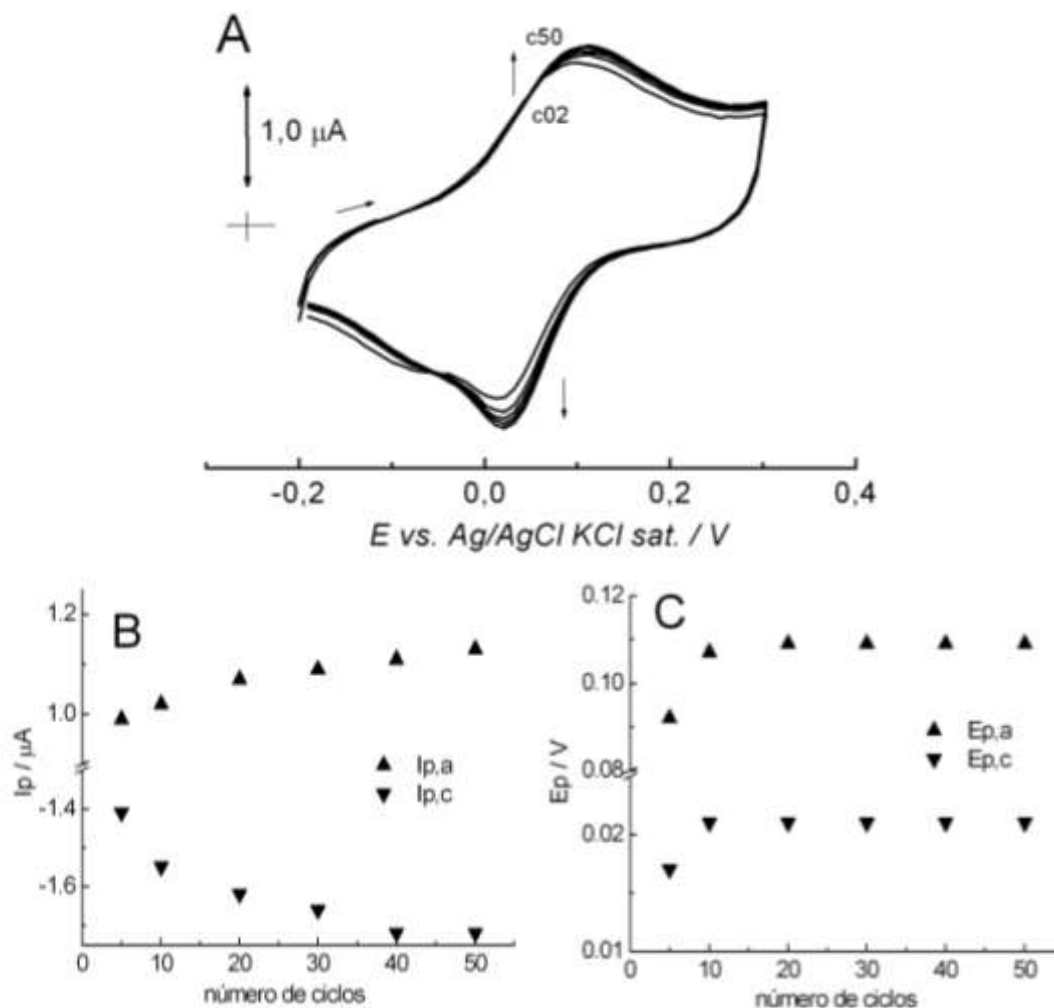


Figura 45: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2. $E_i = -0,2\text{V}$; $E_\lambda = +0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$; $v = 1,0 \text{ V s}^{-1}$. (B) Curvas de I_p versus número de ciclos e (C) E_p versus número de ciclos. Voltamogramas obtidos após borbulhamento de O_2 por 30 minutos.

Os dados apresentados na figura 45 mostram que trabalhando em maior velocidade de varredura ocorre aumento das correntes e estabilização dos potenciais de pico para um número de varreduras maior que 10, já que se consegue ainda manter algum nível de O_2 na superfície do eletrodo. O processo de redução passa a ocorrer com duas etapas, conforme foi observado na Figura 21, indicando que devido ao curto intervalo de tempo, o processo de redução da ponte de dissulfeto é incompleto. Desta forma, após a quebra das pontes de dissulfeto (reação 39) o radical tioil formado desta primeira etapa de redução passa a reagir com íons superóxido provenientes da reação

entre grupos tiólicos protonados e moléculas de O₂ (reação 63). Esta reação produz o íon tiolato, a espécie responsável pelo início do processo redox (primeira etapa de oxidação, equação 38), aumentando as correntes observadas. Na ausência de oxigênio a quantidade de íons tiolato formada provém da desprotonação do grupo tiólico (reação 37), que é desfavorecida no valor de pH utilizado no experimento.



O ciclo descrito pelas seqüências das reações (39), (63), (64) e (38) justifica o ligeiro aumento das correntes de pico para sucessivos ciclos em relação ao primeiro voltamograma obtido a 1,0 V s⁻¹, devido à limitação temporal do experimento que permite a reação entre o íon superóxido e o radical tioil não oxidados a ponte de dissulfeto.

3.16. Influencia do Oxigênio sobre o Excesso Superficial e Coeficiente de Transferencia de Carga no Eletrodo de Au/MPA/CSH

Obtiveram-se voltamogramas cíclicos utilizando-se o eletrodo de Au/MPA/CSH em solução de eletrólito de suporte saturada de O₂ em diferentes velocidades de varredura para a avaliação da participação do oxigênio no processo redox dos eletrodos de Au/MPA/CSH. Os resultados obtidos são apresentados na figura 46.

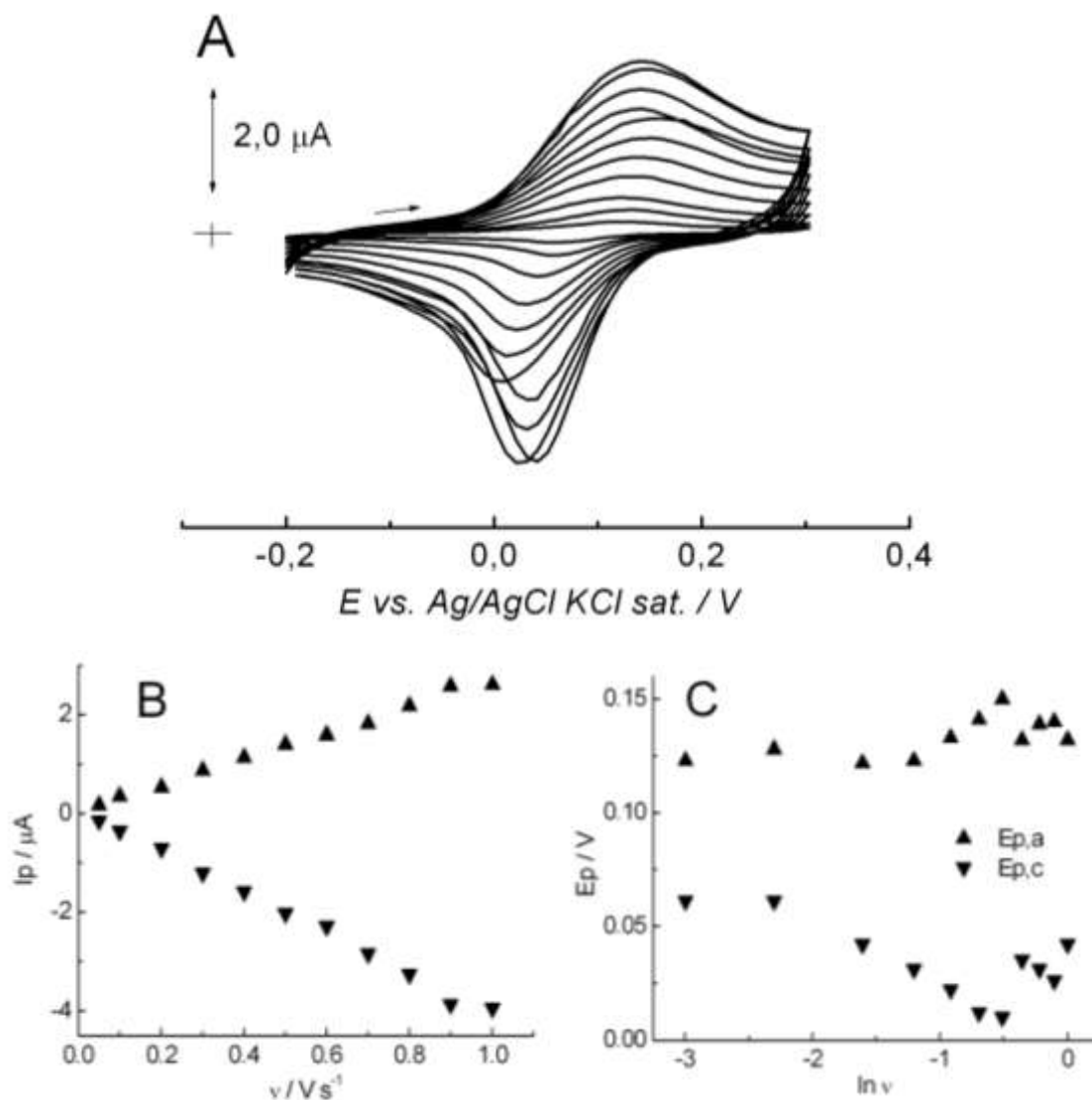


Figura 46: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 em diferentes velocidades de varredura. $E_i = -0,2\text{V}$; $E_\lambda = +0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$. (B) Curvas de I_p versus v $I_{p,c} = - (4,08 \pm 0,08) 10^{-6} (\text{A} / \text{V s}^{-1}) v$; $R^2 = 0,9952$ e $I_{p,a} = (2,56 \pm 0,13) 10^{-6} (\text{A} / \text{V s}^{-1}) v$; $R^2 = 0,9934$. (C) E_p versus $\ln v$. Voltamogramas registrados após borbulhamento de O_2 por 30 minutos.

A figura 46 mostra que as correntes de pico variam linearmente com a velocidade de varredura, indicando que os processos faradáicos observados são resultantes de transferência eletrônica de espécies adsorvidas na superfície do eletrodo de trabalho. O desdobramento do pico de redução para mais altas velocidades de varredura, observado em experimentos na ausência de oxigênio (figura 21) não foi observado devido ao consumo dos radicais tioil (reação 64, reação com O_2^\cdot), lembrando que a espécie O_2^\cdot é produzida a partir da reação entre O_2 e CSH (reação 63).

Desta forma, demonstra-se a ação não só das moléculas de O₂, mas também de seus subprodutos como o íon superóxido, cuja ação se limita a velocidades de varredura maiores que 0,6 V s⁻¹, onde alteração no comportamento da curva de Ep versus ln v, foi observada, figura 46C.

Determinou-se o recobrimento superficial das espécies eletroativas sobre o eletrodo (Γ^0) e o coeficiente de transferência eletrônica α , após a saturação do eletrólito suporte com oxigênio usando as inclinações das curvas de Ip versus v e as equações (21) e (22). Os valores obtidos para Γ_0 e α foram $6,08 \times 10^{-11}$ mol cm⁻² e 0,62, respectivamente.

O excesso superficial determinado nesta condição foi 5 vezes superior ao determinado na condição de ausência de O₂ na solução de eletrólito de suporte ($\Gamma_0 = 1,23 \times 10^{-11}$ mol cm⁻²). Este resultado mostra que o oxigênio aumenta a quantidade de espécies eletroativas provenientes das moléculas de CSH, na superfície do eletrodo de Au/MPA/CSH. O início dos processos redox na superfície deste sensor depende da desprotonação do grupo tiólico que é desfavorável na condição de pH 7,0; portanto o O₂ tem papel fundamental na formação de espécies intermediárias que atuam sobre equilíbrio de formação das espécies eletroativas. Este fato se reflete no aumento do valor de α , 0,62, em relação ao obtido na ausência de oxigênio na solução de eletrólito ($\alpha = 0,522$).

3.17. Avaliação do comportamento voltamétrico do Eletrodo de Au/MPA/CSH na presença de Quercetina e O₂

A avaliação do comportamento voltamétrico do eletrodo de Au/MPA/CSH na presença de quercetina foi realizada com o eletrodo de Au/MPA/CS após borbulhamento de O₂ durante 30 minutos na solução de eletrólito suporte contendo quercetina. Para efeito de comparação utilizou-se também o eletrodo de ouro limpo. Os resultados são apresentados na figura 47.

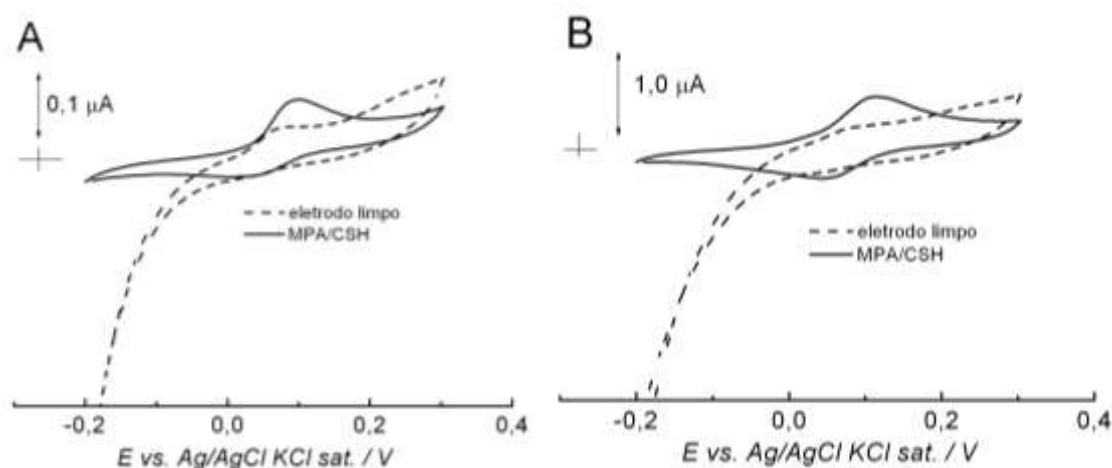


Figura 47: Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 contendo $5,63 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de quercetina. $E_i = -0,2\text{V}$; $E_\lambda = +0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$. $v = (\text{A}) 0,01$ e $(\text{B}) 0,1 \text{ V s}^{-1}$. Voltamogramas registrados após borbulhamento de O_2 por 30 minutos.

Na figura 47 é observado que o eletrodo de Au/MPA/CSH apresenta maior sensibilidade para a detecção de quercetina em relação ao eletrodo. Para voltamogramas realizados a velocidades de varredura de $0,01 \text{ V s}^{-1}$ observou-se que a corrente de pico anódica foi maior do que a catódica, mas este efeito desaparece em voltamogramas obtidos a $0,1 \text{ V s}^{-1}$. Na figura 48 são apresentados os voltamogramas obtidos antes e após a adição de quercetina a solução de eletrólito.

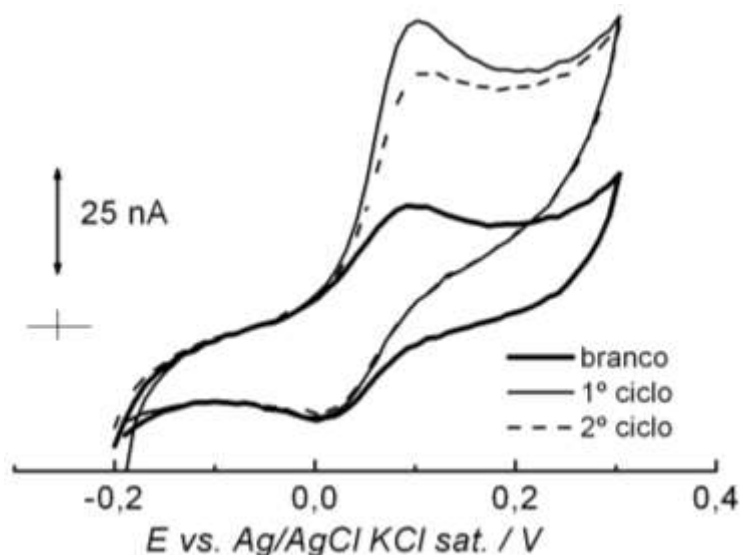
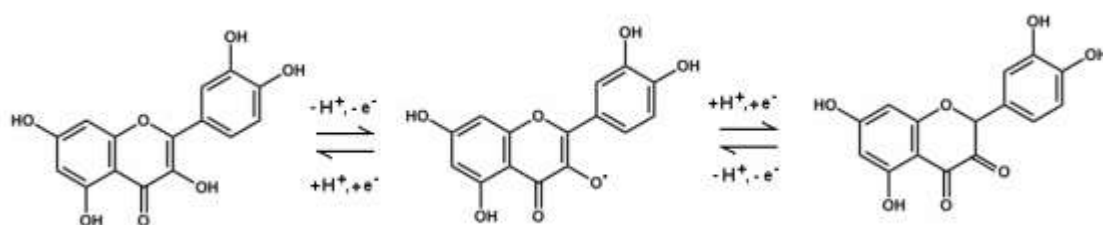


Figura 48: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,2 contendo $5,63 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de quercetina. $E_i = -0,2\text{V}$; $E_\lambda = +0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$; $v = 0,01 \text{ V s}^{-1}$. Voltamogramas registrados após borbulhamento de O_2 por 30 minutos.

A figura 48 mostra que a adição de quercetina à solução de eletrólito suporte promove o aumento da corrente anódica em relação ao voltamograma obtido apenas em eletrólito. A análise da estrutura da molécula de quercetina demonstra ser possível o estabelecimento de um equilíbrio tautomético, resultante da realocação de um próton, formando uma quinona. Porém, para o estabelecimento deste equilíbrio é necessário que uma espécie intermediária oxidada seja formada, 15.



Esquema 15: Equilíbrio tautomérico da molécula de quercetina

Desta forma, o radical tioil, gerado pela ação do oxigênio atua como agente oxidante para moléculas de quercetina que se difundem a superfície do eletrodo. Os problemas relacionados formação de uma quantidade muito pequena de radicais tioil nas condições de acidez do experimento, assim como o curto tempo de vida deste radical, foram contornados pela ação do O_2 . Este último intensifica a formação de CS^\cdot e permite o estabelecimento de um mecanismo eletrocatalítico para detecção de quercetina, reações (63), (38) e (65).



A queda do sinal do segundo ciclo em relação ao primeiro ocorre devido à limitação de tempo para difusão do O_2 para a superfície do eletrodo, espécie esta que ajuda na manutenção dos níveis de corrente observados. Efeitos de envenenamento da superfície por adsorção de produtos de oxidação não foram observados.

3.18. Perfil Voltamétrico como Função da Velocidade de Varredura

Avaliou-se também o efeito da velocidade de varredura na detecção de quercetina. Os resultados são apresentados na figura 49.

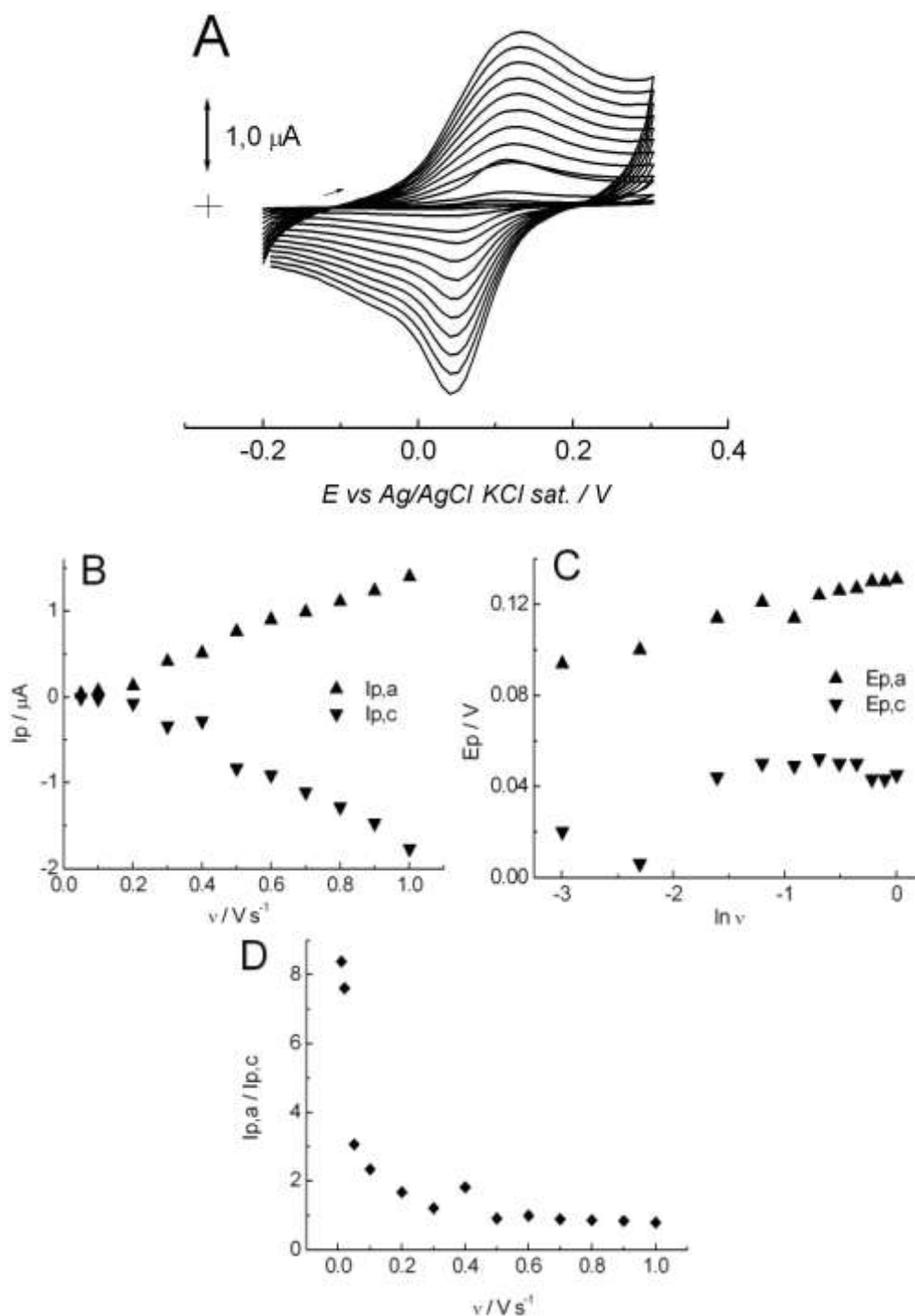


Figura 49: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura utilizando eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2 contendo 5,63 μmol L⁻¹ de quercetina. B) Curvas de I_p versus v, (C) E_p versus ln v e (D) I_{p,a}/I_{p,c} versus v. E_i = -0,2V; E_λ = +0,3 V e E_f = -0,2 V. Voltamogramas registrados após borbulhamento de O₂ na solução por 30 minutos.

A Figura 49B mostra que as correntes de pico aumentam linearmente com a velocidade de varredura, de modo que as espécies responsáveis pelo processo redox observado apresentam-se na superfície do eletrodo. Para baixas velocidades de

varredura a relação entre as correntes de pico ($I_{p,a}/I_{p,c}$) é muito maior do que a unidade devido ao processo eletrocatalítico que resulta em aumento da corrente anódica e diminuição da corrente catódica, figura 49D. O processo eletrocatalítico não é observado a altas velocidades de varredura devido à dificuldade em suprir O_2 na superfície do eletrodo e, nesta condição, a única fonte do radical tioil, CS^* , é a eletroquímica, que é desfavorecida no pH de trabalho utilizado. Já para velocidades de varredura mais altas é observado que para baixos valores de velocidades de varredura obteve-se relação devido a diminuição das correntes de pico catódicas. Isto ocorre em consequência do processo eletrocatalítico envolvendo o consumo das espécies na superfície do eletrodo aptas a se reduzirem, através de moléculas de quercetina em solução, conforme observado na figura 48.

3.19. Determinação de Quercetina Através de Eletrodos de Au/MPA/CSH por Voltametria Cíclica

A figura 50 mostra os resultados obtidos para determinação de quercetina por voltametria cíclica.

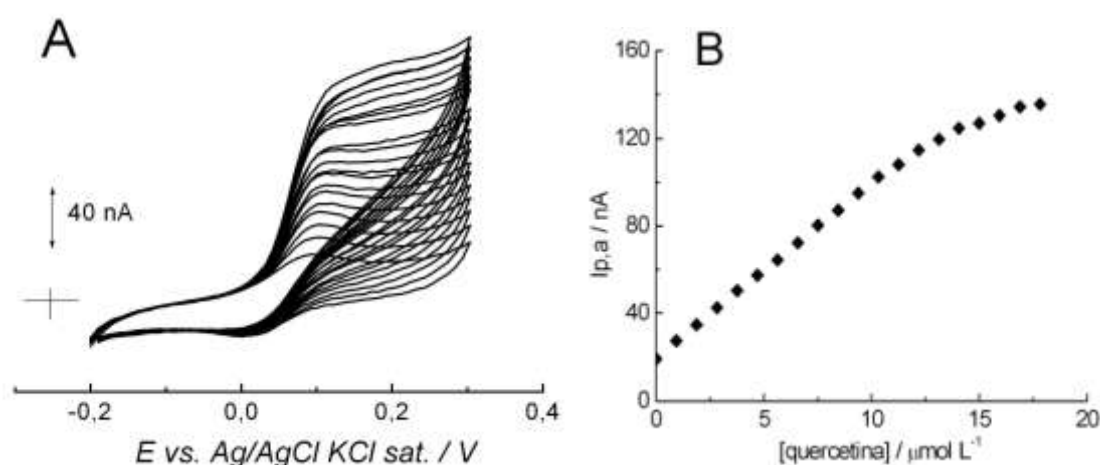


Figura 50: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando o eletrodo de Au/MPA/CSH em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2, contendo diferentes concentrações de quercetina e (B) $I_{p,a}$ versus [quercetina]. $I_{p,a} = (20,15 \pm 0,40) \text{ nA} + (7,89 \pm 0,06) [\text{Quercetina}] / \mu\text{mol L}^{-1}$. Condições Experimentais: $E_i = -0,2\text{V}$; $E_\lambda = +0,3 \text{ V}$ e $E_f = -0,2 \text{ V}$; $\nu = 0,01 \text{ V s}^{-1}$ e borbulhamento de O_2 por 30 minutos.

Na figura 50 é observado que o acréscimo de corrente anódica ocorre linearmente em função da concentração de quercetina na solução de eletrólito até o limite de $12,2 \mu\text{mol L}^{-1}$, onde a partir deste valor o acréscimo ocorre de forma não linear. Através da regressão linear entre os valores de $I_{p,a}$ versus concentração de quercetina, foram

calculados o limite de detecção e a sensibilidade do eletrodo de Au/MPA/CSH para a determinação deste flavonóide.

$$I_{p,a} = (20,152 \pm 0,398) \text{ nA} + (7,894 \pm 0,055) [\text{Quercetina} / \mu\text{mol L}^{-1}]$$

$$\text{Sensibilidade} = \Delta I_{p,a} / \Delta [\text{Querc.}] / \text{Área} = 7,894 / 0,0707 = \mathbf{0,112 \mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}}$$

$$\text{Limite de Detecção} = 3 \times 0,398 / 7,894 = \mathbf{0,151 \mu\text{mol L}^{-1}}$$

$$\text{Limite de Quantificação} = 10 \times 0,398 / 7,894 = \mathbf{0,504 \mu\text{mol L}^{-1}}$$

$$\text{Faixa de Concentração: } \mathbf{0,50 - 12,2 \mu\text{mol L}^{-1}}$$

Concentrações habituais de quercetina em produtos vegetais se encontram dentro da faixa de calibração para a curva analítica obtida, porém, a característica redutora de diversos outros flavonóides antioxidantes em amostras vegetais dificultaria a quantificação precisa de quercetina nessas amostras.

4. Conclusões

Foi possível concluir que através do recobrimento de eletrodos de ouro com camadas auto-arranjadas de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) é possível a imobilizar moléculas de L-cisteína (CSH) e L-glutationa (GSH), de maneira a manter a eletroatividade do grupo tiólico na interfase eletrodo/solução.

Os processos eletroquímicos observados nos eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH podem ser atribuídos ao par redox R-S-S-R/R-SH que se encontra adsorvido na superfície de ambos os eletrodos. A relação linear existente entre as curvas de correntes de pico e a velocidade de varredura corrobora esta conclusão. As espécies participantes deste equilíbrio eletroquímico foram identificadas como sendo o grupo tiólico (-SH) e a ponte de dissulfeto (-S-S), presentes em ambos os eletrodos.

Demonstrou-se que o mecanismo de formação da ponte de dissulfeto a partir de grupos tiólicos ocorre a partir da desprotonação deste grupo, onde a espécie que inicia o ciclo é o íon tiolato que se oxida ao radical tioil, CS^\bullet . Dependendo do pH do meio, esta

reação ocorre através de mais de uma etapa, de modo que em condições de acidez próximos a neutralidade, este radical ataca um grupo RSH vizinho, formando espécie radicalar instável que imediatamente perde um elétron e um próton formando a ponte de dissulfeto. Para valores de pH superiores a 7,0, o processo ocorre em uma única etapa eletroquímica, em que radicais tioil vizinhos se reagem quimicamente para formar a ponte de dissulfeto. Em condições de excesso de acidez tal reação não ocorre devido à ausência de íons tiolato. O processo de redução da ponte de dissulfeto depende de prótons, devido a seu carácter redutor, capaz de estabilizar as espécies intermediárias geradas após a quebra oxidativa da ligação S-S.

Supõe-se que o processo de ancoramento de moléculas de CSH e GSH sobre a CAA de MPA na superfície do eletrodo ocorra através da formação de um par iônico, que durante a etapa de ativação eletroquímica, origina a formação de uma ligação covalente. Este processo envolve a eliminação de moléculas de água, necessária para a formação da ligação amidica, comum entre grupos amino e carboxila em aminoácidos. O uso de reagentes formadores de ligações covalentes com EDC/NHS apresentou resultados semelhantes.

Através de voltamogramas cíclicos obtidos em soluções de eletrólito em condições extremas de pH, onde as espécies participantes do equilíbrio ácido-base R-SH e R-S⁻ predominam de maneira isolada, observou-se que as correntes de pico são menores. Isto demonstrou que ambas as espécies participam do mecanismo, de modo que a condição de acidez intermediária, onde as duas espécies coexistem foram obtidas as maiores correntes de pico.

Como as correntes tendem a zero para condições de alta acidez, concluiu-se que o íon tiolato inicia o mecanismo redox, sendo a primeira espécie do ciclo a doar elétrons. Para valores de pH superiores a 7,5 – 8,0 as correntes de pico do par redox R-S-S-R/R-SH tendem a metade do valor máximo. Este resultado indica que nestes valores de pH, onde somente a espécie desprotonada está presente, a reação se processa com apenas uma etapa envolvendo transferência eletrônica.

O mecanismo global para a reação redox do par R-S-S-R/R-SH envolve a transferência de dois elétrons e um próton, evidência da formação de uma espécie radicalar, o radical tioil, que pode ser formado a partir do grupo tiólico desprotonado.

A formação da ponte de dissulfeto foi confirmada através dos estudos de espectroscopia Raman de superfície, onde foi possível observar a banda correspondente a esta ligação em 465 cm⁻¹.

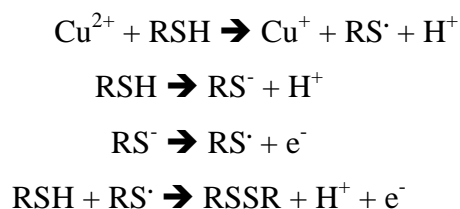
A identificação dos grupos tiólicos na superfície dos eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH foi realizada por meio de uma titulação voltamétrica onde solução de íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em diversos valores de pH, foi utilizada como sonda eletroquímica. O valor de pKa encontrado para o grupo carboxila no MPA foi 5,49, enquanto o valor encontrado para o pKa do grupo tiólico nas molécula de CSH foi 8,05. Caso o átomo de enxofre estivesse ligado na superfície metálica do eletrodo, o processo de desprotonação dos grupos tiólicos não seria observado através da variação do pH da solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$.

A partir do equilíbrio de desprotonação do grupo tiólico presente nas moléculas de CSH e GSH, estimaram-se a quantidade total destas moléculas sobre a superfície do eletrodo, sendo, no caso do eletrodo de Au/MPA/CSH equivalentes a quantidade de MPA sobre a superfície de ouro. O menor valor obtido para o eletrodo de Au/MPA/GSH ocorreu por conta do maior volume molecular das moléculas de GSH, comparadas as de CSH, permitindo um maior numero de moléculas para esta frente aquela, numa superfície de mesma área.

A reação dos grupos tiólicos com espécies eletroativas demonstrou a capacidade redutora destas moléculas. O resultado da reação com o peróxido de hidrogênio indicou que esta molécula age não só deslocando o equilíbrio redox na direção da formação da espécie oxidada do par, mas que outros produtos são formados. Comportamentos diferentes foram obtidos entre os eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH, indicando diferença na reatividade entre as moléculas de CSH e GSH com o peróxido de hidrogênio. Processos eletrocatalíticos foram observados para baixas velocidades de varredura para ambos os eletrodos, porém devido ao acréscimo de descarga do eletrólito, faixas estreitas de calibração para determinação de peróxido de hidrogênio, via voltametria cíclica, foram obtidas.

Pela técnica de amperometria foi possível o desenvolvimento de melhores métodos de análise para esta substancia utilizando ambos os eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH.

A incorporação de Cu^{2+} nos eletrodos de Au/MPA/CSH e Au/MPA/GSH produziu uma nova superfície na qual as espécies reduzidas, CSH e GSH, passam a fazer parte do processo redox, uma vez que o são oxidadas pelo metal, produzindo a espécie intermediária, o radical tioil (GS^{\cdot}), a partir do tiol em sua forma reduzida. Eletroquimicamente, este radical seria formado somente a partir do estado desprotonado, de acordo com:



Assim, a presença de íons Cu^{2+} na superfície dos eletrodos intensifica as correntes de pico do par RSSR/RSH , por aumentar as espécies eletroativas desta reação sobre a superfície do eletrodo modificado. Com os eletrodos de $\text{Au}/\text{MPA}/\text{CSH}/\text{Cu}^{2+}$ e $\text{Au}/\text{MPA}/\text{GSH}/\text{Cu}^{2+}$ foi possível o desenvolvimento de um método amperométrico para a determinação de H_2O_2 .

Aparentemente, o grupo carboxilato é o responsável pela estabilização inicial do Cu^{2+} nestas superfícies. Estudos posteriores em que a cisteína e glutatona sejam substituídas por cistamina, poderão comprovar esta hipótese.

O oxigênio molecular possui um efeito similar ao do Cu^{2+} em eletrodos de $\text{Au}/\text{MPA}/\text{CSH}$, no que diz respeito à formação do radical tioil, a partir do tiol em sua forma reduzida. Esta reação foi utilizada para desenvolver um método catalítico para determinação de espécies antioxidante, como a quercetina, reações (63), (38) e (65), via voltametria cíclica.



Uma limitação desta metodologia é a baixa velocidade de varredura que deve ser empregada para que o O_2 se difunda até a superfície do eletrodo para alimentar o ciclo catalítico.

A utilização dos eletrodos contendo íons Cu^{2+} para detecção de quercetina não é possível devido ao efeito complexante da quercetina sobre o metal.

5. Perspectivas Futuras

Pretende-se utilizar a Espectroscopia Absorção de Raio-X (EXAFS e XANES) para a determinar aspectos do ambiente químico em torno dos grupos tiólicos presentes nos eletrodos de Au/MPA/CSH e a Espectroscopia de Infra-Vermelho por reflectância (IR-ATR) para identificação das ligações químicas presentes na superfície modificada. Para a identificação de todas as possíveis ligações químicas presentes na superfície do eletrodo de Au/MPA/CSH pretende-se utilizar da Espectroscopia de Infra-Vermelho por reflectância (IR-ATR).

Para verificar a formação de radicais tioil e produção de íons superóxido sobre o eletrodo de Au/MPA/CSH pretende-se utilizar a técnica de Espectroscopia de Ressonância Paramagnética (EPR). A substituição da cisteína por cistamina pode, igualmente, fornecer resultados importantes sobre a participação do grupo carboxilato na estabilização superficial do íon Cu^{2+} .

6. Referências

- 1- Murray, R. W. **Chemically modified electrodes** *Acc. Chem. Res.* **13** No. 5 (1980) 135–141.
- 2- Murray, R. W., Goodenough, J. B., Albery W. J. **Modified Electrodes: Chemically Modified Electrodes for Electrocatalysis** *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A* **302** (1981) 253-265.
- 3- Murray, R. W., Ewing, A. G., Durst, R. A. **Chemically Modified Electrodes Molecular Design for Electroanalysis** *Anal. Chem.* **59** No. 5 (1987) 379–390.
- 4- Zen, Jyh-Myng, Kumar, A. S., Tsai, Dong-Mung **Recent Updates of Chemically Modified Electrodes in Analytical Chemistry** *Electroanalysis* **15** No. 13 (2003) 1073–1087.
- 5- Mandler, D., Turyan, I. **Applications of self-assembled monolayers in electroanalytical chemistry** *Electroanalysis* **8** No. 3 (1996) 207-213.

- 6- Freire, R. S.; Pessoa, C. A., Kubota, L. T. **Self-Assembled monolayers applications for the development of electrochemical sensors** *Química Nova* **26** No. 3 (2003) 381-389.
- 7- Gooding, J. J., Mearns, F., Yang, W. R. **Self-Assembled monolayers into the 21(st) century: Recent advances and applications** *Electroanalysis* **15** No. 2 (2003) 81-96.
- 8- Chen, D.; Li, J. **Interfacial design and functionization on metal electrodes through Self-Assembled monolayers** *Surface Science Reports* **61** No. 11 (2006) 445-463.
- 9- Ulman, A. **Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers** *Chem. Rev.*, **96** (1996) 1533–1554.
- 10- Schwartz, D. K. **Mechanisms and Kinetics of Self-Assembled Monolayer Formation** *Annual Review of Physical Chemistry* **52** (2001) 107-137.
- 11- Strong, L., Whitesides, G. M. **Structures of self-assembled monolayer films of organosulfur compounds adsorbed on gold single crystals: electron diffraction studies** *Langmuir* **4** No. 3 (1988) 546–558.
- 12- Yang, Z; Gonzalez-Cortes, A; Jourquin, G; et al. **Analytical Application of Self-Assembled Monolayer on Gold Electrodes - Critical Importance of Surface Pretreatment** *Biosensors and Bioelectronics* **10** No. 9-10 (1995) 789-795.
- 13- Sabatani, E., Rubinstein, I., Maoz, R., **Organized Self-assembling Monolayers on Electrodes 1. Octadecyl Derivatives on Gold** *Journal of Electroanalytical Chemistry* **219** No. 1-2 (1987) 365-371.
- 14- Lee, K. A. B. **Electron-Transfer Into Self-Assembling Monolayers on Gold Electrodes** *Langmuir* **6** No. 3 (1990) 709-712.

15- Miller, C., Cuendet, P., Gratzel, M. **Adsorbed Omega-Hydroxy Thiol Monolayers on Gold Electrodes - Evidence for Electron-Tunneling to Redox Species in Solution** *Journal of Physical Chemistry* **95** No. 2 (1991) 877-886.

16- Feliciano-Ramos, I., Caban-Acevedo, M., Aulice, S. M. Cabrera, C. R. **Self-Assembled Monolayers of L-cysteine on Palladium Electrodes** *Journal of Electroanalytical Chemistry* **650** No. 1 (2010) 98-104.

17- Feliciano-Ramos, I., Cabrera, C. R. **Electrochemical Oxidation of NADH in L-Cysteine Monolayer on Palladium Surface** *Bioelectrocatalysis Book Series: ECS Transactions* **35** No. 26 (2011) 25-32.

18- Svetlicic, V., Clavilier, J., Zutic, V., Chevalet, J., Elachi, K. **Effect of Sulfur-Adlayer Preparation on Self-Assembled Monolayers of Phenothiazines at Polyoriented Platinum Electrodes** *Journal of Electroanalytical Chemistry* **344** No. 1-2 (1993) 145-160.

19- Inose, Y; Moniwa, S; Aramata, A, Yamagishi, A., Kyaw-Naing, **Chiral Monolayer of Self-Assembled Delta-[Os(bpy)(2)L(Cl)](+) [bpy equals 2,2'-bipyridyl L=1,2-bis(4-pyridyl)ethane] on a Platinum Electrode** *Chemical Communications* **1** (1997) 111 -112.

20- Matsuda, N; Yoshii, K; Ataka, K; et al. **Surface-Enhanced Raman and Infrared Studies of Electrochemical Reduction of Self-Assembled Monolayers Formed from To-Nitrohiophenol at Silver** *Chemistry Letters* **7** (1992) 1385-1388.

21- Thompson, W. R., Pemberton, J. E. **Surface Raman-Scattering of Self-Assembled Monolayers of (3-mercaptopropyl) trimethoxysilane on Silver - Orientational Effects of Hydrolysis and Condensation-Reactions** *Chemistry of Materials* **5** No. 3 (1993) 241-244.

22- Fedurco, M. **Redox Reactions of Heme-Containing Metalloproteins: Dynamic Effects of Self-Assembled Monolayers on Thermodynamics and Kinetics of**

Cytochrome c Electron-Transfer Reactions *Coordination Chemistry Reviews* **209**
No. 1 (2000) 263-331.

23- Nyokong, T.; Bedioui, F. **Self-Assembled Monolayers and electropolymerized thin films of phthalocyanines as molecular materials for electroanalysis** *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **10** (2006) 9-10.

24- Chow, E., Gooding, J. J. **Peptide Modified Electrodes as Electrochemical Metal Ion Sensors** *Electroanalysis* **18**, No. 15 (2006) 1437–1448.

25- Pedrosa, V. A., Caetano, J., Machado, S. A. S., Freire, R. S., Bertotti, M. **Acetylcholinesterase immobilization on 3-mercaptopropionic acid Self-Assembled Monolayer for determination of pesticides** *Electroanalysis* **19** No. 13 (2007) 1415-1420.

26- Freire, R. S., Pessoa, C. A., Mello, L. D., Kubota, L. T. **Direct Electron Transfer: An approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity** *Journal of The Brazilian Chemical Society* **14** No. 2 (2003) 230-243.

27- Mai, Z., Zhao, X., Dai, Z., Zou, X. **Direct Electrochemistry of Hemoglobin Adsorbed on Self-Assembled Monolayers with Different Head Groups or Chain Length** *Talanta* **81** No. 1-2 (2010) 167-175.

28- Lorenzo, E., Sanchez, L., Pariente, F., et al. **ThermodynamicS and Kinetics of Adsorption and Electrocatalysis of NADH Oxidation with a Self-Assembling Quinone Derivative** *Analytica Chimica Acta* **309** No. 1-3 (1995) 79-88.

29- Raj, C. R., Gobi, K. V., Ohsaka, T. **Electrocatalytic oxidation of NADH at the Self-Assembled Monolayer of Nickel(II) Macrocycle on Gold Electrode** *Bioelectrochemistry* **51** No. 2 (2000) 181-186.

30- Wang, Q.; Jiang, N; Li, N. Q. **Electrocatalytic Response of Dopamine at a Thiolactic Acid Self-Assembled Gold Electrode** *Microchemical Journal* **68** No. 1 (2001) 77-85.

- 31- Chidsey, C. E. D., Bertozzi, C. R., Putvinski, T. M., et al. **Coadsorption of Ferrocene-Terminated and Unsubstituted Alkanethiols on gold – Electroactive Self-Assembled Monolayers** *Journal of the American Chemical Society* **112** No. 11 (1990) 4301-4306.
- 32- Uosaki, K; Sato, Y.; Kita, H. **Electrochemical Characteristics of a Gold Electrode Modified with a Self-Assembled Monolayers of Ferrocenylalkanethiols** *Langmuir* **7** No. 7 (1991) 1510-1514.
- 33- Tsutsumi, H., Furumoto, S., Morita, M., et al. **Preparation and Characterization of Modified Electrode by Self-Assembling Ferrocene Derivative** *Journal of The Electrochemical Society* **139** No. 6 (1992) 1522-1525.
- 34- Kitagawa, T., Matsubara, H., Komatsu, K., et al. **Ideal Redox Behavior of the High-Density Self-Assembled Monolayer of a Molecular Tripod on a Au(111) Surface with a Terminal Ferrocene Group** *Langmuir* **29** No. 13 (2013) 4275-4282.
- 35- Collinson, M., Bowden, E. F., Tarlov, M. J. **Voltammetry of Covalently Immobilized Cytochrome-c on Self-Assembled Monolayer Electrodes** *Langmuir* **8** No. 5 (1992) 1247-1250.
- 36- Song, S., Clark, R. A., Bowden, E. F., et al. **Characterization of Direct Electron Transfer to Cytochrome c Alkanethiolate Structures Prepared by Self-Assembly on Gold** *Journal of Physical Chemistry* **97** No. 24 (1993) 6564-6572.
- 37- Li, J. H., Cheng, G. J., Dong, S. J. **Direct electron transfer to Cytochrome c Oxidase in Self-Assembled Monolayers on Gold Electrodes** *Journal of Electroanalytical Chemistry* **416** No. 1-2 (1996) 97-104.
- 38- Shiotsuka, M., Kondo, H., Inomata, T., et al. **Electrochemical and Photophysical Study in Solution and on Ruthenium (II) Polypyridyl Complexes Containing Thiophenylethynylphenanthrolines Self Assembled on Gold Surfaces** *Chemistry Letters* **41** No. 11 (2012) 1417-1419.

- 39- Kariuki, P. N., Madl, C. M., Martin, Gooding J. J., et al. **Synthesis and bonding of trans-dichlorobis(1,3-diaminopropane) Ruthenium (III) chloride to a Self Assembled Monolayer and its effect on conducting polymer sheet conductivity** *Inorganica Chimica Acta* **383** (2012) 320-326.
- 40- Kang, C. H., Choi, Y., Kim, H. H., et al. **Electrogenerated Chemiluminescence Sensor Based on a Self Assembled Monolayer of Ruthenium (II)-bis(2,2'-bipyridyl)-(aminopropyl imidazole) on Gold Deposited Screen Printed Electrode** *Electroanalysis* **23** No. 9 (2011) 2131-2138.
- 41- Li, J. H., Yan, J. C., Deng, Q., et al. **Viologen-thiol Self-Assembled Monolayers for Immobilized Horseradish Peroxidase at Gold Electrode Surface** *Electrochimica Acta* **42** No. 6 (1997) 961-967.
- 42- Fritzen-Garcia, M. B.; Zoldan, V. C.; Oliveira, I. R. W. Z.; et al. **Peroxidase Immobilized on Phospholipid Bilayers Supported on Au (111) by DTT Self-Assembled Monolayers: Application to Dopamine Determination** *Biotechnology and Bioengineering* **110** No. 2 (2013) 374-382.
- 43- Tian, Y.; Shioda, M; Kasahara, S; et al. **A facilitated electron transfer of copper-zinc Superoxide Dismutase (SOD) based on a cysteine-bridged SOD electrode** *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* **1569** No 1-3 (2002) 151-158.
- 44- Tian, Y.; Mao, L. Q.; Okajima, T.; et al. **Electrochemistry and electrocatalytic activities of Superoxide Dismutases at Gold Electrodes Modified with a Self Assembled Monolayer** *Analytical Chemistry* **76** No. 14 (2004) 4162-4168.
- 45- Mukherjee, S., Sengupta, K., Das, M. R., et al. **Site-Specific Covalent Attachment of Heme Proteins on Self Assembled Monolayers** *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **17** No. 7 (2012) 1009-1023.

- 46- Labuda, J., Vanickova, M., Buckova, M., et al. **Development in Voltammetric Analysis with Chemically Modified Electrodes and Biosensors** *Chemical Papers-Chemicke Zvesti* **54** No. 2 (2000) 95-103.
- 47- Bulaj, G. **Formation of Disulfide Bonds in Proteins and Peptides** *Biotechnology Advances* **23** No. 1 (2005) 87-92.
- 48- Stevens, F. J., Argon, Y. **Protein Folding in the ER** *Seminars in Cell & Developmental Biology* **10** No. 5 (1999) 443-454.
- 49- Wedemeyer, W. J., Welker, E., Narayan, M., et al. **Disulfide Bonds and Protein Folding** *Biochemistry* **39** No. 15 (2000) 4207-4216.
- 50- Filomeni, G., Rotilio, G., Ciriolo, M. R. **Cell Signalling and the Glutathione Redox System** *Biochemical Pharmacology* **64** No. 5-6 (2002) 1057-1064.
- 51- Raoof, J. B., Ojani, R., Ramine, M. **Electrocatalytic oxidation and voltammetric determination of L-Cysteic Acid at the surface of p-bromanil Modified Carbon Paste Electrode** *Electroanalysis* **18** No. 17 (2006) 1722-1726.
52. Wang, C. Y., Wang, Z. X., Guan, J., et al. **Voltammetric determination of meloxicam in pharmaceutical formulation and human serum at glassy carbon Electrode Modified by Cysteic Acid formed by electrochemical oxidation of L-cysteine** *Sensors* **6** No. 9 (2006) 1139-1152.
53. Guan, J., Wang, Z., Wang, C., et al. **Voltammetric Determination of Sinomenine at GLassy Carbon Electrode Modified by Cysteic Acid Based on Electrochemical Oxidation of L-cysteine** *International Journal of Electrochemical Science* **2** No. 8 (2007) 572-582.
54. Brunetti, B., Desimoni, E. **Determination of Theophylline at a Cysteic Acid Modified Glassy Carbon Electrode** *Electroanalysis* **21** No. 6 (2009) 772-778.

55. Nie, R., Bo, X., Wang, H., et al. **Chiral Electrochemical Sensing for Tyrosine Enantiomers on Glassy Carbon Electrode Modified with Cysteic Acid** *Electrochemistry Communications* **27** (2013) 112-115.
56. Laibinis, P. E., Whitesides, G. M. **Self-assembled monolayers of n-alkanethiolates on copper are barrier films that protect the metal against oxidation by air** *J. Am. Chem. Soc.* **114** No. 23 (1992) 9022–9028.
57. Esplandiú, M. J., Hagenström, H., Kolb, D. M. **Functionalized Self-Assembled Alkanethiol Monolayers on Au(111) Electrodes: 1. Surface Structure and Electrochemistry** *Langmuir* **17** No. 3 (2001) 828–838.
58. Hagenström, H., Schneeweiss, M. A., Kolb, D. M. **Modification of a Au(111) Electrode with Ethanethiol. 1. Adlayer Structure and Electrochemistry** *Langmuir* **15** No. 7 (1999) 2435–2443.
59. Madueno, R., Räisänen, M. T., Buck, C. S. M. **Functionalizing hydrogen-bonded surface networks with self-assembled monolayers** *Nature* **454** (2008) 618-621.
60. Flores, S. M., Shaporenko, A., Vavilala, C., Butt, H. J., Schmittel, M., Zharnikov M., Berger, R. **Control of surface properties of self-assembled monolayers by tuning the degree of molecular asymmetry** *Surface Science* **600** No. 14 (2006) 2847-2856.
61. Ford, M. J., Masens, C., Cortie, M. B. **The application of gold surfaces and particles in nanotechnology** *Surf. Rev. Lett.* **13** No. 2-3 (2006) 297-307
62. Lee, B. H., Sung, M. M. **Gas-phase formation of self-assembled monolayers on MgO for protection against hydration** *J Nanosci Nanotechnol.* **8** No. 9 (2008) 4818-4821.

63. Schreiber, F. **Structure and growth of self-assembling monolayers** *Progress in Surface Science* **65** (2000) 151-256.
64. Dinga, S. J., Changb, B. W., Wuc, C. C., Laid, M. F., Chang, H. C. **Impedance spectral studies of self-assembly of alkanethiols with different chain lengths using different immobilization strategies on Au electrodes** *Analytica Chimica Acta* **554** (2005) 43–51.
65. Stettner, J., Winkler, A. **Characterization of Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on Gold by Thermal Desorption Spectroscopy** *Langmuir* **26** No. 12 (2010) 9659–9665.
66. Schwartz, D. K., **Mechanisms and Kinetics of Self-Assembled Monolayer Formation Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation** *Annu. Rev. Phys. Chem.* **52** (2001) 107–37.
67. Schreiber, F. **Structure and growth of self-assembling monolayers.** *Progress in Surface Science* **65** No. 5–8 (2000)151–257.
68. Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. **Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology.** *Chem. Rev.* 105 No. 4 (2005) 1103–1170.
69. Vos, J. G., Forster, R. J., Keyes, T. E. *Interfacial Supramolecular Assemblies.* Willey (2003) 88–94.
70. Langmuir, I. **The constitution and fundamental properties of solids and liquids. part i. solids.** *J. Am. Chem. Soc.* **38** (1916) 2221-2295.
71. Kolev, V. L., Danov, K. D., Kralchevsky, P. A., Broze, G., Mehreteab, A. **Comparison of the van der Waals and Frumkin Adsorption Isotherms for Sodium Dodecyl Sulfate at Various Salt Concentrations** *Langmuir* **18**, (2002) 9106-9109.

72. Modern Electrochemistry, Volume 2 John O. M. Bockris, Amulya K. N. Reddy, Maria E. Gamboa-Aldeco, página 944.
73. Hamoudi, H.; Prato M., Dablemont C., Cavalleri O., Canepa M., Esaulov, V. A. **"Self-Assembly of 1,4-Benzenedimethanethiol Self-Assembled Monolayers on Gold"**. *Langmuir* **26** No. 10 (2010) 7242–7247.
74. Prato, M.; Moroni R., Bisio F., Rolandi R., Mattera L., Cavalleri O., Canepa M. **Optical Characterization of Thiolate Self-Assembled Monolayers on Au(111)**. *Journal of Physical Chemistry C* **112** (2008) 3899–3906.
75. Nuzzo, R. G.; Allara, D. L. **Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces**. *Journal of the American Chemical Society* **105** No. 13 (1983) 4481–4483.
76. Schreiber, F. **Structure and growth of self-assembling monolayers**. *Progress in Surface Science* 65 No. 5–8 (2000) 151–257.
77. Vericat, C., Vela, M. E, Benitez, G. A., Gago, J. A. M., Torrelles, X., Salvarezza, R. **C. Surface characterization of sulfur and alkanethiols self-assembled monolayers on Au(111)** *J. Phys.: Condens. Matter* **18** (2006) R867–R900.
78. Blackie, E. J.; Ru, L., Eric, C.; Etchegoin, P. G. **Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Nonresonant Molecules** *J. Am. Chem. Soc.* **131** No. 40 (2009): 14466–14472.
79. Kato, H.; Noh, J., Hara, M., Kawai, M. **An HREELS Study of Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on Au(111)** *Journal of Physical Chemistry C* **106** (2002) 9655–9658.
80. Smith et al.; Lewis, P. A; Weiss, P. S. **Patterning Self-Assembled Monolayers** *Progress in Surface Science* **75** (2004) 1–68.

81. Dubois, C., Stellacci, F. **Self-Assembled Monolayer of Short Carboxyl-Terminated Molecules Investigated with ex Situ Scanning Tunneling Microscopy** *J. Phys. Chem. C* **112** No. 19 (2008) 7431–7435.
82. Sprik, M., Delamarche, E., Michel, B., Roethlisberger, U., M. Klein, L., Wolf, H., Ringsdorf, H. **Structure of Hydrophilic Self-Assembled Monolayers: A Combined Scanning Tunneling Microscopy and Computer Simulation Study** *Langmuir* **10** No. 11 (1994) 4116–4130.
83. Schönherr, H. Vancso, G. J. **An Atomic Force Microscopy Study of Self-Assembled Monolayers of Calix[4]resorcinarene Adsorbates on Au(111)** *Langmuir* **13** No. 6 (1997), 1567–1570.
84. Albonetti, C., Casalini, S., Borgatti, F., Floreano, L., Biscarini, F. **Morphological and mechanical properties of alkanethiol self-assembled monolayers investigated via bimodal atomic force microscopy** *Chem. Commun.*, **47**, (2011) 8823-8825.
85. Samant, M. G., Brown, C. A., Gordon, J. G. **Formation of an ordered self-assembled monolayer of docosaneselenol on gold(111). Structure by surface x-ray diffraction** *Langmuir* **8** No. 6 (1992) 1615–1618.
86. Camillone, N., Chidsey, C. E. D., Eisenberger, P., Fenter, P., Li, J., Liang, K. S., Liu, G. Y., Scoles, G. **Structural defects in self-assembled organic monolayers via combined atomic beam and x-ray diffraction** *J. Chem. Phys.* **99** (1993) 744-748.
87. Dilimon, V. S., Fonder, G., Delhalle, J., Mekhalif, Z. **Self-Assembled Monolayer Formation on Copper: A Real Time Electrochemical Impedance Study** *J. Phys. Chem. C* **115** No. 37 (2011) 18202–18207.
88. Laibinis, P. E., Whitesides, G. M., Allara, D. L., Tao, Y. T., Parikh, A. N., Nuzzo R. G. **Comparison of the structures and wetting properties of self-assembled monolayers of n-alkanethiols on the coinage metal surfaces, copper, silver, and gold** *J. Am. Chem. Soc.* **113** No. 19 (1991), 7152–7167.

89. Colin, D. Bain, Whitesides G. M. **Modeling Organic Surfaces with Self-Assembled Monolayers** *Angewandte Chemie* **28** No. 4 (1989) 506–512.
90. Day, B. S., Shuler S. F., Ducre, A., Morris, J. R. **The dynamics of gas-surface energy exchange in collisions of Ar atoms with ω -functionalized self-assembled monolayers** *J. Chem. Phys.* **119** (2003) 8084-8097.
91. Klutse, C. K., Mayer, A., Wittkamper, J., Cullum, B. M. **Applications of Self-Assembled Monolayers in Surface-Enhanced Raman Scattering** *Journal of Nanotechnology* **2012** (2012)1-10.
92. Varatharajan, S., Berchmans, S., Yegnaraman, V. **Tailoring self-assembled monolayers at the electrochemical interface** *J. Chem. Sci.*, **121** No. 5 (2009) 665–674.
93. Huh, Y. S., Chung, A. J., Erickson, D. **Surface enhanced Raman spectroscopy and its application to molecular and cellular analysis** *Microfluidics and Nanofluidics* **6** No. 3(2009) 285-297.
94. http://www.princeton.edu/~achaney/tmve/wiki100k/docs/Rayleigh_scattering.html, acessado em 01/08/2013.
95. <http://www.physics.rutgers.edu/ugrad/387/raman.pdf>, acessado em 01/08/2013.
96. <http://plaza.ufl.edu/dwhahn/Raman%20Scattering%20Theory.pdf>, acessado em 01/08/2013.
97. http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Raman_Spectroscopy/Raman%3A_Interpretation, acessado em 01/08/2013.
98. Blackie, E. J.; Le Ru, Eric, C.; Etchegoin, P. G. **Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Nonresonant Molecules.** *J. Am. Chem. Soc.* **131** No. 40 (2009) 14466–14472.

99. Blackie, E. J.; Le Ru, Eric C.; Meyer, M.; Etchegoin, P. G. **Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study.** *J. Phys. Chem. C* **111** No. 37 (2007): 13794–13803.
100. Freire, R. S.; Pessoa, C. A.; Mello, L. D.; Kubota, L. T. **Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity** *J. Braz. Chem. Soc.* **14** No. 2 (2003) 230-243.
101. Ohtani, T. M. M., Taniguchi, I. **Gold single-crystal electrode surface modified with self-assembled monolayers for electron tunneling with bilirubin oxidase** *Phys Chem Chem Phys.* **10** No. 46 (2008) 6928-6934.
102. Lee, T., Wang, W., Reed, M. A. **Mechanism of Electron Conduction in Self-Assembled Alkanethiol Monolayer Devices** *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1006** (2003) 21–35.
103. Wang, W., Lee, T., Reed, M. A. **Electron tunnelling in self-assembled monolayers** *Rep. Prog. Phys.* **68** (2005) 523-.
104. Malkhandi, S., Yang, B. , Manohar, A. K., Prakash, G. K., Narayanan, S. R. **Self-assembled monolayers of n-alkanethiols suppress hydrogen evolution and increase the efficiency of rechargeable iron battery electrodes.** *J Am Chem Soc.* **135** No. 1 (2013) 347-353.
105. Wang, W., Lee, T., Reed, M. A. **Mechanism of electron conduction in self-assembled alkanethiol monolayer devices** *Physical Review B* **68**, (2003) 035416.
106. Bain, C. D., Whitesides, G. M. **Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the length of the alkyl chain** *J. Am. Chem. Soc.* **111** No. 18 (1989) 7164–7175.
107. Yang, W. R., Hibbert, D. B., Zhang, R., Willett, G. D., Gooding, J. J. **Stepwise Synthesis of Gly-Gly-His on Gold Surfaces Modified with Mixed Self-Assembled Monolayers** *Langmuir* **21** (2005) 260-265.

108. Chidsey, C. E. D., Loiacono, D. N. **Chemical functionality in self-assembled monolayers: structural and electrochemical properties** *Langmuir* **6** No. 3 (1990) 682–691.
109. Slowinski, K., Chamberlain, R. V., Miller, C. J., Majda, M. **Through-Bond and Chain-to-Chain Coupling. Two Pathways in Electron Tunneling through Liquid Alkanethiol Monolayers on Mercury Electrodes** *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997) 11910-11919.
110. Bain, C. D., Evall, J., Whitesides, G. M. **Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the head group, tail group, and solvent** *J. Am. Chem. Soc.*, **111** No. 18 (1989) 7155–7164.
111. Tamada, K., Hara, M., Sasabe, H., Knoll, W. **Surface Phase Behavior of *n*-Alkanethiol Self-Assembled Monolayers Adsorbed on Au(111): An Atomic Force Microscope Study** *Langmuir* **13** No. 6 (1997) 1558–1566.
112. Kim, H. R., Park, S., Jung, C., Kim, J., Rhee, C. K., Hyun, M. S. **Selective adsorption of dithiolate-modified multi-wall carbon nanotubes onto alkanethiols self-assembled monolayers on Au(111)** *Chem. Commun.* **46** (2010) 6584-6586.
113. Silva, S. M.; Pimentel, D. M.; Luz, R. C. Silva,; Damos, F. S., **Direct Electron Transfer Kinetics of Horseradish Peroxidase on Self-Assembled Monolayer/Gold Nanoparticles Decorated Multi-walled Carbon Nanotubes** *International Journal of Electrochemical Science*; **7** No. 2 (2012)1348.
114. Du, D., Wang, M., Cai, J., Tao, Y., Tu, H., Zhang, A. **Immobilization of acetylcholinesterase based on the controllable adsorption of carbon nanotubes onto an alkanethiol monolayer for carbaryl sensing.** *Analyst* **133** No. 12 (2008):1790-1795.
115. Hu, J. P., Shi, J. H., Li, S. P., Qin, Y. J., Guo, Z.X., Song, Y. L., et al. **Efficient method to functionalize carbon nanotubes with thiol groups and fabricate gold nanocomposites** *Chemical Physics Letters* **401** (2005) 352-356.

116. Soreta, T. R., Strutwolf, J., Henry, O., O'Sullivan, C. K. **Electrochemical surface structuring with palladium nanoparticles for signal enhancement.** *Langmuir* **26** No. 14 (2010)12293-12299.
117. Chou, A., Eggers, P. K., Paddon-Row, M. N., Gooding J. J. **Self-Assembled Carbon Nanotube Electrode Arrays: Effect of Length of the Linker between Nanotubes and Electrode** *J. Phys. Chem. C* **113**, (2009) 3203–3211.
118. Wink, Th., van Zuilen, S. J. , Bult, A., van Bennekom, W. P. **Self-assembled Monolayers for Biosensors** *Analyst* **122** (1997) 43R-50R.
119. Chaki, N. K., Vijayamohanan, K. **Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications** *Biosensors and Bioelectronics* **17** No. 1–2 (2002) 1–12.
120. Dong, S., Li, J. **Self-assembled monolayers of thiols on gold electrodes for bioelectrochemistry and biosensors** *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **42** No. 1 (1997) 7–13.
121. Malkhandi, S., Yang, B., Manohar, A. K., Prakash, G. K., Narayanan, S. R. **Self-assembled monolayers of n-alkanethiols suppress hydrogen evolution and increase the efficiency of rechargeable iron battery electrodes.** *J Am Chem Soc.* **135** No. 1 (2013) 347-353.
122. Tian, Y., Mao, L., Okajima, T., Ohsaka, T. **Superoxide dismutase-based third-generation biosensor for superoxide anion** *Anal Chem.* **74** No. 10 (2002) 2428-2434.
123. Tian, Y., Ariga, T., Takashima, N., Okajima, T., Mao, L., Ohsaka, T. **Self-assembled monolayers suitable for electron-transfer promotion of copper, zinc-superoxide dismutase** *Electrochemistry Communications* **6** No. 6 (2004) 609-614.
124. Tian, Y., Mao, L., Okajima, T., Ohsaka, T. **Electrochemistry and Electrocatalytic Activities of Superoxide Dismutases at Gold Electrodes Modified with a Self-Assembled Monolayer** *Anal. Chem.* **76** No. 14 (2004): 4162–4168.

125. Wang, Z. H., Cui, H., Wan, Q. J., Yang, N. J. **A Simple Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Catalase Immobilized in Nano-Structural Composite Film** *Advanced Materials Research*, **704** (2013) 258.
126. Scheller, F. W., Wollenberger, U., Lei, C., Jin, W., Ge, B., Lehmann, C., Lisdat, F., Fridman, V. **Bioelectrocatalysis by redox enzymes at modified electrodes** *Reviews in Molecular Biotechnology* **82** No. 4 (2002) 411-424.
127. Liu, C. Y., Hu, J. M. **Direct electrochemistry and electrocatalysis of horseradish peroxidase immobilized on l-glutathione self-assembled monolayers** *Chinese Chemical Letters*, **19** No. 8 (2008) 955-958.
128. Imabayashi, S., Kong, Y. T., Watanabe, M. **Amperometric Biosensor for Polyphenol Based on Horseradish Peroxidase Immobilized on Gold Electrodes** *Electroanalysis* **13** No. 5 (2001) 408–412.
129. Gaspar, S., Zimmermann, H., Gazaryan, I., Csöregi, E., Schuhmann, W. **Hydrogen Peroxide Biosensors Based on Direct Electron Transfer from Plant Peroxidases Immobilized on Self-Assembled Thiol-Monolayer Modified Gold Electrodes** *Electroanalysis* **13** No. 4 (2001) 284–288.
130. Kharitonov, A. B, Zayats, M., Lichtenstein, A., Katz, E., Willner, I. **Enzyme monolayer-functionalized field-effect transistors for biosensor applications** *Sensors and Actuators B: Chemical* **70** No. 1–3 (2000) 222-231.
131. Kim, D. S., Park, J. E., Shin, J. K., Kim, P. K., Lim, G., Shoji, S. **An extended gate FET-based biosensor integrated with a Si microfluidic channel for detection of protein complexes** *Sensors and Actuators B: Chemical* **117** No. 2 (2006) 488-494.
132. Hejazi, M. S., Pournaghi-Azar, M. H., Ahour, F. **Electrochemical detection of short sequences of hepatitis C 3a virus using a peptide nucleic acid-assembled gold electrode** *Anal Biochem.* **399** No. 1 (2010) 118-124.

133. Gau, J. J., Lan, E. H., Dunn, B., Ho, C. M., Woo, J. C. **A MEMS based amperometric detector for E. coli bacteria using self-assembled monolayers.** *Biosens Bioelectron.* **16** No. 9-12 (2001) 745-755.
134. Arturo, J., Horsman, G., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J., Gennis, R. B. **The superfamily of heme-copper respiratory oxidases** *Journal of Bacteriological* **176** No. 18 (1994) 5587-5600.
135. Ferguson-Miller, S. **Heme/Copper Terminal Oxidases** *Chem. Rev.* **96** (1996) 2889-2907.
136. Babcock, G. T., Wikstrom, M. **Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration** *Nature* **356** (1992) 301-309.
137. Michel, H. **Cytochrome c oxidase: catalytic cycle and mechanisms of proton pumping - a discussion** *Biochemistry*, **38** No. 46 (1999) 15129-15140.
138. Belevich, I., Verkhovsky, M. I., Wikstro, M. **Proton-coupled electron transfer drives the proton pump of cytochrome c oxidase** *Nature* **440** (2006) 829-832.
139. Gennis, R. B. **Coupled proton and electron transfer reactions in cytochrome oxidase** *Front. Biosci.* **9** (2004) 581-591.
140. Deterding, L. J., Barr, D. P., Mason, R. P., Tomer **Characterization of Cytochrome c Free Radical Reactions with Peptides by Mass Spectrometry** *Journal of Biological Chemistry* **273** (1998) 12863-12869.
141. R. Chen, M. R. Gunther, and R. P. Mason **An Electron Spin Resonance Spin-trapping Investigation of the Free Radicals Formed by the Reaction of Mitochondrial Cytochromec Oxidase with H₂O₂** *The Journal of Biol. Chem.* **274** (1999) 3308-3314.

142. Proctor, P. H., **Free Radicals and Human Disease, a Review** *Handbook of Free Radicals and Antioxidants* **1** (1989) 209-221.
143. Villa, R. D., da Silva, M. R. A., Nogueira, R. F. P. **Potencial de aplicação do processo foto-Fenton/solar como pré-tratamento de efluente da indústria de laticínios** *Quím. Nova* **30**(8) (2007) 1799-1803.
144. Rhodes C.J.: *Toxicology of the Human Environment - The Critical Role of Free Radicals*, Taylor and Francis, London (2000).
145. <http://www.iupac.org/goldbook/HT06787.pdf>
146. <http://www.iupac.org/goldbook/FT06786.pdf>
147. Porter, N. A., Caldwell, S. E., Mills, K. A. **Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids** *Lipids* **30** No. 4 (1995) 277-290
148. Church, D. F., Pryor, W. A. **Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications** *Environ Health Perspect.* **64** (1985) 111–126.
149. O'Brien, P. J. **Radical formation during the peroxidase catalyzed metabolism of carcinogens and xenobiotics: the reactivity of these radicals with GSH, DNA, and unsaturated lipid.** *Free Radic Biol Med.* **4** No. 3 (1988) 169-83.
150. Desco, M. C., Asensi, M., Márquez, R., Martínez-Valls, J., Vento, M., Pallardó, F. V., Sastre, J., Viña, J. **Xanthine Oxidase Is Involved in Free Radical Production in Type 1 Diabetes Protection by Allopurinol** *Diabetes* **51** No. 4 (2002) 1118-1124.
151. Kuppusamy, P., Zweier, J. L. **Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation** *Journal of Biological Chemistry* **264** No. 15 (1989) 9880-9884.

152. Hanano, R., Kaufmann, S. H. E. **Free radicals and cytokines by activated alveolar macrophages are insufficient for protection against *Pneumocystis carinii* in the absence of CD4⁺ T cells** *Immunology Letters* 56 No. 1 (1997) 32.
153. Fantone, J. C., Ward, P. A. **Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions** *Am J Pathol.* 107 No. 3 (1982) 395–418.
154. Rosen, G. M., Pou, S., Ramos, C. L., Cohen, M. S., Britigan, B. E. **Free radicals and phagocytic cells** *The FASEB Journal* 9 (1995) 200-209.
155. Kohchi, C., Inagawa, H., Nishizaka, T., Soma, G. I. **ROS and Innate Immunity** *Anticancer Res. I* 29 3 (2009) 817-821.
156. Raha, S., Robinson, B. H. **Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis** *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* 106 No. 1 (2001) 62-70.
157. Wolfe, J. T., Ross, D., Cohen, G. M. **A role for metals and free radicals in the induction of apoptosis in thymocytes** *FEBS-Lett.* 352 No. 1 (1994) 58-62.
67. Jacob, R. A. **The integrated antioxidant system** *Nutrition Research* 15 No. 5 (1995) 755-766.
158. Halliwell, B., Gutteridge, J. M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Third Edition, Oxford University Press (1998). p. 200-216.
159. Byers, T., Perry, G. **Dietary Carotenes, Vitamin C, and Vitamin E as Protective Antioxidants in Human Cancers** *Annual Review of Nutrition* 12 (1992) 139-159.
160. Bagchi, D., Garg, A., Krohn, R. L., Bagchi, M., Tran, M. X., Stohs, S. J. **Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro** *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 95 No. 2 (1997) 179-189.

161. Niki, E., Noguchi, N., Tsuchihashi, Gotoh, H. N. **Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene** *American Journal of Clinical Nutrition* **62** (1995) 1322S-1326S.
162. Aebert, H., Cornelius, T., Birnbaum, D. E., Siegel, A. V., Riegger, G. A. J., Schunkert, H., Edge, R., McGarvey, D. J., Truscott, T. G. **The carotenoids as antioxidants - a review** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **41** No. 3 (1997) 189-200.
163. Fauconneau, B., Waffo-Teguo, P., Huguet, F., Barrier, L., Decendit, A., Merillon, J. M. **Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using *in vitro* tests** *Life Sciences* **61** No. 21 (1997) 2103-2110.
164. Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. **Antioxidant properties of phenolic compounds** *Trends in Plant Science* **2** No. 4 (1997) 152-159.
165. Marty, L., Brach, T., Hell, R., Meyer, A. **Sensing the glutathione redox potential in living cells** **146** No. 4 (1) (2007) S257.
166. McCord, J. M., Fridovich, I. **Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988)** *Free Radic. Biol. Med.* **5** No. 5-6 (1988) 363-369.
167. LiocheV, S. I. Fridovich, I. **Copper- and Zinc-containing Superoxide Dismutase Can Act as a Superoxide Reductase and a Superoxide Oxidase** *Journal of Biological Chemistry* **275** (2000), 38482-38485.
168. Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Richardson, J. S., Richardson, D. C. **Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase** *Nature* **306** No. 5940 (1983): 284-287.
169. Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P. C. **Diversity of structures and properties among catalases** *Cell. Mol. Life Sci.* **61** No. 2 (2004) 192-208.

170. Epp, O., Ladenstein, R., Wendel, A. **The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution** *Eur. J. Biochem.* **133** No. 1 (1983): 51–69.
171. Pompella, A.; Visvikis, A.; Paolicchi, A.; De Tata, V.; Casini, A. F. **The changing faces of glutathione, a cellular protagonist.** *Biochemical Pharmacology* **66** No. 8 (2003) 1499–503.
172. Lu, C., Song, G., Lin, J. M. **Reactive oxygen species and their chemiluminescence-detection methods** *Trends in Analytical Chemistry* **25** No. 10 (2006) 985–995.
173. Yamaguchi, K., Uematsu, D., Itoh, Y., Watanabe, S., Fukuuchi, Y. **In vivo measurement of superoxide in the cerebral cortex during anoxiareoxygenation and ischemia-reperfusion** *K eio J. Med.* **51** No. 4 (2002) 201-207.
174. Kondo, M., Itoh, S., Isobe, K., Kondo, M., Kunikata, T., Imai, T., Onishi, S. **Chemiluminescence because of the Production of Reactive Oxygen Species in the Lungs of Newborn Piglets during Resuscitation Periods after Asphyxiation Load** *Pediatr. Res.* **47** No. 4 (2000) 524-527.
175. Sumi, D., Hayashi, T., Thakur, N. K., Jayachandran, M., Asai, Y., Kano H., Matsui H., Iguchi A. **A HMG-CoA reductase inhibitor possesses a potent anti-atherosclerotic effect other than serum lipid lowering effects — the relevance of endothelial nitric oxide synthase and superoxide anion scavenging action** *Atherosclerosis* **155** (2001) 347-357.
176. Lucantoni, G., Pietraforte, D., Matarrese, P., Gambardella, L., Metere, A., Paone, G., Bianchi, E. L., Straface, E. **The Red Blood Cell as a Biosensor for Monitoring Oxidative Imbalance in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: An Ex Vivo and In Vitro Study** *Antioxidants & Redox Signaling* **8** No. 7-8 (2006): 1171-1182.

177. Brambilla, D., Droumaguet, B. L., Nicolas, J., S. Hashemi, H., Wu, L. P., Moghimi, S. M., Couvreur, P., Andrieux, K. **Nanotechnologies for Alzheimer's disease: diagnosis, therapy, and safety issues** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **7** (2011) 521–540.
178. Ignatov, S., Shishniashvili, D., Ge, B., Scheller, F. W., Lisdat, F. **Amperometric biosensor based on a functionalized gold electrode for the detection of antioxidants** *Biosensors and Bioelectronics* **17** (2002) 191–199.
179. Tarpey, M. M., Fridovich, I. **Methods of Detection of Vascular Reactive Species Nitric Oxide, Superoxide, Hydrogen Peroxide, and Peroxynitrite** *Circ Res.* **89** (2001)224-236.
180. Carter, W. O., Narayanan, P. K., Robinson, J. P. **Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells.** *Journal of Leukocyte Biology* **55** No. 2 (1994) 253-258.
181. Babbs, C. F. **Histochemical methods for localization of endothelial superoxide and hydrogen peroxide generation in perfused organs.** *Methods Enzymol.* **233** (1994) 619-630.
182. Hamby-Mason, R. L., Mason, P. A., Schenker, S., Henderson, G. I. **Histochemical method for localization of hydrogen peroxide and oxygen radicals in the intact neonatal brain** *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **20** No. 9 (1998): 743.
183. Tarpey, M. M., Wink, D. A., Grisham, M. B. **Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286** (2004) R431–R444.
184. Mojtab, S.; Mehdi, A.; Mousavi, Davarkhah, R. M. F. **A Novel Hydrogen Peroxide Sensor Based on the Direct Electron Transfer of Catalase Immobilized on Nano-Sized NiO/MWCNTs Composite Film** *Electroanalysis* **24** No. 2 (2012): 357-367.

185. Bing, Z.; Yuling, C.; Chen, H., Liu, B. Q., Chen, G. N., Tang, D. P. **A New Electrochemical Biosensor for Determination of Hydrogen Peroxide in Food Based on Well-Dispersive Gold Nanoparticles on Graphene Oxide** *Electroanalysis* **23** No.8 (2011): 1821-1829.
186. Choi, M. M. F.; Yiu, T. P. **Immobilization of beef liver catalase on eggshell membrane for fabrication of hydrogen peroxide biosensor** *Enzyme and Microbial Technology* **34** No. 1 (2004) 41-47.
187. Di, J.; Zhang, M.; Yao, K. S. B. **Direct voltammetry of catalase immobilized on silica sol-gel and cysteine modified gold electrode and its application** *Biosensors and Bioelectronics* **22** No. 2 (2006) 247-252.
188. Solanki, P. R.; Kaushik, A.; Ansari, A. A., Sumana, G., Malhotra, B. D. **Horse radish peroxidase immobilized polyaniline for hydrogen peroxide sensor** *Polymers for Advanced Technologies* **22** No. 6 (2011): 903-908.
189. Gopalan, A. I.; Komathi, S.; Anand, G. S., Lee, K. P. **Nanodiamond based sponges with entrapped enzyme: A novel hydrogen peroxide electrochemical probe for Hydrogen Peroxide** *Biosensors and Bioelectronics* **46**: 136-141, 2013.
190. Zhan, Y.; Tan, X.; Lai, G.; Yu, A. M., Han, D. Y., Zhang, H. L. **Porous-Magnetic Chitosan Microsphere/Horseradish Peroxidase Modified Electrode for the Selective Determination of Hydrogen Peroxide** *Nanoscience and Nanotechnology Letters* **5** No. 6 (2013): 684-689.
191. Nandini, S.; Nalini, S.; Manjunatha, R., Shanmugam, S. Melo, J. S., Suresh, G. S. **Electrochemical biosensor for the selective determination of hydrogen peroxide based on the co-deposition of palladium, horseradish peroxidase on functionalized-graphene modified graphite electrode as composite** *Journal of Electroanalytical Chemistry* **689**: (2013) 233-242.

192. Wan, J.; Wang, W.; Yin, G.; Ma, X. J. **An Amperometric Biosensor of Determination H_2O_2 Based on Horseradish Peroxidase in Carbon Nanotubes/Ionic Liquid** *Journal of The Chemical Society of Pakistan* **34** No. 6 (2012):1426-1432.
193. Rad, A. S.; Jahanshahi, M.; Ardjmand, M.; Safekordi, A. A. **A new electrochemical biosensor for hydrogen peroxide using HRP/AgNPs /cysteamine/p-ABSA/GCE self-assembly modified electrode** *Korean Journal of Chemical Engineering* **29** No. 12 (2012) 1766-1770.
194. Negahdary, M.; Asadi, A.; Mehrtashfar, S.; Imandar, M.; Akbari-Dastjerdi, H.; Salahi, F.; Jamaledini, A.; Ajdary, M. **A Biosensor for Determination of H_2O_2 by Use of HRP Enzyme and Modified CPE With ZnO Nps** *International Journal of Electrochemical Science* **7** No. 6 (2012) 5185-5194.
195. Wang, Y.; Du, J.; Li, Y.; Shan, D. L.; Zhou, X. B.; Xue, Z. H.; Lu, X. Q. **A amperometric biosensor for hydrogen peroxide by adsorption of horseradish peroxidase onto single-walled carbon nanotubes** *Colloids And Surfaces B-Biointerfaces* **90** (2012) 62-67.
196. Li, S. F.; Zhu, X. Y.; Zhang, W.; Xie, G. M.; Feng, W. L. **Hydrogen peroxide biosensor based on gold nanoparticles/thionine/gold nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes-chitosans composite film-modified electrode** *Applied Surface Science* **258** No. 7 (2012) 2802-2807.
197. Rover, L. Jr, Kubota, L. T., Höehr, N. F. **Development of an amperometric biosensor based on glutathione peroxidase immobilized in a carbodiimide matrix for the analysis of reduced glutathione from serum.** *Clin Chim Acta.* **308** No 1-2 (2001) 55-67.
198. Scheller, F. W., Wollenberger, U., Lei, C., Jin, W., Ge, B., Lehmann, C., Lisdat, F., Fridman, V. **Bioelectrocatalysis by redox enzymes at modified electrodes.** *J Biotechnol.* **82** No. 4 (2002) 411-24.

199. Lehmann, C., Wollenberger, U., Brigelius-Flohe, R., Scheller, F. W. **Modified Gold Electrodes for Electrochemical Studies of the Reaction of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase with Glutathione and Glutathione Disulfide** *Electroanalysis* **13** No. 5 (2001)
200. Collins, C. A., Fry, F. H., Holme, A. L., Yiakouvaki, A., Al-Qenaie, A., Pourzand, C., Jacob, C. **Towards multifunctional antioxidants: synthesis, electrochemistry, in vitro and cell culture evaluation of compounds with ligand/catalytic properties** *Org. Biomol. Chem* **3** (2005) 1541-1546.
201. Zhao, H., Joseph, J., Fales, H. M., Sokoloski, E. A., Levine, R. L., Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B. **Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** No 16 (2005) 5727–5732.
202. Nazarewicz, R. R., Bikineyeva, A., Dikalov, S. I. **Rapid and Specific Measurements of Superoxide Using Fluorescence Spectroscopy** *J Biomol Screen.* **4** 18(2013) 498-503.
203. Souchard, J. P., Barbacanne, M.A., Bayard, F., Nepveu, F., Arnal J. F. **Detection of superoxide anion release by endothelial cells using reduced cytochrome c UV-visible absorption, ESR spin trapping, hydroethidine fluorescence and lucigenin-enhanced chemiluminescence techniques** *Analisis* **28** (2000)475-478.
204. Hideg, É., Barta, C., Kálai, T., Vass, I., Hideg, K., Asada, K. **Detection of Singlet Oxygen and Superoxide with Fluorescent Sensors in Leaves Under Stress by Photoinhibition or UV Radiation** *Plant Cell Physiol.* **43** No. 10 (2002) 1154–1164.
205. Xu, K., Liu, X., Tang, B., Yang, G., Yang, Y., na, L. **Design of a phosphinate-based fluorescent probe for superoxide detection in mouse peritoneal macrophages** *Chemistry.* **13** No. 5 (2007) 1411-1416.

206. Deng, Z., Rui, Q., Yin, X., Liu, H., Tian, Y. **In Vivo Detection of Superoxide Anion in Bean Sprout Based on ZnO Nanodisks with Facilitated Activity for Direct Electron Transfer of Superoxide Dismutase** *Anal. Chem.* **80** (2008) 5839–5846.
207. Li XR, Wang B, Xu JJ, Chen HY. **In vitro detection of superoxide anions released from cancer cells based on potassium-doped carbon nanotubes-ionic liquid composite gels.** *Nanoscale.* **3** No. 12 (2011) 5026-5033.
208. Wang, L., Wen, W; Xiong, HY ; Zhang, XH ; Gu, HS ; Wang, SF **A novel amperometric biosensor for superoxide anion based on superoxide dismutase immobilized on gold nanoparticle-chitosan-ionic liquid biocomposite film** *Analytica Chimica Acta* **758** (2013) 66-71.
209. Wang, MD ; Han, YT ; Liu, XX ; Nie, Z; Deng, CY ;Guo, ML ; Yao, SZ **Assembly of layer-by-layer films of superoxide dismutase e and gold nanorods: A third generation biosensor for superoxide anion** *Science China-Chemistry* **54** No. 8 (2011)1284-1291.
210. Rajesh, S.; Kanugula, A. K.; Bhargava, K.; Ilavazhagan, G.; Kotamraju, S.; Karunakaran, C. **Simultaneous electrochemical determination of superoxide anion radical and nitrite using Cu,ZnSOD immobilized on carbon nanotube in polypyrrole matrix** *Biosensors and Bioelectronics* **26** No. 2 (2010) 689-695.
211. Liu, H. Q.; Tian, Y.; Xia, P. P. **Pyramidal, rodlike, spherical gold nanostructures for direct electron transfer of copper, zinc-superoxide dismutase: Application to superoxide anion biosensors** *Langmuir* **24** No. 12 (2008) 6359-6366.
212. Di, J. W.; Peng, S. H.; Shen, C. P.; Gao, Y. S.; Tu, Y. F. **One-step method embedding superoxide dismutase and gold nanoparticles in silica sol-gel network in the presence of cysteine for construction of third-generation biosensor** *Biosensors and Bioelectronics* **23** No. 1 (2007) 88-94.

213. Xia, Y., Zweier, J. L. **Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (1997) 6954–6958.
214. Finnerty, N. J.; O’Riordan, S. L.; Brown, F. O.; Serra, P. A.; O’Neill, R. D.; Lowry, J. P. **In vivo characterisation of a Nafion (R)-modified Pt electrode for real-time nitric oxide monitoring in brain extracellular fluid** *Analytical Methods* **4** No. 2 (2012) 550-557.
215. Brown, F. O.; Finnerty, N. J.; Lowry, J. P. **Nitric oxide monitoring in brain extracellular fluid: characterisation of Nafion (R)-modified Pt electrodes in vitro and in vivo** *Analyst* **134** No. 10 (2009) 2012-2020.
216. Brown, F. O.; Lowry, J. P. **Microelectrochemical sensors for in vivo brain analysis: an investigation of procedures for modifying Pt electrodes using Nafion (R)** *Analyst* **128** No. 6 (2003) 700-705.
217. Pacher, P., Beckman, J. S., Liaudet, L. **Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease** *Physiol Rev* **87**: 315–424, 2007.
218. Szabó, C., Ischiropoulos, H., Radi, R. **Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics.** *Nat Rev Drug Discov.* **6** No. 8 (2007) 662-680.
219. Koh, W. C. A.; Son, J. I.; Choe, E. S.; Shim, YB **Electrochemical Detection of Peroxynitrite Using a Biosensor Based on a Conducting Polymer-Manganese Ion Complex** *Analytical Chemistry* **82** No. 24 (2010) 10075-10082.
220. Cortes, J. S.; Granados, S. G.; Ordaz, A. A.; Jimenez, J. A. L.; Griveau, S.; Bedioui, F. **Electropolymerized Manganese tetraaminophthalocyanine thin films onto platinum ultramicroelectrode for the electrochemical detection of peroxynitrite in solution** *Electroanalysis* **19** No. 1 (2007) 61-64.

221. Koh, W. C. A.; Son, J. I.; Choe, E. S.; Shim, Y. B. **Response to the Comment on "Electrochemical Detection of Peroxynitrite Using a Biosensor Based on a Conducting Polymer-Manganese Ion Complex"** *Analytical Chemistry* **83** No. 13 (2011) 5465-5466.
222. Deneke, S. M. **Thiol-based antioxidants.** *Curr Top Cell Regul* **36** (2000) 151-180.
223. Rosa E. Hansen, Doris Roth, and Jakob R. Winther **Quantifying the global cellular thiol– disulfide status** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106** No. 2 (2009) 422– 427.
224. Ziegler, D. M. **Role of Reversible Oxidation-Reduction of Enzyme Thiols-Disulfides in Metabolic Regulation** *Ann. Rev. Biochem.* **54** (1985) 305-329.
225. Kumar, P.; Maurya, P. K. **L-Cysteine Efflux in Erythrocytes As A Function of Human Age: Correlation with Reduced Glutathione and Total Anti-Oxidant Potential** *Rejuvenation Research* **16** No. 3 (2013) 179-184.
226. Rellán-Alvarez, R., Hernández, L. E., Abadía, J., Alvarez-Fernández, A. **Direct and simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione and homoglutathione by liquid chromatography-electrospray/mass spectrometry in plant tissue extracts.** *Anal Biochem.* **356** No. 2 (2006) 254-264.
227. Venè, R., Castellani, P., Delfino, L., Lucibello, M., Ciriolo, M. R., Rubartelli, A. **The cystine/cysteine cycle and GSH are independent and crucial antioxidant systems in malignant melanomacells and represent druggable targets.** *Antioxid Redox Signal.* **15** No. 9 (2011) 2439-2453.
228. Owen, J. B., Butterfield, D. A. **Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio** *Methods Mol Biol.* **648** (2010) 269-277.
229. Harvey, P. R. C., Ilson, R. G., Strasberg, S. M. **The simultaneous determination of oxidized and reduced glutathiones in liver tissue by ion pairing reverse phase**

high performance liquid chromatography with a coulometric electrochemical detector *Clinica Chimica Acta* **180** (1989) 203-212.

230. Németh, I., Boda D. **The ratio of oxidized/reduced glutathione as an index of oxidative stress in various experimental models of shock syndrome.** *Biomed Biochim Acta* **48** No. 2-3 (1989) S53-S57.

231. Ru, J., Du, J., Qin, D. D., Huang, B. M., Xue, Z. H., Zhou, X. B., Lu, X. Q. **Na electrochemical glutathione biosensor: ubiquinone as a transducer.** *Talanta* **110** (2013) 15-20.

232. Turunc, E., Karadeniz, H., Armagan, G., Erdem, A., Yalcin, A. **Electrochemical determination of glutathione in plasma at carbon nanotubes based screen printed electrodes.** *Comb Chem High Throughput Screen.* (2013) Jun 17.

233. Ensafi AA, Karimi-Maleh H, Mallakpour S. **A new strategy for the selective determination of glutathione in the presence of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) using a novel modified carbon nanotube paste electrode.** *Colloids Surf B Biointerfaces* **104** (2013) 186-193.

234. Moradi, R., Sebt, S. A., Karimi-Maleh, H., Sadeghi, R., Karimi, F., Bahari, A., Arabi, H. **Synthesis and application of FePt/CNTs nanocomposite as a sensor and novel amide ligand as a mediator for simultaneous determination of glutathione, nicotinamide adenine dinucleotide and tryptophan.** *Phys Chem Chem Phys.* **15** No. 16 (2013) 5888-5897.

235. Chauhan N, Narang J, Meena, Pundir CS. **An amperometric glutathione biosensor based on chitosan-iron coated gold nanoparticles modified Pt electrode.** *Int J Biol Macromol.* **51** No. 5 (2012):879-886.

236. Wink, D. A., Nims, R. W., Darbyshire, J. F., Christodoulou, D., Hanbauer, I, Cox, G. W., Laval, F., Laval, J., Cook, J. A. **Reaction Kinetics for Nitrosation of Cysteine and Glutathione in Aerobic Nitric Oxide Solutions at Neutral pH. Insights into the Fate and Physiological Effects of Intermediates Generated in the NO/O₂ Reaction**

Chem. Res. Toxicol. **7** No. 4 (1994) 519–525.

237. Abiman, P., Wildgoose, G. G., Compton, R. G. **Electroanalytical Exploitation of Nitroso Phenyl Modified Carbon-Thiol Interactions: Application to the Low Voltage Determination of Thiols** *Electroanalysis* **19** No. 4 (2007) 437 – 444.

238. Santhiago, M., Lima, P. R., Santos, W. J. R., Kubota, L. T. **An amperometric sensor for l-cysteine based on nanostructured platform modified with 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)** *Sensors and Actuators B: Chemical* Volume **146** No. 1(2010) 213–220.

239. Hoensch, H., Oertel, R. **Anti-inflammatory effects of tea-flavonoids** *Dtsch Med Wochenschr.* **137** No. 51-52 (2012) 2738-2740.

240. Kris-Etherton, P. M., Lefevre, M., Beecher, G. R., Gross, M. D., Keen, C. L., Etherton, T. D. **Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis.** *Annu Rev Nutr.* **24** (2004) 511-538.

241. Jones, D. J., Lim, C. K., Ferry, D. R., Gescher, A. **Determination of quercetin in human plasma by HPLC with spectrophotometric or electrochemical detection** *Biomed Chromatogr.* **12** No.4 (1998) 232-235.

242. Paul A. Kilmartin. **Electrochemical Detection of Natural Antioxidants: Principles and Protocols** *Antioxidants and Redox Signaling* **3** No. 6 (2001) 941-955.

243. Ignatov, S., Shishniashvili, D., Ge, B., Scheller, F.W., Lisdat, F. **Amperometric biosensor based on a functionalized gold electrode for the detection of antioxidants** *Biosensors and Bioelectronics* **17** (2002) 191–199.

244. Paulsen, C. E., Truong, T. H., Garcia, F. J., Homann, A., Gupta, V., Leonard, S. E., Carroll, K. S. **Peroxide-dependent sulfenylation of the EGFR catalytic site enhances kinase activity** *Nature Chemical Biology* **8** (2012) 57–64.

245. Freeman, M. L., Huntley, S. A., Meredith, M. J., Senisterra, G. A., Lepock, J. **Destabilization and denaturation of cellular protein by glutathione depletion.** *Cell Stress Chaperones*. **2** No.3 (1997) 191-198.
246. Bagiyani, G. A., Koroleva, I. K., Soroka, N. V., Ufimtsev, A. V. **Oxidation of thiol compounds by molecular oxygen in aqueous solutions** *Russian Chemical Bulletin* **52** No. 5 (2003) 1135-1141.
247. Saurin, A. T., Neubert, H., Brennan, J. P., Eaton, P. **Widespread sulfenic acid formation in tissues in response to hydrogen peroxide** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** No. 52 (2004) 17982–17987.
248. Reddie, K. G., Seo, Y. H., Muse, W. B., Leonard, S. E., Carroll, K. S. **A chemical approach for detecting sulfenic acid-modified proteins in living cells** *Mol Biosyst* **4** No. 6 (2008) 521–531.
249. Poole, L. B., Klomsiri, C., Knaggs, S. A., Furdui, C. M., Nelson, K. J., Thomas, M, J., Fetrow, J. S., Daniel, L. W., King, S. B. **Fluorescent and affinity-based tools to detect cysteine sulfenic acid formation in proteins** *Bioconjug Chem.* **18** No. 6 (2007) 2004-2017.
250. Carballal, S., Radi, R., Kirk, M. C., Barnes, S., Freeman, B. A., Alvarez, B. **Sulfenic Acid Formation in Human Serum Albumin by Hydrogen Peroxide and Peroxynitrite** *Biochemistry* **42** No. 33 (2003) 9906–9914.
251. Bonini, M. G., Miyamoto, S., Di Mascio, P., Augusto, O. **Production of the Carbonate Radical Anion during XanthineOxidase Turnover in the Presence of Bicarbonate** *The Journal of Biological Chemistry* **279** No. 50 (2004) 51836–51843.
252. Morgan, J., David, S. **Leake Oxidation of low density lipoprotein by iron or copper at acidic pH** *Journal of Lipid Research* **36** (1995) 2504-2512.

253. De Vos, C. H. R., Vonk, M. J., Vooijs, R., Schat, H. **Glutathione Depletion Due to Copper-induced Phytochelatin Synthesis Causes Oxidative Stress in *Silene cucubalus*** *Plant Physiol.* **98** (1992) 853-858.
254. Betz, S. F. **Disulfide bonds and the stability of globular proteins** *Protein Science* **2** No. 10 (1993) 1551–1558.
255. Creighton, T. E. **Protein folding.** *Biochem J.* **270** No. 1 (1990) 1–16.
256. Giuseppe Filomeni Giuseppe Rotilio, Maria Rosa Ciriolo **Cell signalling and the glutathione redox system** *Biochemical Pharmacology* **64** No. 5–6, (2002) 1057–1064.
257. Hogg, P. J. **Disulfide bonds as switches for protein function** *Trends in Biochemical Science* **28** No. 4 (2003) 210–214.
258. Leichert, L. I., Gehrke, F., Gudiseva, H. V., Blackwell, T., Ilbert, M., Walker, A. K., Strahler, J. R., Andrews, P. C., Jakob, U. **Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress *in vivo*** *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105** No. 24 (2008) 8197–8202.
259. Klatt, P., Lamas, S. **Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress** *The FEBS European Journal of Biochemistry* **267** No. 16 (2000) 4928–4944.
260. Jackson, R. C., Harrap, K. R., Smith, C. A. **Binding of glutathione and cysteine to cellular protein by mixed disulphide bonds.** *Biochem J.* **110** No. 3 (1968) 37P.
261. Gruber, C. W., Cemazar, M., Heras, B., Martin, J. L., Craik, D. J. **Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding.** *Trends in Biochemical Sciences* **31** No. 8 (2006) 455–464.
262. Hodges, R. S., Zhou, N. E., Kay, C. M., Semchuk, P. D. **Synthetic model proteins: contribution of hydrophobic residues and disulfide bonds to protein stability.** *Pept Res.* **3** No. 3 (1990):123-137.

263. Corte, E. D., Stirpe, F. **The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme** *Biochem. J.*, **126** (1972) 739–745.
264. Walker, S., Ullman, O., Stultz, C. M. **Using Intramolecular Disulfide Bonds in Tau Protein to Deduce Structural Features of Aggregation-resistant Conformations** *J Biol Chem.* **287** No. 12 (2012) 9591–9600.
265. Chong, J. M., Speicher, D. W. **Determination of Disulfide Bond Assignments and N-Glycosylation Sites of the Human Gastrointestinal Carcinoma Antigen GA733-2 (CO17-1A, EGP, KS1-4, KSA, and Ep-CAM)** *Journal of Biological Chemistry* **276** (2001) 5804-5813.
266. Oda, Y., Nagasu, T., Chait, B. T. **Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome** *Nature* **19** (2001) 379-382.
267. Bingham, J. P., Broxton, N. M., Livett, B. G., Down, J. G., Jones, A., Moczydlowski, E. G. **Optimizing the connectivity in disulfide-rich peptides: α -conotoxin SII as a case study** *Analytical Biochemistry* **338** (2005) 48–61.
268. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M. **Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules** *Science* **246** No. 4926 (1989) 64-71.
269. Castner, D. G. **X-ray Photoelectron Spectroscopy Sulfur 2p Study of Organic Thiol and Disulfide Binding Interactions with Gold Surfaces** *Research Article X-ray Photoelectron Spectroscopy Sulfur 2p Study of Organic Thiol and Disulfide Binding Interactions with Gold Surfaces* *Langmuir* **12** No. 21 (1996) 5083–5086.
270. Mori, R. A.; Paris, E.; Giuli, G.; Eeckhout, S. G.; Kavcic, M.; Zitnik, M.; Bucar, K.; Pettersson, L. G. M.; Glatzel, P. **Electronic Structure of Sulfur Studied by X-ray Absorption and Emission Spectroscopy** *Analytical Chemistry* **81** No. 15 (2009) 6516-6525.

271. Dumont, E., Ferre, N. **Geometrical Embedding Governs a Dramatic Variation of Electron Paramagnetic Resonance Hyperfine Coupling Constants of Disulfide Radical Anions** *Journal of Physical Chemistry B* **115** No. 20 (2011) 6776-6783.
272. Windle, J. J., Wiersema, A. K., Tappel A. L. **Electron Paramagnetic Resonance of Some Sulfur and Selenium Compounds** *J. Chem. Phys.* **41** (1964) 1996-2003.
273. Marinho, M. V., Visentin, L. D. C., de Souza, M. C., Diniz, R.; Krambrock, K., Yoshida, M. I., Machado, F. C. **Syntheses, crystal structures and electron paramagnetic resonance studies of Co-II- and Mn-II-coordination polymers with the twisted ligand di(4-pyridyl)disulfide in double bridge fashion** *Polyhedron* **29** No. 13 (2010) 2657-2666.
274. Ellgaard, L., Bettendorff, P., Braun, D., Herrmann, T., Fiorito, F., Jelesarov, M., Guntert, P., Helenius, A., Wuthrich, K. **NMR structures of 36 and 73-residue fragments of the calreticulin P-domain** *Journal of Molecular Biology* **322** No. 4 (2002) 773-784.
275. Ma, W., Ying, Y. L., Qin, L. X., Gu, Z., Zhou, H., Li, D. W., Sutherland, T. C., Chen, H. Y., Long, Y. T. **Investigating electron-transfer processes using a biomimetic hybrid bilayer membrane system** *Nature Protocols* **8** No. 3 (2013), 439-450.
276. Patel, B. A. **Electroanalytical approaches to study signaling mechanisms in the gastrointestinal tract** *Neurogastroenterology and Motility* **23** No. 7 (2011) 595-605.
277. Gooding, J. J., Hale, P. S., Maddox L. M., Shapter, J. G. **Surface pKa of Self-Assembled Monolayers** *Journal of Chemical Education* **82** No. 5 (2005) 779.
278. Kulys, J., Drungiliene, A. **Chemically modified electrodes for the determination of sulphhydryl compounds** *Analytica Chimica Acta* **243** (1991) 287-292.