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

Leonardo Teixeira Silveira

Estudo eletroquímico da interação do citocromo c com líquidos iônicos em diferentes substratos para aplicação em biossensores

Versão Corrigida da Tese

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
05/09/2012

LEONARDO TEIXEIRA SILVEIRA

Estudo eletroquímico da interação do citocromo c com líquidos iônicos em diferentes substratos para aplicação em biossensores

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

Orientador(a): Profa. Dra. Susana Inês Córdoba de Torresi

São Paulo
2012

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

Silveira, Leonardo Teixeira
S587e Estudo eletroquímico da interação do citocromo c com líquidos iônicos em diferentes substratos para aplicação em biossensores / Leonardo Teixeira Silveira. -- São Paulo, 2012.
121p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Torresi, Susana Inês Córdoba de

1. Eletroquímica 2. Biossensores : Instrumentação : Manufatura 3. Citocromo : Citologia I. T. II. Torresi, Susana Inês Córdoba de, orientador

541.37 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

"Estudo eletroquímico da interação do citocromo c com líquidos iônicos em diferentes substratos para aplicação em biossensores"

LEONARDO TEIXEIRA DA SILVEIRA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Programa: Química.

Profa. Dra. Susana Inês Cordoba de Torresi
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. Mauro Bertotti
IQ - USP

Profa. Dra. Silvia Helena Pires Serrano
IQ - USP

Prof. Dr. Luiz Henrique Dall'Antonia
UEL

Profa. Dra. Elaine Pavini Cintra
IFECTSP

SÃO PAULO
12 de setembro de 2012

Dedico este trabalho aos meus pais Godofredo e Ana Maria, aos meus irmãos Leandro, Lilian e Leonel e meu sobrinho Gabriel, por toda a base de carinho e compreensão dados a mim sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Professora Susana, pela oportunidade e pela orientação durante o meu doutoramento.

Aos amigos do Laboratório de Materiais Eletroativos (LME) do Instituto de Química da USP agradeço a Tatiana, Vitor, Kelly, Nedher, Jota, Fernando, Braga, Jadielson, Elaine, Simone, Aline, Cintia, Suelen, Vinicius, Tânia, Ariel e Lucas por todo apoio, compreensão, pelas ajudas ao manusear alguns equipamentos, por todos os momentos de descontração durante os almoços no bandeijão, em viagens aos congressos, aos LME vai ao???, tornando o ambiente de trabalho o mais agradável possível. E aos ex-integrantes do LME que passaram pelo laboratório como a Mariana, Márcio Vidotti, Gisela, Marcelo, Ana Paula, Fernanda, Pablo, Wendel, Eduardo e Rosangela.

Ao Prof. Dr. Roberto M. Torresi, pela convivência. Ao professor Dr. José Maurício Rosolen e Dra Elaine Matsubara pelo fornecimento dos feltros de nanotubos de carbono. A professora Dra. Marcia Temperini e seu aluno de doutorado Diego pelo uso e aquisição dos espectros no equipamento Raman Renishaw. Ao Márcio, funcionário da Central Analítica, pelo auxílio ao utilizar o equipamento de Dicroísmo Circular, aos funcionários da secretaria de pós-graduação, da biblioteca da Química e aos técnicos dos laboratórios do Instituto de Química da USP, por todo auxílio dado frente as minhas necessidades.

A CAPES pela bolsa de Doutorado concedida.

E a toda minha família e meus queridos amigos.

RESUMO

Silveira, L.T., **Estudo eletroquímico da interação do citocromo c com líquidos iônicos em diferentes substratos para aplicação em biossensores**, 2012. 121p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O método de imobilização de uma biomolécula é um dos principais fatores que melhoram o desempenho eletroquímico de um biossensor e o emprego de materiais como solução de quitosana, nanotubos de carbono e líquidos iônicos na preparação de eletrodos modificados tem sido cada vez maior devido as suas propriedades que facilitam a reação de transferência de elétrons entre a biomolécula e a superfície do eletrodo. Baseado neste conceito, o presente trabalho apresenta o estudo do comportamento eletroquímico da heme-proteína citocromo c quando imobilizado nos eletrodos de carbono vítreo e num novo substrato tridimensional de feltros de microfibras de carbono recobertos por nanotubos de carbono do tipo "cup stacked" (FCSNTc). Para imobilizar o citocromo c, compósitos contendo quitosana e o líquido iônico tetrafluoroborato de 1-butil-2,3-dimetilimidazólio ($BMMIBF_4$) foram formulados, indicando que a otimização das quantidades destes componentes podem influenciar na atividade redox do biomaterial. A partir da caracterização eletroquímica do citocromo c em carbono vítreo foi observado que a presença do líquido iônico $BMMIBF_4$ no compósito manteve a sua eletroatividade devido a reação de oxidação e redução do átomo de ferro do grupo heme, e ao utilizar os feltros FCSNTc o citocromo c apresentou o desempenho eletroquímico superior aos obsevados em carbono vítreo, e a incorporação do líquido iônico no compósito de imobilização, resultou em sensores com sensibilidade superiores durante os experimentos de detecção eletrocatalítica de peróxido de hidrogênio, quando comparados com outros FCSNTc modificados sem presença do material totalmente iônico. Os experimentos espectroscópicos na região da luz visível, foram fundamentais para mostrar que o novo microambiente causado pelos compósitos não modificam a integridade do citocromo c, e que a permanência da bioeletroatividade obtida durante os experimentos eletroquímicos sugerem a aplicação dos eletrodos de FCSNTc para o desenvolvimentos de novos biossensores com o citocromo c.

Palavra Chave: citocromo c, líquidos iônicos, biossensores, feltros de nanotubos de carbono, eletroquímica.

ABSTRACT

Silveira, L.T., **Electrochemical studies of cytochrome c with ionic liquids onto different substrates for biosensors application,** 2012. 121p. Doctorate Thesis. Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The immobilization method of biomolecules have been considered the major reason in order to improve a biosensor electrochemical performance and chitosan solution, carbon nanotubes and room temperature ionic liquids have been extensively used as a material for electrode preparation due to their properties of facilitating the direct electron transfer reaction between protein and electrode surface. In this context, the present work shows the electrochemical behavior of the heme-protein cytochrome c when it is immobilized onto a glassy carbon and in a new tridimensional substrate of carbon microfibers recovered by cup staked type carbon nanotubes (FCSNTc) electrodes. The cytochrome c immobilization was carried by the formulation of different composites based on chitosan solution and the ionic liquid 1-butyl-2,3-dimethylimidazolium tetrafluoroborate ($BMMIBF_4$), and it will be shown that a volume optimization ratio between these compounds can influence in the biomaterial redox activity. During the electrochemistry characterization of cytochrome c onto glassy carbon electrode, it was observed that composites with $BMMIBF_4$ kept its electroactivity due the iron heme group redox process. When FCSNTc felt were used the electrochemical performance was enhanced, giving better biosensors due the increase on sensitivity during the electrocatalytic activity towards hydrogen peroxide reduction when it was compared with another modified FCSNTc without ionic liquid. In addition, the spectroscopic data in the visible region were essential to show that the new microenvironment promoted by the composite did not change the cytochrome c conformational structure. Finally, the bioelectroactivity obtained during electrochemical studies suggest the use of FCSNTc modified electrode as a new platforms to develop new cytochrome c biosensors.

Keywords: cytochrome c, ionic liquids, felt carbon nanotubes, biosensors, electrochemistry

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

5A1N – 5-amino-1-naftol

BMMIBr – brometo de 1-butil-2,3-dimetilimidazólio

$BMMIBF_4$ – tetrafluorborato de 1-butil-2,3-dimetilimidazólio

Citc – Citocromo c

CV – Carbono vítreo

Epa – potencial de pico anódico

Epc – potencial de pico catódico

ΔEp – diferença de potencial de pico

$E^{o'}$ – potencial formal

FCSNTc – feltro de microfibra de carbono recoberto com nanotubos de carbono do tipo “cup stacked”

HDF – ácido difenil hidrogeno fosfórico

ipa – pico de corrente anódica

ipc – pico de corrente catódica

MEV – microscopia eletrônica de varredura

PBS – solução de tampão fosfato

Poli(5A1N) – poli(5-amino-1-naftol)

Quit – Quitosana

V – volts

v – velocidade de varredura

η – rendimento

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Representação do modelo do nanotubo de carbono "cup stacked", tamanho e imagens de MEV do feltro..... 13
Figura 1.2 Representação da estrutura do citocromo c de coração de cavalo 15
Figura 1.3 Esquema do grupo heme com o átomo de ferro central 16
Figura 1.4 Esquema do quinto e sexto ligante do átomo de ferro hemínico ligado com o nitrogênio da Histidina 18 (Hys^{18}) e o com o enxofre da Metiodina 80 (Met^{80})..... 17
Figura 1.5. Imagem e tamanho do FCSNTc e imagens de MEV (a) de um feltro, (b) de uma microfibra recoberta com os CSNTc (c) dos CSNTc [78]..... 23
Figura 3.1. Esquema de preparação do líquido iônico BMMIBF4 30
Figura 3.2 Voltamogramas cíclicos dos eletrodo de carbono vítreo modificado com os compósitos de diferentes porcentagens de quitosana. Veloc. Varredura de 25 mV s^{-1} .31
Figura 3.3. Ilustração do método de preparação do eletrodo CV/Cit/Quit/$BMMIBF_4$..... 33
Figura 4.1. Voltamogramas cíclicos dos eletrodos CV/Quit/Cit e CV/Quit em $BMMIBF_4$ Velocidade de varredura 25 mV s^{-1} 38
Figura 4.2 (a) pefil j/E do eletrodo CV/Cit/Quit em BMMIBF4 a diferentes velocidades de varredura e (b) gráfico de i_{pa} e i_{pc} em função da velocidade de varredura 39
Figura 4.3 (a) pefil j/E do eletrodo CV/Citc/Quit/$MMIBF_4$ e (b) comparação do sinal de corrente com os eletrodos CV/Quit/$BMMIBF_4$ e CV em solução tampãp PBS 41
Figura 4.4 Resposta da corrente em função do potencial do eletrodo CV/Citc/Quit/$BMMIBF_4$ em solução tampão PBS pH 7,0 contendo diferentes concentrações de H_2O_2 (velocidade de varredura = 25 mV s^{-1}) 43
Figura 4.5 Voltametria cíclica realiza com o CV em solução tampão de PBS pH 7,0 com diferentes concentrações de H_2O_2 (veloc. varredura = 25 mV s^{-1})..... 44
Figura 4.6 Esquema ilustrado de preparação do eletrodo CV/Quit/$BMMIBF_4$ com o compósito de quitosana e líquido iônico 45
Figura 4.7 Voltametria cíclica do eletrodo CV/Quit/$BMMIBF_4$ em solução de citocromo c em PBS pH 7,0 na concentração de 10 mg mL^{-1}. 46
Figura 4.8 Perfil j/E do eletrodo modificado CV/Quit/$BMMIBF_4$/Citc em solução de PBS pH 7,0. Velocidade de varredura de 25 mV s^{-1}. 47
Figura 4.9 Voltamogramas cíclicos do eletrodo /Quit/$BMMIBF_4$/Citc a 25 mV s^{-1} em solução tampão de PBS com diferentes concentrações de H_2O_2. 48
Figura 4.10 Curvas analíticas construídas através da variação da corrente catódica durante as adições de alíquotas de H_2O_2 por voltametrias cíclicas dos eletrodos CV/Quit/$BMMIBF_4$/Citc e CV. 49
Figura 4.11 Perfis i/E dos eletrodos (a) FCSNTc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$, (b) FCSNTc/Citc/Quit em solução tampão fosfato PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7,0. (c) comparação entre os perfis dos eletrodos com o FCSNTc. Veloc. de varredura de 25 mV s^{-1}.. 52
Figura 4.12 Voltamograma cíclico do eletrodo Fc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$ em solução tampão PBS pH 7.0 (v=25mV.s^{-1})..... 56
Figura 4.13. Voltamogramas cíclicos do eletrodo FNTc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$ em diferentes concentrações de H_2O_2: (a) 0,00, (b)0,20, (c) 0,40, (d) 1,00 e (e) 1,40 mmol L^{-1}. Velocidade de varredura 25 mV s^{-1} 59
Figura 4.14. Voltamogramas cíclicos do eletrodo (a) Fc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$ e (b) FCSNTc em diferentes concentrações de H_2O_2: (a) 0,00, (b)0,20, (c) 0,40, (d) 0,60, (e) 0,80 e (f) 1,00 mmol L^{-1} em solução tampão PBS pH 7,0. 61

Figura 4.15. (a) testes amperométricos na detecção de H_2O_2 dos eletrodos modificados polarizados a -0,30 V e (b) curvas analíticas com a sensibilidade do biossensor perante a detecção do incrementos de 0,20 mmol L^{-1} na concentração do analito em solução tampão fosfato. 62
Figura 4.16. Ilustração esquemática de redução do H_2O_2 por parte do citocromo c imobilizado no eletrodo a -0,30 V vs $Ag/AgCl_{Cl^-sat}$ 63
Figura 4.17 Perfis i/E dos eletrodos FCSNTc/Citc/$BMMIBF_4$, FCSNTc/Citc e FCSNTc em solução tampão fosfato PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7,0. Veloc.varredura de 25 mV s^{-1}..... 66
Figura 4.18 Perfis (a) i/E e (b) i/v dos eletrodos FCSNTc/Citc/$BMMIBF_4$ e FCSNTc/Citc em diferentes velocidades de varredura..... 69
Figura 4.19 Perfil Ep-$E^{o'}$/ log v dos eletrodos FCSNTc/Citc/$BMMIBF_4$ e FCSNTc/Citc... 71
Figura 4.20 Voltamogramas cíclicos dos eletrodos FCSNTc, FCSNTc/Citc e Fc em solução contendo $K_3Fe(CN)_6$ 0,01 mol L^{-1} + $K_4Fe(CN)_6$ mol L^{-1} + KCl 0,10 mol L^{-1}..... 74
Figura 4.21 Cronoamperogramas da detecção de H_2O_2 dos eletrodos FCSNTc/Citc e FCSNTc/Citc/$BMMIBF_4$ polarizados a -0,30 V perante aos incrementos de 0,20 mmol L^{-1} na concentração do analito em solução tampão fosfato PBS pH 7,0. 75
Figura 4.22 curvas analíticas das sensibilidades obtidas durante a detecção de H_2O_2 nos diferente eletrodos perante as adições de incrementos de 0,20 mmol L^{-1} na concentração do analito em solução tampão fosfato PBS pH 7,0. 76
Figura 4.23 Variação do potencial de pico Ep em função do valor do pH da solução tampão fosfato PBS. 81
Figura 4.24. Espectro UV-Vis da solução de PBS pH 7, $BMMIBF_4$ puro, solução de citocromo c e da solução de citocromo c com o líquido iônico. 84
Figura 4.25 (a) Espectro UV-Vis da solução de citocromo c com diferentes quantidades de líquido iônico e (b) esquema de ruptura da ligação axial do átomo de Fe do grupo heme com o átomo de S da Met^{80} 86
Figura 4.26 Espectros de dicroísmo circular de diferentes soluções com o citocromo..... 88
Figura 4.27(a) Espectros de dicroísmo circular de soluções de citocromo c em PBS com diferentes concentrações de $BMMIBF_4$ 89
Figura 4.27(b) Espectro DC (cima e UV-Vis (baixo) característico do citocromo c Fe^{+3} em PBS.[101]..... 89
Figura 4.28 Espectros Raman dos eletrodos FCSNTc modificados. Excitação do laser 488 nm 92
Figura 4.29. Imagens de MEV dos eletrodos modificados com diferentes compósitos, e magnitudes de 3000 e 10000 vezes de aumento..... 94
Figura 6.1. Estrutura do monômero bifuncional 5A1N e do poli(5A1N) 100
Figura 6.2. Eletropolimerização do poli(5A1N) em $BMMIBF_4$ e HDF 50 mmol L^{-1}. Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} 100
Figura 6.3 Eletropolimerização do poli(5A1N) em $BMMIBF_4$ sem ácido..... 102
Figura 6.4 Perfil de crescimento dos filmes de poli(5A1N) nas diferentes soluções de BMMIBF4 em função da carga do material depositado em CV durante 50 ciclos..... 103
Figura 6.5 Perfil j/E dos filmes de poli(5A1N) (a) eletropolimerizado com $BMMIBF_4$/HDF e ciclado em $BMMIBF_4$/HDF e (b) eletropolimerizado em $BMMIBF_4$ e ciclado em $BMMIBF_4$ puro em diferentes velocidades de varredura..... 104
Figura 6.6 Perfil j/E dos diferentes filmes de poli(5A1N) utilizando o $BMMIBF_4$. 105
Figura 6.5. Imagem de MEV do filme de poli(5A1N) em $BMMIBF_4$ puro..... 106

SUMÁRIO

1. Introdução 12

1.1. O Citocromo c 14

1.1.1. Aplicação de compósitos na fabricação de biossensores..... 18

1.2. A importância do substrato na eletroquímica de biossensores..... 21

2. Objetivos 24

3. Parte Experimental 25

3.1. Eletrodos utilizados 25

3.1.1. Eletrodos de feltro de microfibra de carbono recobertos com nanotubos de carbono do tipo “cup stacked” 26

3.2. Reagentes 27

3.3. Preparação do líquido iônico tetrafluoroborato de 1-butil-2,3-dimetilimidazolio ($BMMIBF_4$) 29

3.4. Preparação do compósito de citocromo c, quitosana e líquido iônico 30

3.5. Preparação dos eletrodos modificados de carbono vítreo 32

3.5.1. Com solução de quitosana e citocromo c 32

3.5.2. Com compósito de quitosana, citocromo c e líquido iônico 32

3.6. Preparação dos eletrodos modificados com os FCSNTc 33

3.7. Instrumentação 34

3.7.1. Medidas Eletroquímicas 34

3.7.2. Medidas Espectroscópicas 34

3.7.3. Caracterização Morfológica 36

4. Resultados Obtidos 37

4.1. Eletroatividade do citocromo c em líquido iônico 37

4.2 Carbono vítreo modificado com compósito de quitosana, citocromo c e líquido iônico $BMMIBF_4$ 40

4.2.1. Atividade eletrocatalítica do CV/Citc/Quit/BMMIBF4 com peróxido de hidrogênio 42

4.2.2. Novo método de imobilização do citocromo c em carbono vítreo.. 45

4.3. FCSNTc como substrato para imobilização de citocromo c 50

4.3.1. Atividade eletrocatalítica do citocromo c no FCSNTc 57

4.4. Atividade eletroquímica e eletrocatalítica do citocromo c em compósitos sem quitosana 65

4.5. O efeito do pH na eletroatividade do citocromo c 81

4.6. Caracterização espectroscópica dos diferentes compósitos de citocromo c 82

4.7. Espectroscopia Raman Ressonante e caracterização morfológica dos eletrodos modificados por MEV 90

5. Conclusões 97

6. Perspectivas Futuras 99

7. Referências Bibliográficas 107

8. Súmula Curricular 115

1. Introdução

O interesse no desenvolvimento de sensores na área de pesquisa científica encontra se em grande expansão, devido à capacidade de detecção destes dispositivos frente a diferentes analitos em tempo real, permitindo sua aplicação na identificação de substâncias tanto na área da saúde como também na ambiental.

Em busca de maior sensibilidade, foram desenvolvidos novos sensores, que apresentavam um material biológico capaz de detectar substâncias específicas, formando assim os primeiros biossensores. Por definição, os biossensores são dispositivos que utilizam um composto biológico, como uma proteína, que pode ser uma enzima, em contato direto com um transdutor capaz de converter reações biológicas especificas em um sinal eletrônico mensurável. [1]

Desde a criação dos biossensores, o passo considerado mais importante foi realizado por Clark e Lyons em 1962 [2], que relataram o primeiro biossensor enzimático, utilizando de membranas contendo enzimas para transformar a glicose em um produto (oxigênio) que pode ser detectado através de um eletrodo, resultando numa detecção rápida, simples e precisa de glicose. Clark descreveu pela primeira vez como fazer um sensor eletroquímico após a interação de uma enzima com um transdutor. Neste caso, a glicose oxidase foi incorporada ao biossensor e através de medidas de diminuição da concentração de oxigênio, foi possível determinar a concetração de glicose na amostra. Baseado neste trabalho o primeiro biossensor foi comercializado em 1975 pela Yellow Springs Instrument Company, que se baseava em um dispositivo analisador de glicose através da

detecção amperométrica de peróxido de hidrogênio. Com o passar dos anos, o modelo original do analisador de glicose foi substituído por dispositivos mais avançados, no entanto, a construção básica do biossensor, ou seja, o mecanismo de detecção do peróxido de hidrogênio, pouco mudou.

Os biossensores podem ser classificados em três tipos diferentes de gerações, que estão relacionados com a evolução do seu desempenho e do modo como a enzima/proteína interage com o analito para realizar a transferência de elétrons. [3-5] A figura 1.1 traz um esquema de representação destas diferentes gerações.

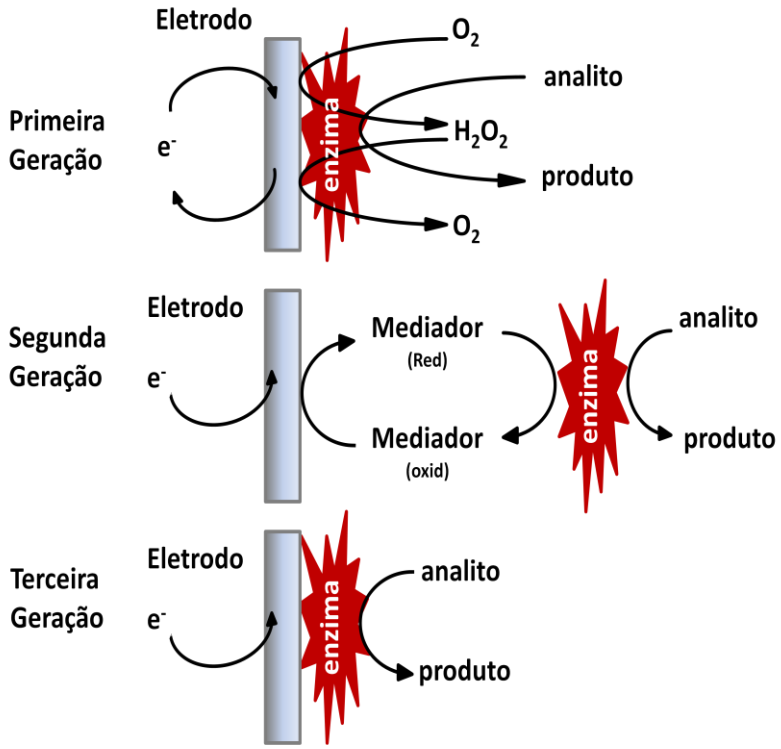


Figura 1.1 *Representação das gerações de biossensores de acordo com o mecanismo de detecção com o analito baseado na referencia* [3]

Os primeiros modelos são os biossensores de primeira geração, que consistem em medir o decréscimo da concentração de oxigênio ou no aumento da

concentração de peróxido de hidrogênio através da reação da biomolécula com o analito.

Os biossensores de segunda geração representam um avanço em relação ao desempenho analítico, pois são caracterizados pela incorporação de um mediador capaz de reduzir o valor do potencial necessário para detectar o analito, evitando, assim, a ação de substâncias interferentes.

Os biossensores de terceira geração dispensam qualquer tipo de mediador ou de fontes imobilizadoras. Neste caso, a imobilização da enzima/proteína ocorre na superfície do eletrodo, sendo esta a responsável pela regeneração do biocomponente para novamente interagir com o analito em questão.

Desde então, pesquisadores de diferentes áreas, como a química, biologia molecular, ciências dos materiais entre outras, partiram para estudos com outras enzimas/proteínas capazes de serem empregadas em dispositivos para a detecção de novos materiais, visando principalmente, melhorar o desempenho eletroquimico e consequentemente a sensibilidade e seletividade.

Entre estes novos biomateriais pode-se citar o uso da urease na detecção de uréia [6] ou de heme-proteínas como mioglobina, hemoglobina e o citocromo c na detecção de peróxido de hidrogênio [7-9],os quais são de interesse particular devido as vantagens práticas, tais como a simplicidade de operação, baixo custo de fabricação e da capacidade de detecção em tempo real.

1.1. O citocromo c

Os citocromos são um grupo de proteínas que são classificadas em diferentes tipos em função da sequencia da cadeia dos polipeptídios que as compõem garantindo propriedades distintas. De maneira geral os citocromos *a, b* e *c*

apresentam atividade eletroativa pois são os tipos de citocromo que apresentam um grupo ferro porfirinas, comumente chamado de grupo heme. [10-12]

O citocromo de coração de cavalo,é uma heme-proteína do tipo c envolvida na transferência de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial. Sua macromolécula possui uma boa caracterização em termos de sua estrutura em estado cristalino, apresentando um formato globular, quase esférico, com diâmetro de 34Å. [10-15] No caso das proteínas citocromo c, os centros ativos não estão totalmente encobertos pela sequencia dos aminoácidos, tornando-as excelentes materiais para o estudo eletroquímico dos processos redox. A figura 1.2 apresenta um esquema da estrutura do citocromo c de coração de cavalo, cuja imagem foi retirada da referência. [16]

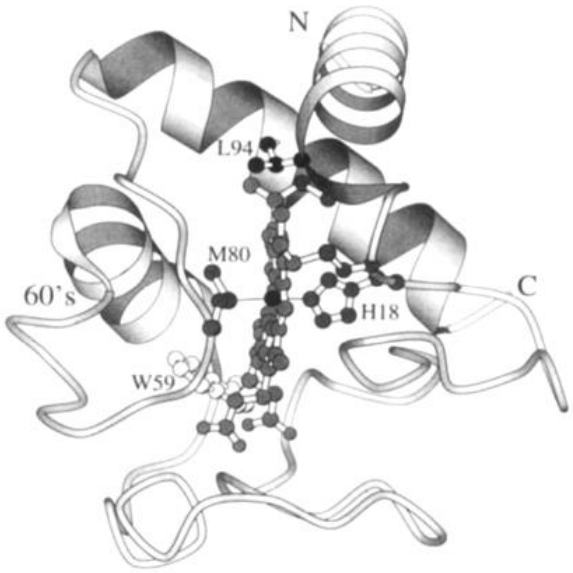


Figura 1.2 Representação da estrutura do citocromo c de coração de cavalo retirado da referência [16] com permissão de Macmillan Publishers Ltda.

Apesar de ser considerada uma biomolécula simples, o citocromo c de coração de cavalo apresenta em sua cadeia primária uma sequência de 104 aminoácidos que se enovelam num arranjo tridimensional envolvendo o sítio ativo do

grupo heme. O quadro 1 apresenta a sequência dos aminoácidos da estrutura primária do citocromo c, obtido pela primeira vez por Margoliash e Smith em 1961. [17]

Quadro 1. Sequência dos aminoácidos do citocromo c de coração de cavalo. [17]

Gly^{1} – Asp^{2} – Val^{3} – Glu^{4} – Lys^{5} – Lys^{7} Lys^{8} – Ile^{9} – Phe^{10} – Val^{11} – Glu^{12} – Lys^{13} – Cys^{14} – Ala^{15} – Glu^{16} – Cys^{17} – **His^{18}** – Thr^{19} – Val^{20} – Glu^{21} Lys^{22}– Gly^{23} – Gly^{24} – Lys^{25} – His^{26} – Lys^{27} – Thr^{28} – Gly^{29} – Pro^{30} – Asp^{31} – Leu^{32} – His^{33} – Gly^{34} – Leu^{35} – Phe^{36} – Gly^{37} – Arg^{38} – Lys^{39} – Thr^{40} – Gly^{41} – Glu^{42} – Ala^{43} – Pro^{44} – Gly^{45} – Phe^{46} – Thr^{47} – Tyr^{48} – Thr^{49} – Asp^{50} – Ala^{51} – Asp^{52} – Lys^{53} – Asp^{54} – Lys^{55} – Gly^{56} – Ile^{57} – Thr^{58} – Try^{59} – Lys^{60} – Glu^{61} – Glu^{62} – Thr^{63} – Leu^{64} – Met^{65} – Glu^{66} – Tyr^{67} – Leu^{68} – Glu^{69} – Asp^{70} – Pro^{71} – Lys^{72} – Lys^{73} – Tyr^{74} – Ile^{75} – Pro^{76} – Gly^{77} – Thr^{78} – Lys^{79} – **Met^{80}** – Ile^{81} – Phe^{82} – Ala^{83} – Gly^{84} – Ile^{85} – Lys^{86} – Lys^{87} – Lys^{88} – Thr^{89} – Glu^{90} – Arg^{91} – Glu^{92} – Asp^{93} – Leu^{94} – Ile^{95} – Ala^{96} – Tyr^{97} – Leu^{98} – Lys^{99} – Lys^{100} – Ala^{101} – Thr^{102} – Asp^{103} – Glu^{104}

O grupo heme do citocromo c possui um átomo de ferro central ligado ao grupo porfirínico com quatro ligações com átomos de nitrogênio de anéis pirrólicos. Este átomo de ferro desempenha a função redox do citocromo c variando seu estado em Fe^{+2} e Fe^{+3}, sendo sua estrutura demonstrada na figura 1.3.

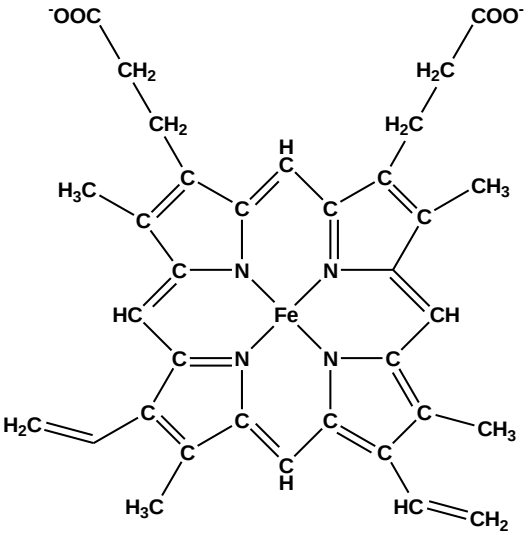


Figura 1.3 Esquema do grupo heme com o átomo de ferro central

No citocromo c, o grupo heme se conecta a proteína covalentemente através de pontes tioéter com 2 resíduos de cisteinas na posição **14** e **17** (Hys^{14} e Hys^{17}) dos peptídeos, e o átomo de ferro esta hexa coordenado sendo o quinto e o sexto ligante resultante da ligação covalente axial, fora do plano do grupo heme) com um átomo de enxofre de uma metiodina e um átomo de nitrogênio de uma histidina, ambos nas posições **80** e **18** respectivamente (Met^{80} e Hys^{18}), sendo sua representação apresentada na figura 1.4. .Estas ligações são importantes no estudo eletroquímico do citocromo c, pois a ruptura destas ligações pode ocasionar uma mudança na conformação estrutural da biomolécula proporcionando a desnaturação da mesma, ou seja, a perda a sua função. [18]

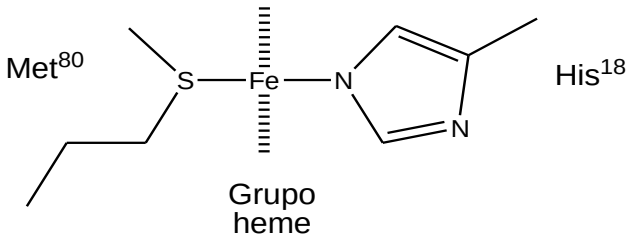


Figura 1.4 Esquema do quinto e sexto ligante do átomo de ferro hemínico ligado com o nitrogênio da Histidina 18 (*Hys^{18}*) e o com o enxofre da Metiodina 80 (*Met^{80}*)

Apesar do citocromo c apresentar função redox a transferência direta de elétrons não é tão simples, pois este processo está diretamente relacionado ao modo como a proteína é imobilizada na superfície de um substrato. [19-21] A interação da biomolécula durante a imobilização com o substrato deve ser favorável, pois caso contrário também poderá ocorrer a sua desnaturação. [18] Desta forma a utilização de compósitos que utilizam polímeros condutores [22-30], materiais nanoestruturados [31-34] e líquidos iônicos tem sido empregado, pois a combinação destes materiais promove um microambiente conveniente a biomolécula. [35-37]

Para os substratos, eletrodos convencionais bidimensionais, como ouro e platina, têm sido muito utilizados com os nanotubos de carbono aderidos em sua superfície apresentando assim um melhor desempenho devido a maior área de contato que facilitam o acesso aos centros ativos das biomoléculas, melhorando consideravelmente a transferência direta de elétrons. [38-39]

1.1.1. Aplicação de compósitos na fabricação de biossensores

Um biossensor de boa qualidade deve apresentar um método de detecção rápido, com alta seletividade e sensitividade. Para obter estas propriedades, os biossensores são geralmente produzidos em eletrodos que oferecem baixa resistência durante a transferência de elétrons. A busca de substratos capazes de manter a bioatividade da enzima/proteína resulta, na maioria das vezes, no uso de eletrodos bidimensionais que necessitam de um método de imobilização externo para aderir o biomaterial em sua superfície.

A quitosana tem sido empregada como suporte de imobilização de enzimas por se tratar de um polímero natural, não toxico e biocompativel podendo ser utilizada na forma de pós, flocos ou géis (hidrogéis), sendo a preparação de hidrogéis as que possuem mais destaque em métodos de imobilização. [40-42] Devido suas propriedades hidrofílicas e de intumescência é possível fazer uma mistura de quitosana/biomolécula para ser espalhada sobre a superfície de um eletrodo formando um filme estável capaz de manter a biomolécula aderida. [43-45]

Para formar compósitos mais eficientes, a incorporação de nanopartículas metálicas e/ou nanotubos de carbono tem resultado em biossensores com desempenho eletroquímico superiores devido ao aumento da área superficial ativa proporcionada pelas dimensões nanométricas destes materiais na superfície do

eletrodo. [31-32,46-49] Além destes materiais, a utilização de líquidos iônicos como parte integrante de compósitos na imobilização de enzimas tem trazido resultados interessantes, devido a permanência da bioatividade do biomaterial na presença deste material totalmente iônico. [50-56] Essa incorporação dos líquidos iônicos com materiais biológicos surgiu do interesse de fazer o estudo de biomoléculas em meios reacionais não convencionais. [57-58] Destes estudos, diversos grupos de pesquisas perceberam que certos líquidos iônicos não inativavam enzimas, como os solventes orgânicos, tornado-os promissores para reações de catálise enzimática.

Líquidos Iônicos (LIs) são sais formados por um cátion orgânico e um ânion (orgânico ou inorgânico) que possuem pontos de fusão abaixo de 100ºC. Os LIs são solventes alternativos bastante promissores devido à sua baixa pressão de vapor, boa condutividade elétrica, alta estabilidade térmica, fácil preparação e adequação ambiental. [61] Além das características acima, sua ampla janela eletroquímica torna esses líquidos excelentes candidatos para aplicações em dispositivos eletroquímicos, tais como células a combustível, baterias de íon lítio, e sua alta estabilidade química acabou tornando estes materiais totalmente iônicos oportuno para o emprego no estudo de enzimas. [60,62] Além disso, dependendo dos cátions e ânions que compõem o material suas propriedades físicas e químicas podem ser moduladas. Por exemplo, um líquido iônico com o mesmo cátion, mas com ânions diferentes, pode mudar o seu caráter de hidrofílico para hidrofóbico e variar a sua viscosidade. [63]

Uma importante aplicação dos líquidos iônicos esta relacionada com a sua incorporação em matrizes convencionais, como hidrogéis, nanotubos de carbono, polímeros condutores, nanopartículas metálicas etc., para formar compósitos mais eficientes, pois aproveitam as propriedades individuais dos

materiais que o compõem. Estes novos materiais adquirem propriedades interessantes, como por exemplo, somar as propriedades condutoras eletrônicas de nanotubos de carbono com as propriedades iônicas do fluido totalmente iônico (líquidos iônicos) melhorando a facilidade em transportar elétrons.

Além da formação de novos compósitos, o uso de líquidos iônicos no estudo de biocomponentes também tem sido explorado, pois dependendo de suas propriedades físicas e químicas eles acabam proporcionando um microambiente amigável para proteínas e enzimas que mantêm sua bioatividade. [64-76] Entretanto, o estudo fundamental do efeito desses solventes sobre a atividade, estabilidade e seletividade (régio e estéreo) de biomoléculas é recente. Vários fatores, tais como polaridade, capacidade de formação de ligações de hidrogênio, nucleofilicidade e viscosidade são alguns dos aspectos sugeridos para explicar o comportamento diferenciado da enzima em um meio totalmente iônico, onde os fatores, hidrofobicidade e viscosidade parecem ser os mais relevantes na atividade biológica da enzima. [64-67]

1.2. A importância do substrato na eletroquímica de biossensores

O estudo da transferência direta de elétrons em proteínas redox, se tornou foco de grande interesse, devido a sua significância na aplicação prática e teórica na eletroquímica, pois acabam nos fornecendo informações importantes quanto sua estrutura química e sobre a cinética dos processos redox biológicos. No entanto o processo de transferência de elétrons entre uma heme-proteína e um eletrodo convencional não é tão simples, pois na maioria das vezes os centros redox enzimáticos estão localizados no interior da estrutura da enzima ou proteína e,

apresentam baixa condutividade eletrônica devido aos grupos aminoácidos que cercam os centros ativos.

De acordo com a evolução dos biossensores, o emprego de novos materiais capazes de auxiliar a transferência de elétrons da biomolécula resultou em dispositivos mais sensíveis, sendo os nanotubos de carbono os responsáveis por um grande avanço tanto no desenvolvimento de novos sensores como no aumento na quantidade de material na superfície de um eletrodo. [31-32]

Desde a descoberta dos nanotubos de carbono (NTc), o interesse em utilizá-los em novos sensores químicos e/ou bioquímicos como dispositivos de escala nanométrica cresceu notavelmente, devido as suas excelentes propriedades mecânicas e eletrônicas. No caso de proteínas e enzimas, os uso dos nanotubos de carbono oferecem uma grande vantagem, pois as biomoléculas podem ser hospedadas em sua superfície sem perder sua atividade biológica. Além disso, os NTc apresentam interessante resistência mecânica e são passíveis de modificação na sua estrutura original resultando em materiais com maior condutividade elétrica. Quanto a sua capacidade de funcionalização, suas paredes laterais são relativamente inertes, porém as extremidades são mais reativas devido as chamadas “regiões de borda” que funcionam como “ancoradores” de diversos tipos de materiais.

Os nanotubos de carbono são divididos em dois grupos principais sendo os NTc de parede simples (SWCNT – “Single Wall Carbon Nanotubes”), que consiste apenas de uma folha de grafeno enrolado, e os NTc de paredes múltiplas (MWCNT – “Multiple Walls Carbon Nanotubes”) que consistem de mais de um SWCNT enrolados. As condições de síntese dos NTc são essenciais para a obtenção dos nanomateriais acima citados, e a partir do monitoramento destas

condições, o crescimentos dos NTc podem resultar em uma forma conhecida como “cup stacked” (CSNTc) que se trata de folhas de grafeno em forma de cones de pontas abertas, empilhadas umas sobre as outras, tendo sua configuração mantida por forças de van der Waals. [77] Estes CSNTc apresentam sítios de inserção entre os cones, o que resultam em um número maior de pontos com regiões de borda, que acarretariam na facilidade de interagir ou imobilizar outros materiais.

Tendo em vista esta vantagem, o grupo de pesquisa do professor Dr. José Mauricio Rosolen do Instituto de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto, desenvolveu junto com a Dra. Elaine Y. Matsubara, uma plataforma tridimensional de um feltro de microfibra de carbono recoberto com os nanotubos de carbono do tipo “cup stacked”, (FCSNTc). [77] Para demonstrar como são obtidos esses feltros e como os nanotubos de carbono estão recobrindo as microfibras de carbono, a figura 1.5 a seguir apresenta uma fotografia de um feltro FCSNTc juntamente com imagens de microscopia eletrônica de varredura em diferentes magnitudes.

Estes novos materiais possuem elevada área de contato e boa resistência mecânica e apresentam também um caráter hidrofílico, pois durante as condições de formação dos nanotubos “cup stacked” ocorrem algumas imperfeições nas folhas de grafenos onde átomos de carbono são substituídos por átomos de nitrogênio providos do gás de arraste utilizado durante o processo de fabricação.

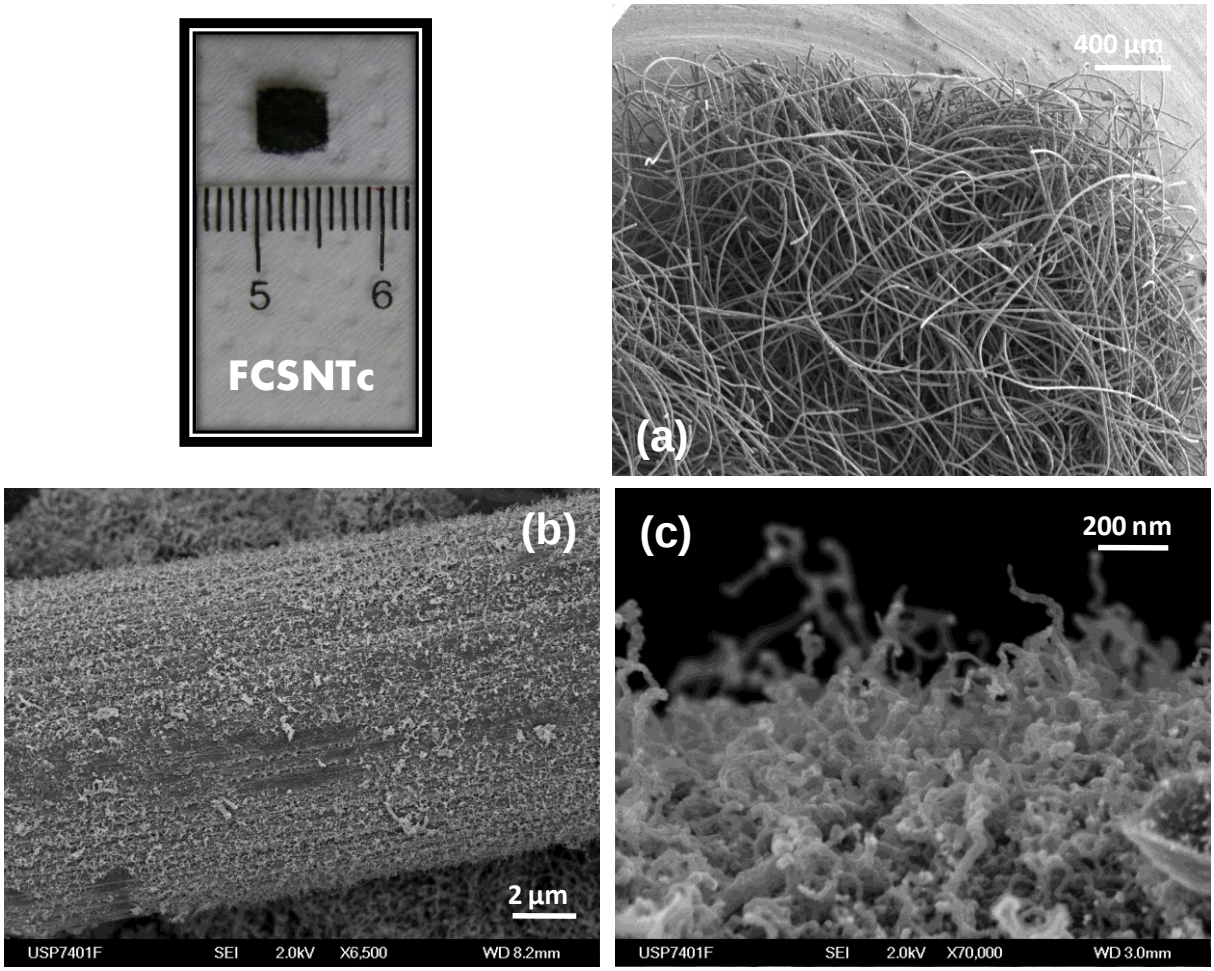


Figura 1.5. *Imagem e tamanho do FCSNTc e imagens de MEV (a) de um feltro a com diversas microfibras de carbono, (b) de uma microfibra de carbono recoberta com os CSNTc (c) dos CSNTc que recobrem a microfibra. Imagens (b) e (c) retiradas da referencia* [78] *com permissão da Elsevier*

Devido as propriedades destes novos feltros, eles se tornam um novo tipo de material promissor para a imobilização de enzimas/proteínas no estudo de biossensores. Partindo de uma colaboração entre o prof. Dr. José Mauricio Rosolen e a profa. Dra. Susana Inés Córdoba de Torresi, resultou na utilização destas plataformas tridimensionais no estudo de sensores e biossensores [78] as quais servirão de substrato para o estudo do citocromo c na construção de biossensores apresentados nesta presente tese.

2. Objetivos

Os principais objetivos desta presente tese consistem em estudar e compreender a atividade eletroquímica do citocromo c em compósitos contendo líquido iônico, e como esta eletroatividade depende do método de imobilização como também do tipo de substrato utilizado.

Além de demonstrar o desenvolvimento do novo sensor os estudos estarão focados na interação da biomolécula citocromo c com a plataforma tridimensional de microfibras de carbono recobertos por nanotubos de carbono do tipo “cup stacked” (FCSNTc) para aplicações eletrocatalíticas na detecção de peróxido de hidrogênio.

3. Parte Experimental

3.1. Eletrodos utilizados

O eletrodo de trabalho de carbono vítreo (BAS, área geométrica = 0,07 cm^2) utilizado nos experimentos eletroquímicos foi limpo, antes do uso, através do polimento da superfície de contato com uma lixa contendo alumina em diferentes granulometrias, sendo em seguida efetuadas lavagens com água deionizada e deixado em um banho de ultrassom por 5 minutos contendo acetona e depois água deionizada. Para eliminar resíduos do polimento e possíveis materiais orgânicos na superfície do eletrodo o carbono vítreo foi tratado eletroquimicamente através da polarização a 1,80 V versus $Ag/AgCl_{satCl-}$ por 10 segundos em solução de hidróxido de sódio 0,10 mol L^{-1}. [79]

Um contra-eletrodo de platina foi utilizado na forma de uma chapa durante os experimentos de caracterização eletroquímica e foi previamente limpo através da exposição do metal com a chama do bico de Bunsen.

Para os estudos eletroquímicos em líquido iônico, foi utilizado um fio de prata como pseudo-referência. E para os experimentos em meio aquoso, foi utilizado como referência o eletrodo prata/cloreto de prata saturado não comercial ($Ag/AgCl_{sat}$).

3.1.1. Eletrodos de feltro de microfibra de carbono recobertos com nanotubos de carbono do tipo “cup stacked”

Os eletrodos de feltro de microfibra de carbono recobertos com os nanotubos de carbono no tipo “cup stacked” (FCSNTc) foram adquiridos através de uma colaboração do grupo de pesquisa da professora Dra. Susana Ines. Córdoba de Torresi com o Professor Dr. José Mauricio Rosolen da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FFCLRP) que junto com a aluna de doutorad Elaine Y. Matsubara desenvolveram este novo material. [77]

Antes de utilizar estes materiais como eletrodos de trabalho, os FCSNTc foram imersos um béquer contendo ácido clorídrico concentrado por cerca de 20 minutos, para a remoção de possíveis resíduos dos catalisadores metálicos utilizados para o crescimento dos nanotubos de carbono na superfície das fibras de carbono. Em seguida os feltros foram lavados, diversas vezes, através da imersão em água deionizada para remover todo o resíduo ácido.

Após as lavagens, o feltro foi deixado secando a temperatura ambiente sobre um papel absorvente e, quando estava totalmente seco, foi pesado, anotando-se o valor da sua massa e também a área geométrica. Em média, os FCSNTc utilizados apresentavam uma área geométrica de 5 x 3 mm com 2 mm de espessura.

Para formar o contato elétrico com o potenciostato, um fio de platina, no formato de um gancho, foi espetado no centro do feltro. Para garantir que os processos eletroquímicos observados nos resultados obtidos fossem somente do feltro modificado, a superfície do fio de platina que não estava em contato com o feltro foi pintada com uma tinta esmalte.

A limpeza dos FCSNTc foi realizada momento antes de serem utilizados como eletrodo de trabalho e logo após a sua funcionalização e utilização, eles foram estocados imersos em solução tampão PBS pH 7,0 em geladeira a 4 ºC.

Este mesmo procedimento de limpeza também foi realizado em um feltro de fibras de carbono sem o recobrimento com nanotubos de carbono do tipo "cup stacked" (Fc). Ele foi imerso em HCl concentrado e em seguida foi realizados as lavagens com água deionizada, pois como será discutido na seção de resultados obtidos, ele também foi utilizado como eletrodo de trabalho no estudo da eletroatividade do citocromo c. O presente aluno não participou do desenvolvimento e preparação destes feltros, sendo eles recebidos já prontos para aplicação e caracterização experimental.

3.2. Reagentes

A solução de quitosana 0,05% m/m (Quit), foi preparada através de uma quantidade apropriada de quitosana dissolvida em uma solução de ácido acético 2,0 mol L^{-1} a 90 ºC, sendo em seguida resfriada a temperatura ambiente. [80,81] O valor do pH da solução de quitosana foi ajustado para o valor 5, utilizando uma solução 1,0 mol L^{-1} de hidróxido de sódio sendo posteriormente filtrada e estocada a 4 ºC quando não utilizada.

A solução tampão fosfato (PBS) (*phosphate buffer solution*) 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 foi preparada pela dissolução dos sais $Na_2HPO_4.7H_2O$ e $NaH_2PO_4.H_2O$ em água deionizada, sendo o pH ajustado para 7,0 com uma solução 1,0 mol L^{-1} de hidróxido de sódio e estocado a 4 ºC. Independente do experimento realizado, foi borbulhado gás nitrogênio por um período de 1 hora, na solução de PBS a ser utilizada, para diminuir as quantidades de oxigênio dissolvido na solução.

Para a solução de citocromo c, a concentração mantida para todos os experimentos foi de 10 mg mL^{-1} em tampão fosfato PBS 0,1 mol L^{-1} e mantida a 4 ^{0}C quando não utilizada.

Todas as soluções aquosas utilizadas foram preparadas com água deionizada ultra pura adquiridos do equipamento Elga System UHQ (18 MΩ cm).

Os reagentes listados na tabela 1 foram utilizados, conforme recebidos, sem purificação prévia.

Tabela 1. Tabela de reagentes utilizados.

Reagente	***Massa Molar g mol^{-1}***	***Teor %***	***Procedência***
Citocromo c (de coração de cavalo)	*~12380*	*96,1*	*Aldrich*
Acetonitrila	*41,05*	*99,5*	*Synth*
Ácido clorídrico	*36,5*	*30,0*	*Synth*
1-Bromobutano	*137,03*	*99,0*	*Aldrich*
Ácido tetrafluorbórico	*87,8*	*48,0 m/m*	*Aldrich*
Diclorometano	*84,93*	*99,5*	*Synth*
1,2-dimetilimidazol	*96,13*	*98,0*	*Aldrich*
Hidróxido de sódio	*40*	*99,0*	*Synth*
Peróxido de Hidrogênio	*34*	*30,0 m/m*	*Aldrich*
Quitosana	*340*	*-*	*Aldrich*
Fosfato de sódio dibásico heptahidratado	*268,07*	*98,0*	*Nuclear*
Fosfato de sódio monobásico	*137,99*	*98,0*	*Reagen*
Sulfato de Magnésio	*120,37*	*>97,0*	*Synth*
Tetra-hidrofurano	*72,11*	*99,9*	*Merck*

3.3. Preparação do líquido iônico tetrafluoroborato de 1-butil-2,3-dimetil-imidazólio ($BMMIBF_4$)

Conforme discutido na parte introdutória, os líquidos iônicos adquirem propriedades distintas devido à combinação de um mesmo cátion com diferentes ânions. Para os estudos realizados neste trabalho, decidiu-se utilizar o líquido iônico $BMMIBF_4$, pois além de ser um material de fácil preparação, ele apresenta características hidrofílicas, sendo capaz de solubilizar em meio aquoso.

Para o inicio da síntese, foram adicionados na proporção de 1:1 em $molL^{-1}$ o 1,2-dimetilimidazolio e 1-bromobutano em um balão de fundo redondo com conexão para um condensador de refluxo. Após adição, a mistura foi deixada em agitação durante uma hora sob aquecimento a 90 ºC. Ao resfriar obteve-se um sólido branco que foi recristalizado em acetonitrila e tetra-hidrofurano e seco a pressão reduzida a temperatura ambiente, obtendo o brometo de 1-butil-2,3-dimetilimidazolio (BMMIBr) como um cristal branco, com rendimento de 95%.

Em outro frasco, o BMMIBr obtido foi dissolvido em água deionizada e realizou-se a segunda parte da reação, misturando com o ácido tetrafluorbórico (HBF_4) na proporção 1:1 em mol L^{-1} em agitação por 3 horas, obtendo-se o líquido iônico tetrafluoroborato de 1-butil-2,3-dimetilimidazólio ($BMMIBF_4$) na fase aquosa.

Para purificar o $BMMIBF_4$ foram adicionados 100 mL de diclorometano, na solução aquosa, e em seguida foi colocado em um funil de separação, recolhendo-se a fase orgânica.

Após a separação, a fase orgânica, foi submetida a uma filtração em coluna de alumina e em seguida foi adicionado sulfato de magnésio anidro, como secante deixando em repouso por cerca de 2 horas. Em seguida efetuou-se uma filtração simples e o diclorometano foi finalmente retirado via sistema de evaporação

à pressão reduzida e o líquido iônico $BMMIBF_4$ foi obtido como um líquido incolor e colocado para secar em estufa a 100 ^{0}C á pressão reduzida por 24h.

O procedimento de preparação do $BMMIBF_4$ foi baseado no trabalho de Camilo e colaboradores [63], apresentando um rendimento de 75%. O esquema de preparação e as estruturas dos reagentes e dos produtos obtidos durante a reação esta demonstrada na Figura 3.1 .

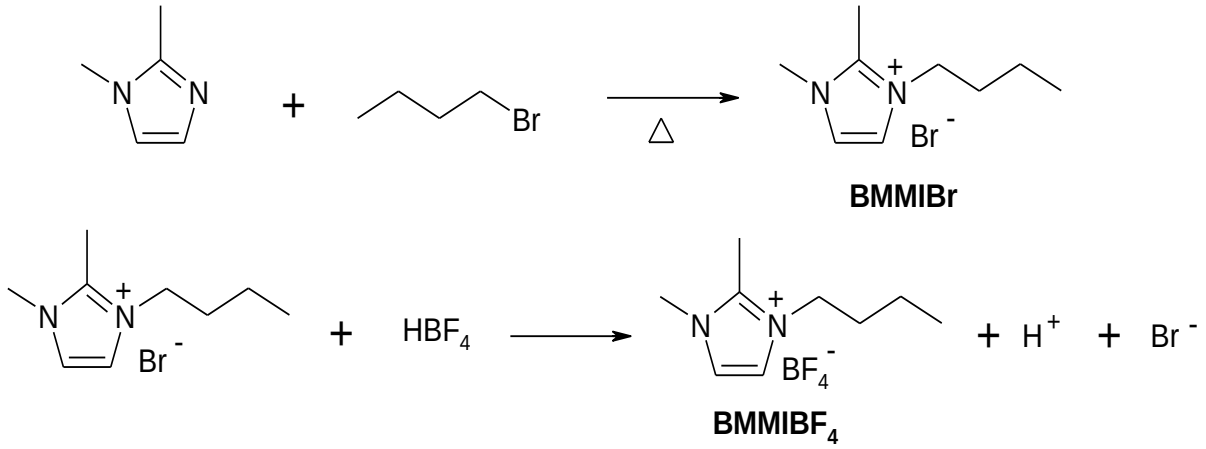


Figura 3.1. *Esquema de preparação do Líquido Iônico $BMMIBF_4$.*

3.4. Preparação do compósito de citocromo c, quitosana e líquido iônico

Pensando em utilizar a quitosana e o liquido iônico para formar um compósito como fonte imobilizadora do citocromo c na superfície do eletrodo, foi utilizado uma proporção de cada material, de maneira que fosse obtido o melhor desempenho eletroquímico do citocromo c em solução tampão de PBS. A relação das quantidades entre estes componentes foi testada experimentalmente durante os ciclos voltamétricos da caracterização eletroquímica, sendo inicialmente ajustado a concentração entre as soluções de quitosana e citocromo c, e posteriormente, incorporando diferentes quantidades de líquido iônico.

Foi utilizada a solução de quitosana, pois após depositar um volume na superfície do eletrodo, a água evapora, formando de um filme que ajuda a manter o citocromo c imobilizado. No entanto, foi observado que uma porcentagem excedente de quitosana formava um filme muito espesso (o que impedia de verificar os processos redox do citocromo c) e, em quantidades menores, o filme se desprendia da superfície do eletrodo. A figura 3.2 apresenta os resultados para os compósitos em quantidades não ideais de quitosana.

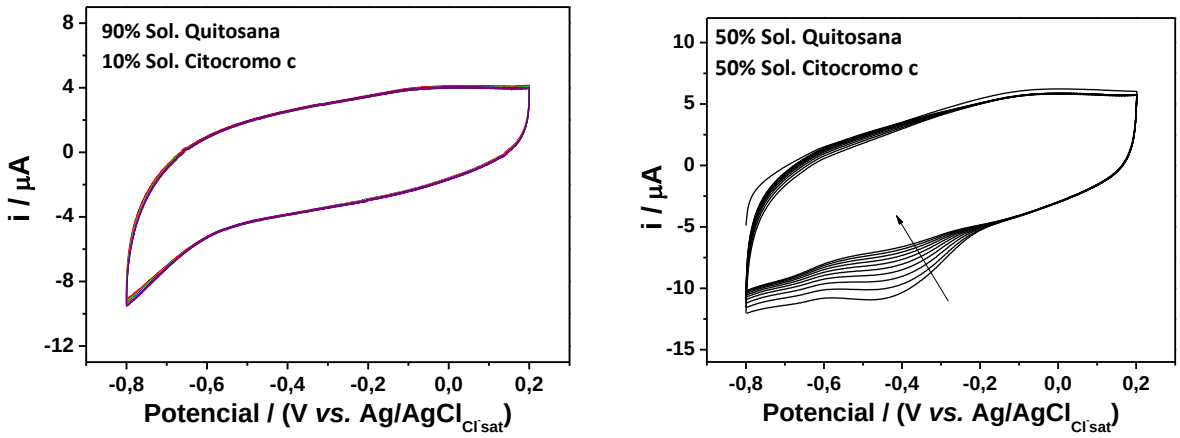


Figura 3.2 *Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono vítreo modificado com compósitos de diferentes porcentagens de quitosana. Veloc. varredura de 25 mV s^{-1}.*

Desta forma a melhor razão encontrada entre as quantidades das soluções de citocromo c (10 mg mL^{-1}) e quitosana foi de 25% e 75% respectivamente. E para o compósito com o líquido iônico, a melhor proporção encontrada foi de 3% do $BMMIBF_4$ sobre a primeira solução de citocromoc/ quitosana. Esta razão foi mantida para todos os experimentos citados neste trabalho e o perfil voltametrico será apresentado na seção de resultados e discussão.

3.5. Preparação dos eletrodos modificados de carbono vítreo

3.5.1. Com solução de quitosana e citocromo c

Para imobilizar o citocromo c, foi utilizada a mistura que continha 25 e 75% das soluções de citocromo c (Citc) e quitosana (Quit), sendo posteriormente depositados 10 µL sobre a superfície do carbono vítreo (CV) e deixado secar por 12h, formando assim o eletrodo CV/Citc/Quit.

Este mesmo procedimento foi realizado com um eletrodo de carbono vítreo com apenas 10 µL da solução de quitosana, formando o eletrodo CV/Quit, e ambos sendo utilizados para os experimentos eletroquímicos.

3.5.2. Com compósito de quitosana, citocromo c e líquido iônico

Após a otimização da concentração ideal do compósito com citocromoc-quitosana-BMMIBF4, esta foi utilizada na preparação do eletrodo de carbono vítreo, conforme ilustrado na figura 3.3. Com o auxilio de uma micropipeta 10 µL deste compósito foi depositado na superfície do eletrodo deixando secar por um período de 12h em local escuro e a temperatura ambiente, a figura 3.3 apresenta um esquema ilustrado da preparação do eletrodo. Após a evaporação do solvente, foi obtido o eletrodo modificado CV/Cit/Quit/BMMIBF$_4$ e utilizado para os experimentos eletroquímicos e de detecção de peróxido por voltametria cíclica cíclico em cela com 5mL de solução de PBS pH 7,0 juntamente com os eletrodos de platina e prata/cloreto de prata como contra eletrodo e referência respectivamente..

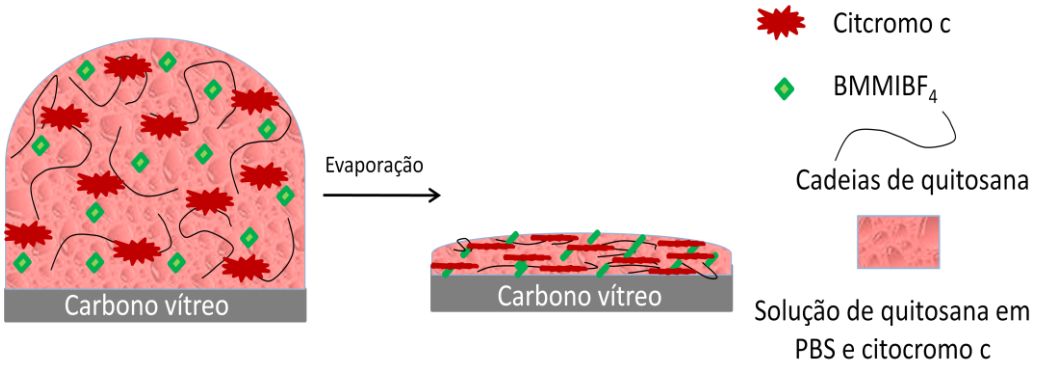


Figura 3.3. *Ilustração do método de preparação do eletrodo CV/Cit/Quit/BMMIBF$_4$*

3.6. Preparação dos eletrodos modificados com os FCSNTc

De maneira geral, os eletrodos modificados de microfibra de carbono recobertos com os nanotubos de carbono do tipo "cup stacked" (FCSNTc), foram preparados, através da sua imersão na solução contendo o compósito por um período de 12 horas a 4 ^{o}C e deixando em seguida somente o eletrodo em local escuro a temperatura ambiente para evaporar o solvente por mais 12 horas.

Como foram realizados estudos de atividade eletroquímica do citocromo c em diferentes compósitos, foi utilizada a seguinte nomenclatura de acordo com os componentes presentes nos compósitos, como descrito na tabela 2 a seguir:

Tabela 2. *Nomenclatura utilizada para os eletrodos de FCSNTc, de acordo com os materiais quem compõem o compósito*

Eletrodo	Componentes do compósito		
	Citocromo c	Quitosana	BMMIBF$_4$
FCSNTc/Citc/Quit/BMMIBF$_4$	✓	✓	✓
FCSNTc/Citc/Quit	✓	✓	-
FCSNTc/Citc/BMMIBF$_4$	✓	-	✓
FCSNTc/Citc	✓	-	-
FCSNTc	-	-	-

Todos os experimentos eletroquímicos com os FCSNTc modificados foram realizados em solução tampão fosfato PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 borbulhado com gás nitrogênio, utilizando o $Ag/AgCl_{Cl^-sat}$ com eletrodo referencia e uma chapa de platina com contra eletrodo. Após a utilização os eletrodo modificados foram estocados a 4 ^{o}C em solução tampão fosfato PBS.

3.7. Instrumentação

3.7.1. Medidas Eletroquímicas

Para se obter informações do comportamento eletroquímico do citocromo c foram utilizados as técnicas de voltametria cíclica e cronoamperometria. Todos os experimentos foram realizados no potenciostato da Eco Chemie, Autolab PGSTAT 30 utilizando os softwares GPS versão 4.9.005 e NOVA versão 1.6.013. A cela eletroquímica utilizada para os experimentos consistia em um compartimento único de vidro juntamente com a os eletrodos necessários para a realização dos experimentos.

3.7.2. Medidas Espectroscópicas

A espectroscopia é uma técnica muito utilizada no estudo de diversas heme-proteinas, pois a interação da radiação com a substância em análise pode fornecer informações sobre pequenas modificações estruturais ou de mudanças do tipo de ligação quando o material sofre qualquer tipo perturbação.

Os experimentos de UV-Visível das soluções contendo o citocromo c e os integrantes do compósito utilizados para imobiliza-lo na superfície do eletrodo, foram realizados em um espectrômetro HEWLETT PACKARD 8453. Uma cubeta de

quartzo com 1 cm de caminho óptico foi utilizada como cela, sendo os espectros obtidos num intervalo de 200 a 900 nm .

Os espectros de Raman dos feltros modificados foram realizados no equipamento RENISHAW Raman Imaging (System 3000), acoplado a um microscópio Olympus e detector CCD (Wright, 600 x 400 pixels). Foi utilizado como linha de excitação na região do visível um laser de He/Ne (Spectra Physics mod 127, λ_o=488nm (azul)). Os experimentos foram realizados no laboratório de Espectroscopia Molecular (LEM) do Instituto de Química da USP pelo aluno de doutorado Diego Pereira dos Santos, do grupo de pesquisa da profa. Dr^a. Marcia Temperini. Os espectros registrados tiveram a linha base corrigida utilizando o programa Origin® 8.0.

Os espectros de Dicroísmo Circular (DC) da solução de citocromo c e de seus respectivos compósitos com quitosana e líquido iônico foram realizados no equipamento JASCO modelo J-720 Spectropolarimeter da Central Analítica do Instituto de Química da USP. Uma cela de quartzo com espessura de 0,5 mm e capacidade de aproximadamente de 0,30 mL de volume, foi utilizada como caminho óptico e as medidas foram realizadas a uma velocidade de varredura de 50 nm/mim com a faixa espectral variando de 200 a 700 nm.

A técnica de Dicroismo circular é comumente utilizada para os estudos de modificações na estrutura secundária de biomoléculas, resultando em informações complementares as obtidas por UV-Vis, devido a interação da luz circularmente polarizada com as sequências dos aminoácidos.

3.7.3. Caracterização Morfológica

Para caracterização morfológica da superfície dos eletrodos FCSNTc, FCSNTc/Citc, FCSNTc/Citc/Quit, FCSNTc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$ e FCSNTc/Citc/$BMMIBF_4$, foi utilizado o a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) por emissão de campo, através do equipamento JEOL, modelo JSM-7401F situado na central analítica do Instituto de Química da USP, operado pelo Dr. Vinícius Romero Gonçales.

4. Resultados e Discussão

4.1. Eletroatividade do citocromo c em líquido iônico

A formação de compósitos para auxiliar a imobilização de uma proteína/enzima sobre a superfície de um eletrodo esta entre as maneiras eficazes de garantir um bom desempenho analítico dos biossensores. Dentre estes materiais, compósitos contendo quitosana e líquidos iônicos se destacam para a funcionalização de eletrodos com o citocromo c, garantindo uma melhor resposta eletroquímica e aumentando os níveis de sensibilidade. [46,82]

Como a motivação deste trabalho esta na formação de um compósito que contenha um líquido iônico capaz de manter a integridade proteína em estudo, foi realizado, inicialmente, um experimento por voltametria cíclica para monitorar a eletroatividade do citocromo c no líquido iônico tetrafluoroborato de 1-metil-2,3-dimetilimidazolio ($BMMIBF_4$).

O citocromo c foi imobilizado na superfície do eletrodo de carbono vítreo, misturando uma solução de citocromo c de concentração 10 mg mL^{-1}, com uma solução de quitosana na proporção 25/75%(v/v) respectivamente.

A solução de quitosana, amplamente utilizada em processos de imobilização de enzimas, forma uma barreira física, quando a água da solução é evaporada e, deste modo, mantém o citocromo c próximo a superfície do eletrodo, tornando-se o meio imobilizador do biossensor.

Conforme descrito na seção 3.5.1. foi obtido o eletrodo modificado CV/Quit/Citc, e a resposta eletroquímica do citocromo c foi registrada através de

uma varredura de potencial entre -0,90 e +0,60 V a uma velocidade de 50mV s^{-1}, utilizando como meio eletrolítico o líquido iônico $BMMIBF_4$. Este mesmo procedimento foi realizado com o eletrodo CV/Quit, para fins comparativos, e os resultados estão apresentados na figura 4.1.

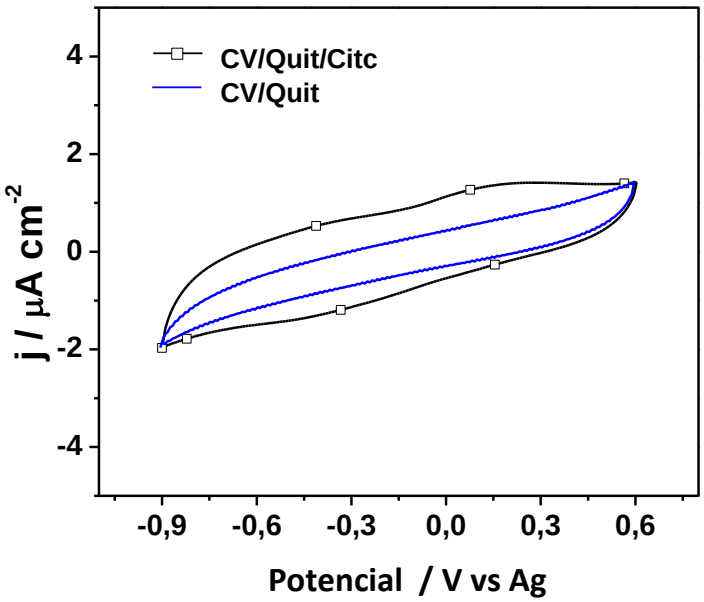


Figura 4.1. *Voltamogramas cíclicos dos eletrodos CV/Quit/Cit e CV/Quit em $BMMIBF_4$. Velocidade de varredura 25 mV s^{-1}*

Como pode-se observar, o eletrodo contendo o citocromo c no compósito apresenta um par de picos com valores de potencial do pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}) de 0,15 V e -0,45 V respectivamente com o valor de diferença de potencial entre os picos (ΔEp) de 600 mV. Como o eletrodo sem o citocromo não apresentou nenhum processo redox durante a faixa de potencial aplicada (CV/Quit), concluiu-se que os picos presentes no eletrodo CV/Citc/Quit estão relacionados com a transferência de elétrons entre o citocromo c e o carbono vítreo através da oxidação e redução do átomo de ferro do grupo heme Fe^{+2}/Fe^{+3}.

Em seguida, foram realizados outros voltamogramas cíclicos variando-se a velocidade de varredura para 50, 80, 100, 200, 300 e 400 mV s^{-1} para avaliar o processo de transferência de carga do citocromo c no líquido iônico.

Como pode ser observado na figura 4.2 (a), o citocromo c se mantém eletroativo em todos os experimentos e ambos os picos de corrente anódico e catódico cresceram com o aumento das velocidades de varredura indicando um processo eletroquímico controlado na superfície. Observa-se também um pequeno deslocamento entre os picos de corrente (ΔEp) com o aumento da velocidade de varredura e a figura 4.2 (b) apresenta a variação, com uma tendência linear, entre os valores de corrente de picos anódicos (i_{pa}) e catódicos (i_{pc}) com a velocidade de varredura.

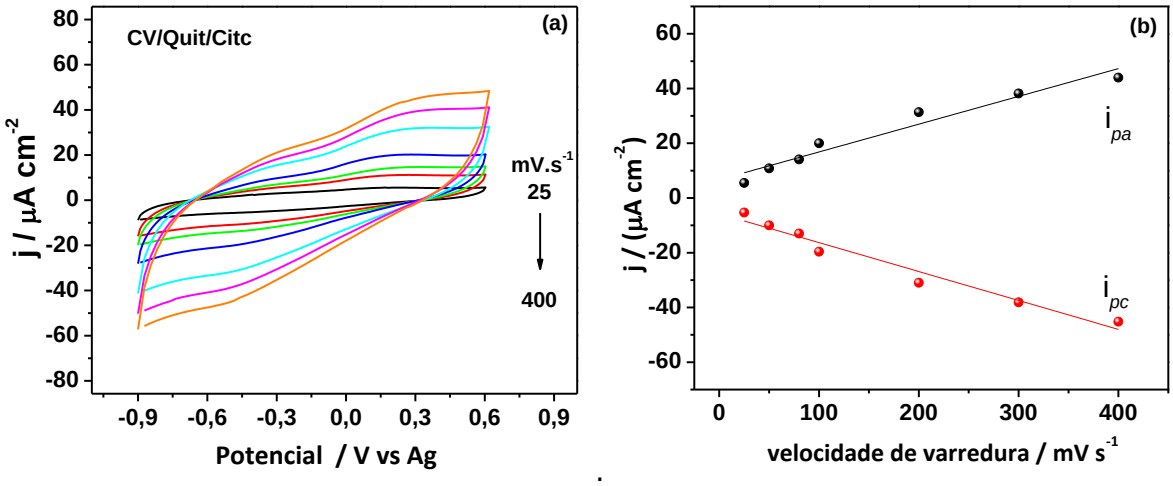


Figura 4.2 *(a) pefil j/E do eletrodo CV/Cit/Quit em BMMIBF4 a diferentes velocidades de varredura e (b) gráfico de i_{pa} e i_{pc} em função da velocidade de varredura*

Tendo em vista que valores baixos de ΔEp indicam uma boa reversibilidade e agilidade na transferência de elétrons, não podemos comparar o valor de ΔEp de 600 mV encontrado para este sistema em LI a 25 mV s^{-1} com meios aquosos convencionais, pois se trata de um meio eletrolítico totalmente diferente e

em meios aquosos os valores de ΔEp que variam de 5 a 300 mV em média (dependendo do método de imobilização)

Foi demonstrado por experimentos de voltametria cíclica que o líquido iônico $BMMIBF_4$ escolhido para a formação do compósito imobilizador do citocromo c, não impede que a mesma promova sua atividade redox. E baseado na sensibilidade da estrutura e na propriedade funcional da macromolécula biológica, acredita-se que apesar da interação do citocromo c com a quitosana o líquido iônico mantém o grupo heme acessível para a promoção dos eventos de transferência de elétrons. Tendo em vista um liquido iônico adequado, um dos objetivos deste trabalho foi estudar a interação deste material com a biomolécula durante a imobilização.

4.2. Carbono vítreo modificado com compósito de quitosana, citocromo c e líquido iônico $BMMIBF_4$

Para um biossensor apresentar bom desempenho analítico, todos os componentes utilizados na imobilização não devem prejudicar o processo de transferência de elétrons entre a proteína/enzima e a superfície do eletrodo de trabalho. Tendo em vista que o $BMMIBF_4$ manteve a eletroatividade do citocromo c, este foi incorporado no compósito e foi utilizado como o novo meio imobilizador.

A preparação do compósito foi descrita na seção 3.4, ou seja, foi adicionado 3% em volume da quantidade do $BMMIBF_4$ na mistura de 25/75% (v/v) das soluções de citocromo c (10 mg mL^{-1}) e quitosana respectivamente. Após depositar 10 µL por “casting” da solução do compósito e esperar secar por 12h a temperatura ambiente em local escuro, foi obtido o eletrodo modificado CV/Citc/Quit/$BMMIBF_4$.

Para verificar a eletroatividade do citocromo c neste compósito, foi utilizado uma solução tampão fosfato PBS pH 7.0 0,1 mol L^{-1} como meio eletrolítico, que fora previamente deixado borbulhar gás nitrogênio por um período de 1 hora. Quando o eletrodo foi submerso na solução tampão fosfato PBS, foi observado que a película do compósito permanecia na superfície do eletrodo de CV, indicando uma boa estabilidade do compósito no meio aquoso.

Utilizando a mesma faixa de potencial de -0,9 a +0,6 V foram realizados 10 ciclos voltamétricos a 25 mV s^{-1} do eletrodo CV/Citc/Quit/$BMMIBF_4$, cujo perfil eletroquímico esta apresentado na figura 4.3 (a).

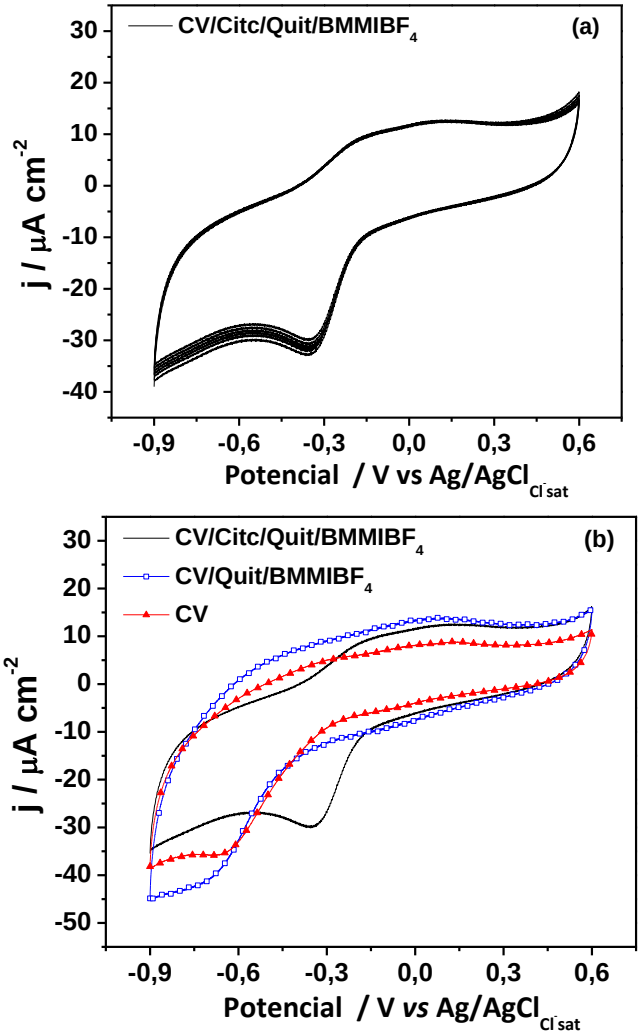


Figura 4.3 *(a) pefil j/E do eletrodo CV/Citc/Quit/$MMIBF_4$ e (b) comparação do sinal de corrente com os eletrodos CV/Quit/$BMMIBF_4$ e CV em solução tampão PBS*

Pela figura 4.3 (a), foi possível observar que desde o primeiro ciclo realizado, um par de picos redox permanece nos voltamogramas, com um pico de corrente iniciando em -0,15 V no sentido anódico e no sentido contrário o pico de corrente catódico tem seu ponto máximo em -0,35 V. Para o eletrodo CV/Citc/quit/BMMIBF$_4$ o ΔEp foi de 200 mV e os picos são atribuídos a transferência de elétrons entre o citc e o CV, pois através da figura 4.3 (b) observa-se que os eletrodos que não contém o citocromo c no compósito (CV/Quit/BMMIBF4 e CV) não apresentam nenhum pico de processo redox.

Nestes resultados, a presença dos picos evidencia que o citocromo c esta imobilizado na superfície do CV, e que o microambiente causado pela quitosana e liquido iônico no compósito não causam mudanças na eletro-atividade da biomolécula.

Isso é um fato interessante, pois se tratando de heme-proteínas, qualquer fator externo que perturbe a estabilidade da sua estrutura secundária, pode vir a promover a blindagem do grupo heme (que dificulta a transferência de elétrons) ou em casos mais agressivos, a biomolécula pode se desnaturar completamente, perdendo todo seu caráter eletroativo. [83,84]

4.2.1. Atividade eletrocatalítica do CV/Cit/Quit/BMMIBF$_4$ com peróxido de hidrogênio

Após verificar a eletroatividade do citcromo c imobilizado por quitosana e líquido iônico, foi utilizado o eletrodo CV/Citc/Quit/BMMIBF$_4$ para explorar sua atividade eletrocatalítica através da detecção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Para tal experimento, foi montado uma cela eletroquímica com 5 mL de solução tampão PBS pH 7,0 borbulhado com gás nitrogênio por uma hora com os

eletrodos de referência e contra eletrodo. A detecção foi monitorada por voltametria cíclica e com agitação magnética de 400-500 rpm, sendo adicionados 10 µL de uma solução 0,5 mol L^{-1} de H_2O_2. Nestas condições, cada alíquota adicionada correspondia a um incremento de 1,0 mmol L^{-1} na concentração de H_2O_2.

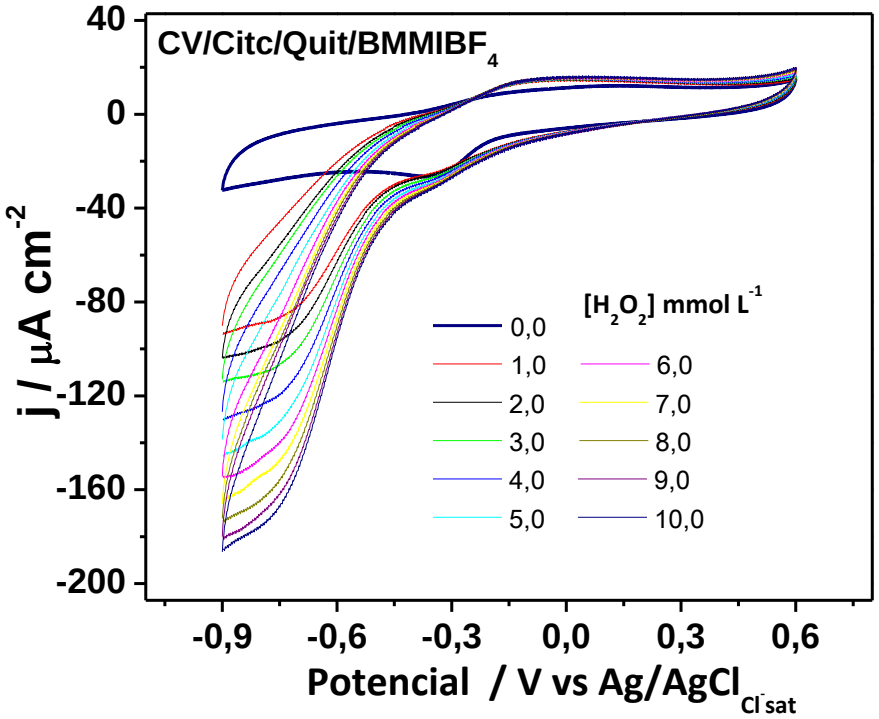


Figura 4.4 *Resposta da corrente em função do potencial do eletrodo CV/Citc/Quit/BMMIBF$_4$ em solução tampão PBS pH 7,0 contendo diferentes concentrações de H_2O_2 (velocidade de varredura = 25 mV s^{-1})*

Como apresentado na figura 4.4, logo após a adição da primeira alíquota de H_2O_2 (1,0 mmol L^{-1}) o comportamento eletroquímico do citocromo c mudou completamente. Primeiro pode-se observar que o pico de redução não ocorreu no mesmo valor de potencial de redução do citocromo c (-0,35 V), sendo que a corrente catódica começa a crescer a partir de -0,45 V formando o pico em -0,75 V. Segundo, vimos que neste valor de potencial de 0,75 V o valor da corrente de pico aumentava na medida em que se aumentava a concentração da solução de H_2O_2, mostrando que o analito era permeável ao compósito, porém o processo de redução não estava

sendo catalisado pelo citocromo c mas apenas ocorrendo devido ao contato com a superfície do eletrodo.

Para obter informações sobre o processo de redução de H_2O_2 em CV foi realizado o experimento sob as mesmas condições, porém utilizando o eletrodo CV sem o depósito do compósito em sua superfície (figura 4.5).

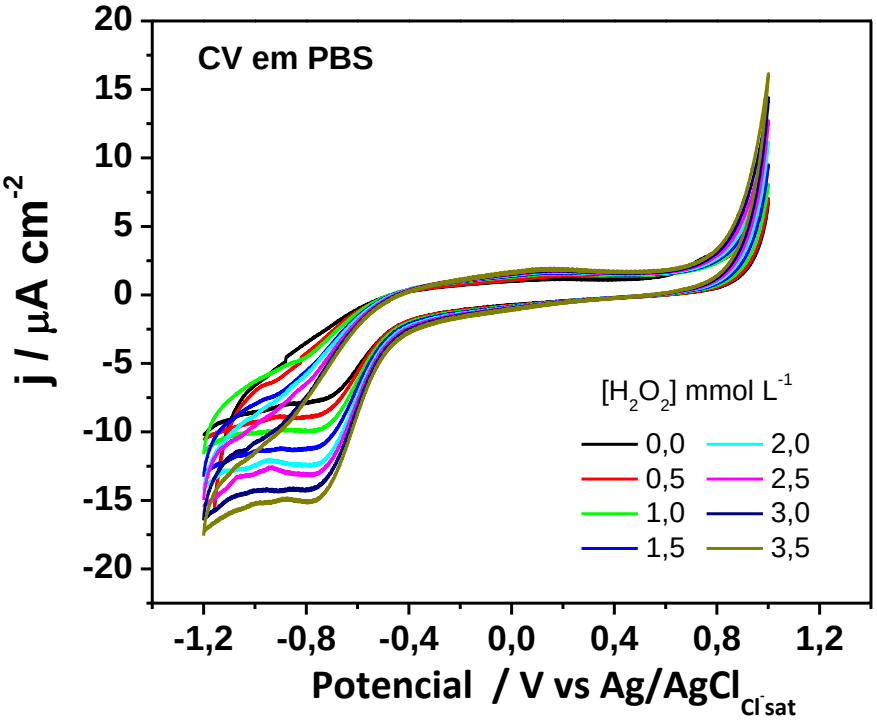


Figura 4.5 *Voltametria cíclica realiza com o CV em solução tampão de PBS pH 7,0 com diferentes concentrações de H_2O_2 (velocidade de varredura = 25 mV s^{-1})*

Pelos voltamogramas da figura 4.5 podemos observar que pico de corrente de redução se encontra em -0,75 V, sugerindo que a redução do H_2O_2 esteja ocorrendo neste valor de potencial devido ao contato direto com o eletrodo de CV. Como este é o mesmo valor de potencial encontrado para o eletrodo CV/Cit/Quit/$BMMIBF_4$, confirma-se que para o eletrodo modificado, o citocromo c não esteja catalisando a redução do H_2O_2.

Em seguida, novos métodos de imobilização foram estudados visando uma melhor resposta do compósito na presença desse analito.

4.2.2. Novo método de imobilização do citocromo c em carbono vítreo

Para a obtenção de um biossensor que apresente um bom desempenho, foi realizado um novo método de imobilização do citocromo c na superfície do eletrodo de carbono vítreo.

Nesse sentido o novo método de imobilização consiste inicialmente em modificar o eletrodo somente com um compósito com quitosana e líquido iônico. Para manter a mesma quantidade destes materiais, a porcentagem relacionada à quantidade da solução de citocromo c do compósito anterior, foi substituída pela solução tampão PBS pH 7,0.

Deste modo, o novo compósito foi desenvolvido através da adição de 3% do líquido iônico $BMMIBF_4$, na solução que continha 25% e 75% de solução tampão PBS e quitosana respectivamente. A formação do eletrodo modificado ocorreu pela deposição e evaporação de 10 µL deste compósito na superfície do eletrodo, conforme demonstrado na figura 4.6 a seguir, formando assim o eletrodo CV/Quit/$BMMIBF_4$.

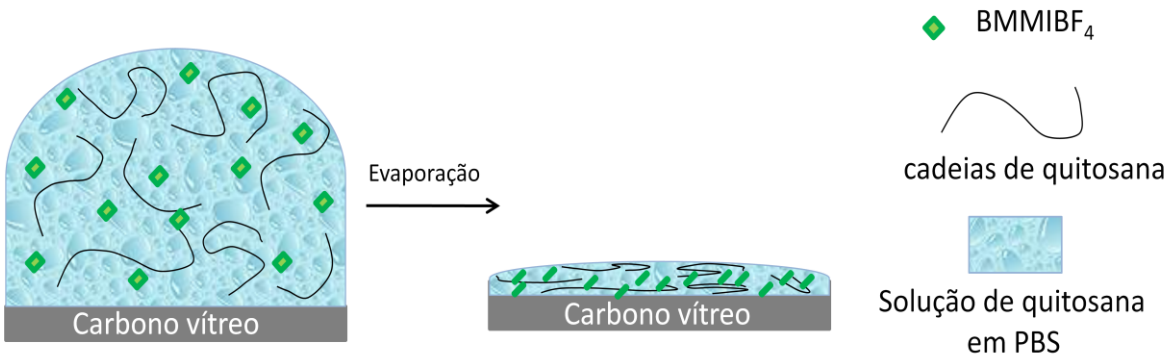


Figura 4.6 *Esquema ilustrado de preparação do eletrodo CV/Quit/$BMMIBF_4$ com o compósito de quitosana e líquido iônico*

A incorporação do citocromo c no compósito foi monitorada por voltametria cíclica, através da realização de 30 ciclos sucessivos do eletrodo CV/Quit/BMMIBF$_4$, com um intervalo de potencial de -0,5V a 0,3V e velocidade de varredura de 50mV.s^{-1}, em uma solução contendo citocromo c em PBS pH 7,0 na concentração de 10 mg mL^{-1} e o perfil j/E esta apresentado na figura 4.7.

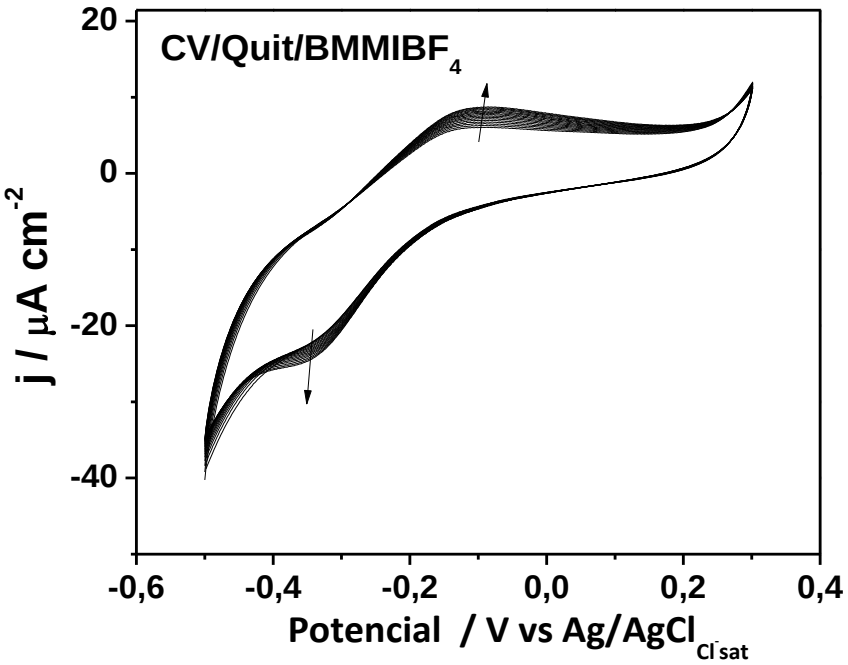


Figura 4.7 *Voltametria cíclica do eletrodo CV/Quit/BMMIBF$_4$ em solução de citocromo c em PBS pH 7,0 na concentração de 10 mg mL^{-1}.*

Pela figura 4.7 podemos perceber que através dos sucessivos ciclos voltametricos a corrente aumenta nos dois sentidos da varredura de potencial, com os valores de potencial de picos de corrente anódica e catódica em -0,10 V e -0,35 V respectivamente, chegando a um valor constante a partir do 20^0 ciclo. Como o processo de transferência de elétrons somente ocorre próximo da superfície do eletrodo e o sinal de corrente é proporcional à quantidade de material eletroativo, este aumento de corrente evidencia que a cada ciclo realizado mais citocromo c estava sendo incorporado na matriz do compósito. Sendo assim, após a ciclagem do

CV/Quit/BMMIBF$_4$ em solução de citocromoc, foi formado o eletrodo modificado CV/Quit/BMMIBF$_4$/Citc.

Para verificar se o citocromo c permanecia no compósito e analisar a eficiência do eletrodo CV/Quit/BMMIBF$_4$/Citc, este foi submetido a uma análise por voltametria cíclica em uma solução tampão de PBS (desoxigenada por gás nitrogênio).

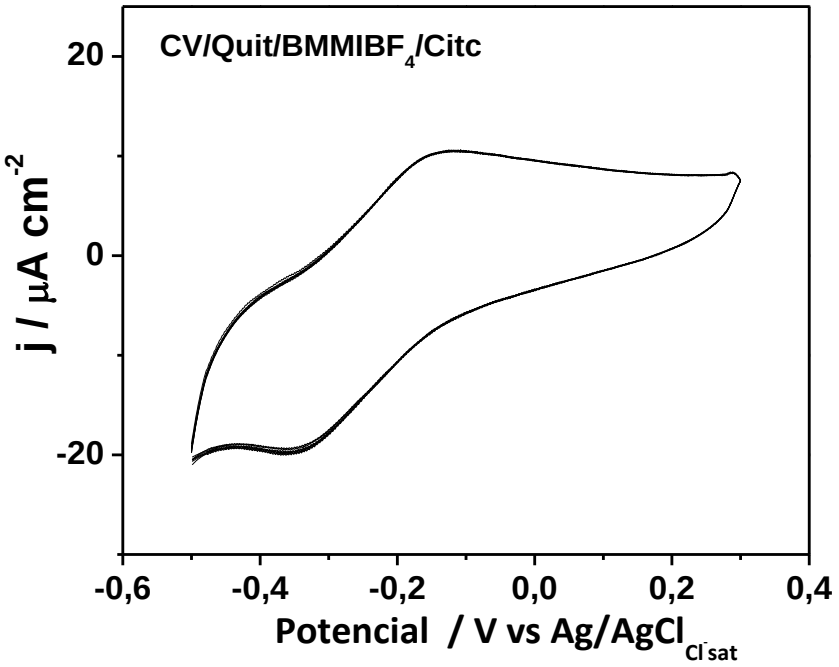


Figura 4.8 *Perfil j/E do eletrodo modificado CV/Quit/BMMIBF$_4$/Citc em solução de PBS pH 7,0. Velocidade de varredura de 25 mV s^{-1}.*

Como pode ser observado pela figura 4.8, mantendo-se as mesmas condições experimentais, o citocromo c imobilizado pelo novo método mantém-se eletroativo, apresentando um pico de corrente de oxidação e redução a -0,12 V e -0,35 V respectivamente com um valor de ΔEp de 230 mV.

Comparando estes dados do eletrodo CV/Quit/BMMIBF$_4$/Citc com o voltamograma do eletrodo anterior (CV/Citc /Quit/BMMIBF$_4$ da figura 4.3 (a) pag. 41), vemos que este apresenta picos de processos redox mais simétricos em ambos os

sentidos da varredura de potencial. Vale lembrar que em voltamogramas cíclicos a simetria dos picos de oxidação e redução são indícios de boa interação do material eletroativo com a superfície do eletrodo.

Para explorar a atividade eletrocatalítica do citocromo c por voltametria cíclica neste novo eletrodo, sua resposta eletroquímica frente à redução de H_2O_2 também foi estudada. Para tal análise foi preparada uma solução de H_2O_2 que resultava num incremente de 0,50 mmol L^{-1} a cada alíquota de 10 µL adicionada em 5 mL de solução tampão PBS pH 7,0 (figura 4.9).

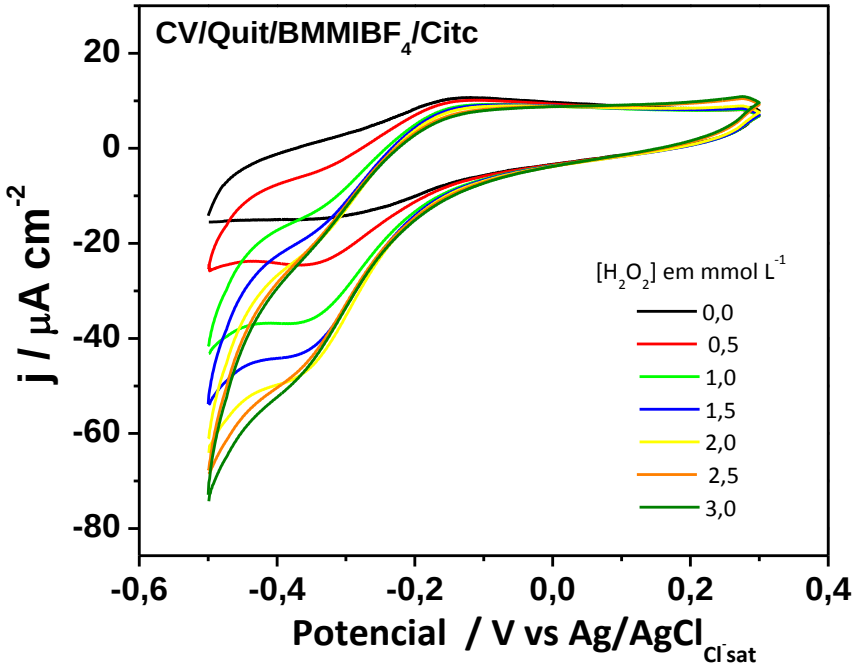


Figura 4.9 *Voltamogramas cíclicos do eletrodo /Quit/BMMIBF$_4$/Citc a 25 mV s^{-1} em solução tampão de PBS com diferentes concentrações de H_2O_2.*

De acordo com os resultados apresentados na figura 4.9 pode-se observar um perfil típico de redução eletrocatalítica do peróxido de hidrogênio. Observa-se logo na primeira adição de 10µL (0,20 mmol L-^{1} de H_2O_2) o aumento da corrente no sentido catódico a partir de -0,2V com a formação de um pico de redução em -0,35V. Foi observado que este perfil se repete em todas as adições

realizadas e que a corrente de pico aumentava gradativamente com o número de adições devido a crescente quantidade de material reduzida na superfície do eletrodo.

Diferentemente do apresentado para o eletrodo CV/Citc /Quit/BMMIBF$_4$, neste eletrodo formado pelo novo método de imobilização, o valor do potencial de redução do H_2O_2 permanecia no mesmo valor de redução do citocromo c, indicando que a redução do analito estava sendo catalisada pela biomolécula.

Para demonstrar a eficiência na detecção e calcular a sensibilidade analítica encontrada nos voltamogramas de redução de H_2O_2 no CV/Quit/BMMIBF$_4$/Citc, , foi montado um gráfico que mostra a relação entre a densidade de corrente relacionada ao processo de redução (j-j_o) com a concentração do analito. A figura 4.10 apresenta o resultado do cálculo da sensibilidade para este eletrodo, juntamente com a sensibilidade do eletrodo CV, durante a redução do H_2O_2 sem o compósito (figura 4.5, pag 44), para fins comparativos.

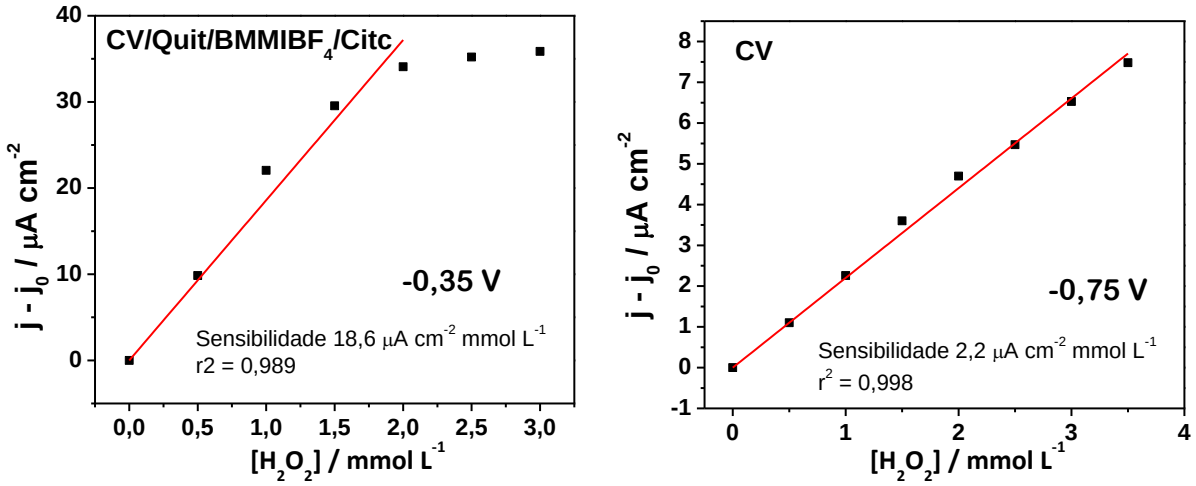


Figura 4.10 *Curvas analíticas construídas através da variação da corrente catódica durante as adições de alíquotas de H_2O_2 por voltametrias cíclicas dos eletrodos CV/Quit/BMMIBF$_4$/Citc e CV.*

Com pode ser observado na figura 4.10, eletrodo CV/Quit/BMMIBF$_4$/Citc apresentou sensibilidade de 18,6 µA cm^{-2} mmol L^{-1}, cujo valor é superior a sensibilidade de 2,2 µA cm^{-2} mmol L^{-1} para o eletrodo de CV, evidenciando que a modificação da superfície do eletrodo com o compósito apresentou vantagens na detecção de H_2O_2.

Esses resultados mostram que a presença do citocromo c desempenha um papel importante no comportamento analítico para a redução H_2O_2 e que o método utilizado para sua imobilização pode modificar todas suas propriedades eletrocatalíticas como fora mostrado nos experimentos até este momento.

Sendo assim foi demonstrado que o compósito formado é passível de ser utilizado para imobilização do citocromo c, sendo este método considerado vantajoso pois não envolve formações de ligações covalentes com a biomolécula, favorecendo a preservação de sua estrutura .

Com o objetivo de construir um biossensor com um melhor desempenho eletroquímico, foi utilizado um novo substrato capaz de melhorar a transferência direta de elétrons. Tendo em vista a alta aplicabilidade dos nanotubos de carbono em biossensores com citocromo c, os feltros de microfibra de carbono recobertos com nanotubos do tipo “cup stacked” (FCSNTc) foram utilizados como uma nova alternativa de eletrodo tridimensional, para os estudos eletroquímicos da biomolécula.

4.3. FCSNTc como substrato para imobilização de citocromo c

Os FCSNTc são plataformas tridimensionais que apresentam elevada área de contato e condições favoráveis para tornarem-se eletrodos de trabalhos em estudos eletroquímicos. Devido as propriedades dos FCSNTc, o interesse em utiliza-

los como substratos para biossensores é relativamente recente e os estudos tem mostrado resultados interessantes, como apresentado por Romero e colaboradores [78] sobre a elevada sensibilidade obtida em feltros modificados com materiais híbridos análogos ao azul da Prússia para detecção de peróxido de hidrogênio.

A construção do biossensor proposto nesta seção consiste em imobilizar o citocromo c nos FCSNTc utilizando o compósito para a detecção de peróxido de hidrogênio em carbono vítreo. Portanto, o método de imobilização partiu da imersão do eletrodo na solução do compósito, contendo 3% do líquido iônico $BMMIBF_4$ na mistura das soluções de citocromo (10 mg mL^{-1}) e quitosana a 25/75% (v/v), respectivamente, por 12 horas a 4 ^{o}C. Em seguida o feltro foi retirado da solução e deixado em local escuro a temperatura ambiente para evaporar o solvente, formando o eletrodo FCSNTc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$.

Para avaliar o efeito do liquido iônico neste compósito, este mesmo procedimento foi realizado para um novo feltro imerso em uma solução contendo apenas as soluções de citocromo e quitosana a 25/75% (v/v) e após a secagem, formou-se o eletrodo FCSNTc/Citc/Quit.

O estudo da eletroatividade do citocromo c imobilizado e da sua estabilidade nestes eletrodos modificados, foi realizado inicialmente através da técnica de voltametria cíclica, com a realização de 20 ciclos em solução tampão fosfato PBS pH 7,0 a 25 mV s^{-1}, conforme demonstrado na figura 4.11 (a) e (b). Para fazermos uma comparação do desempenho eletroquímico do citocromo c nos feltros modificados, todos os valores de corrente obtidos nos voltamogramas foram divididos pelo valor da massa dos feltros, em miligramas representados por i/m (µA mg^{-1}).

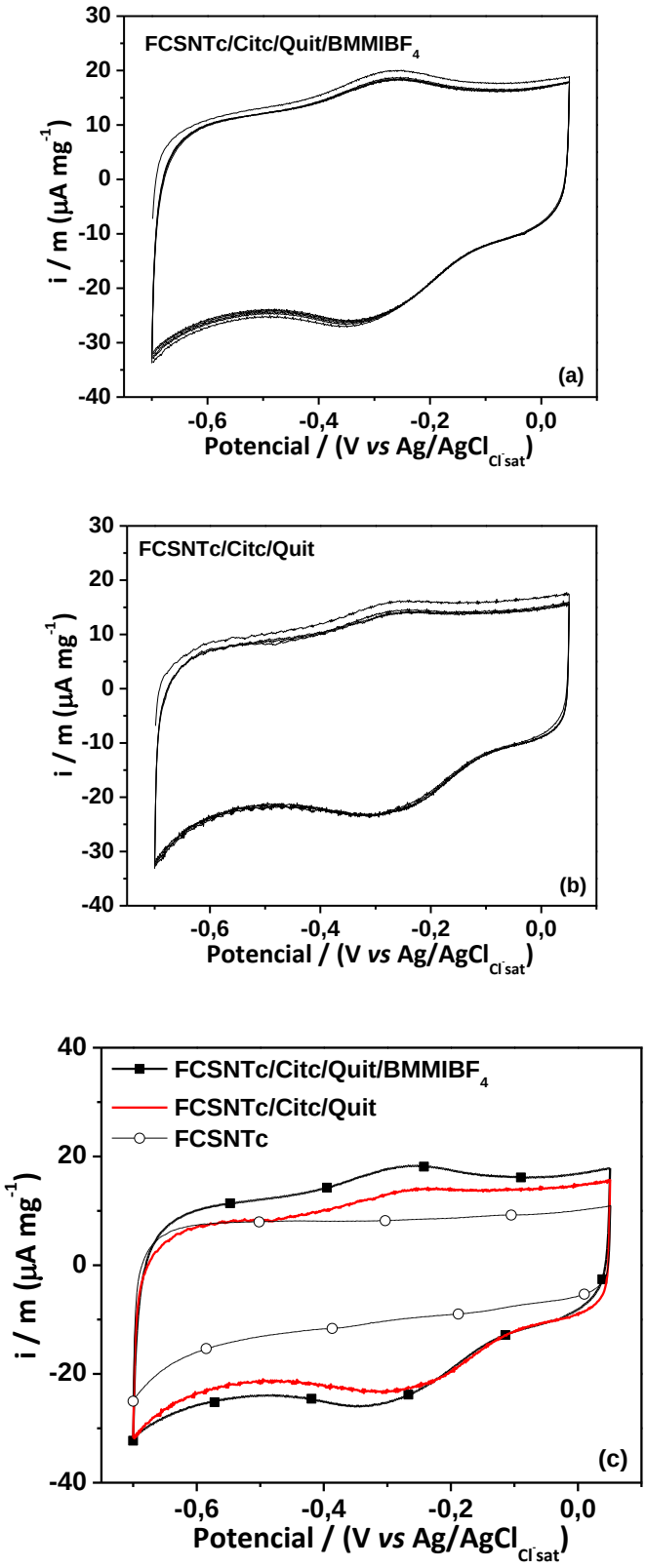


Figura 4.11 *Perfis i/E dos eletrodos (a) FCSNTc/Citc/Quit/BMMIBF$_4$, (b) FCSNTc/Citc/Quit em solução tampão fosfato PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7,0. (c) comparação entre os perfis dos eletrodos com o FCSNTc. Veloc. de varredura de 25 mV s^{-1}.*

Como pode ser observado, para ambos os eletrodos (a) e (b), os voltamogramas apresentaram um mesmo perfil eletroquímico típico da heme-proteína com a presença de um par de pico redox. [3,8] Observa-se também que a corrente de pico permanece num valor constante durante todos os ciclos, indicando que o citocromo permanece eletroativo e que o método de imobilização esteja favorecendo a conexão entre o sitio ativo da biomolécula com os nanotubos do feltro para a transferência direta de elétrons do processo redox Fe^{+3}/Fe^{+2} do grupo heme.

A figura 4.11 (c), mostra a comparação dos voltamogramas cíclicos dos eletrodos modificados (a) e (b) com o feltro FCSNTc (sem compósito) que não apresenta nenhum processo eletroquímico no intervalo de potencial utilizado. Para o eletrodo FCSNTc/Cit/Quit/$BMMIBF_4$ o potencial de pico anódico (E_{pa}) e pico catódico (E_{pc}) tem valores de -0,260V e -0,344 V respectivamente, com o valor de separação entre os picos anódico e catódico ($\Delta Ep = E_{pa} - E_{pc}$) de 84 mV e para o eletrodo FCSNTc/Citc/Quit, E_{pa} vale -0,249 V, E_{pc} -0,308V e ΔEp 59 mV.

Para estimar a quantidade de citocromo c imobilizado nos eletrodos, foi usada a relação entre as cargas dos processos redox com a quantidade de material eletroativo na superfície do eletrodo. Utilizando o programa Origin 8.0 foi possível integrar a área das correntes de picos do par redox chegando aos valores de carga relativos a cada processo. Para o citocromo c imobilizado no eletrodo FCSNTc /Citc/Quit/$BMMIBF_4$ a carga dos processos de oxidação e redução foram de $2{,}511 \times 10^{-5}$ C e $-6{,}77 \times 10^{-5}$ C respectivamente, e para o eletrodo FCSNTc/Citc/Quit os valores das cargas são $1{,}91 \times 10^{-5}$ C e $-6{,}28 \times 10^{-5}$ C para oxidação e redução. Como a quantidade de carga em um processo eletroquímico esta diretamente relacionada com a quantidade de material eletroativo na superfície do eletrodo pode-se condizer que a quantidade de citocromo c imobilizada nos eletrodos foi sutilmente superior

para o eletrodo contendo o líquido iônico, provavelmente ocasionado por uma mudança na dupla camada elétrica na superfície do nanotubo de carbono, favorecendo uma quantidade maior de interações com citocromo c.

Além da similaridade do perfil eletroquímico, da estabilidade do método de imobilização observada do voltamograma e da quantidade de citocromo c, observa-se também para o eletrodo modificado FCSNTc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$. os valores de Epa e Epc estão em valores mais negativos com valor de ΔEp maior, quando comparado com o outro eletrodo.

Estas mudanças nos parâmetros eletroquímicos, também foram observadas por em outros trabalhos da literatura, que mostram a influência da carga de líquidos iônicos com cátions imidazólios, em heme-proteínas. [85] Para estes casos, foi observado que ao utilizar líquido iônico junto com nanotubos de carbono, os cátions imidazólios se aproximam da carga negativa dos nanotubos de carbono deixando a carga da superfície do eletrodo mais positiva e por isso, dependendo da carga da heme proteína a ser imobilizada no eletrodo, os valores de E_{pa}, E_{pc}, e ΔE_p podem mudar devido a diferentes modo de interação com a superfície. [51,85]

Por exemplo, Du e colaboradores [85] mostraram que ao utilizar uma heme-proteína neutra em pH 7,0, como no caso da Mioglobina (Mb), a presença da carga positiva do cátion (tipo imidazólio) do líquido iônico $BMIBF_6$ (hexafluorborato de 1-butil,2-metilimidazolio), não interfere nos parâmetros eletroquímicos mencionados acima, independente se a proteína foi imobilizada por um compósito contendo ou não o liquido iônico. No entanto ao utilizar o citocromo c, que apresenta carga positiva no pH 7.0 (devido ao seu ponto isoelétrico pH 10,1), este mesmo trabalho mostrou que ao colocar o liquido iônico na presença dos nanotubos de carbono, a carga positiva formada na superfície proporcionaria uma repulsão da

carga positiva do citocromo c, mas não os impedindo de interagir, pois mesmo com o líquido iônico os seus processos redox ocorrem, porém em potenciais mais negativos ao serem comparados com o mesmo estudo em um compósito sem o liquido iônico.

Sendo assim, fazendo uma analogia, os valores obtidos de Epa, Epc e ΔEp para o eletrodo modificado FCSNTc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$, foram diferentes devido a um fator de acessibilidade do citocromo c na superfície de nanotubo devido a uma diferença na resistência de transferência de cargas no meio que contem o material totalmente iônico com o compósito sem.

Para demonstrar que os nanotubos de carbono utilizados na preparação deste feltro apresentam um papel muito importante na eletroquímica do citocromo c, foi realizado o mesmo experimento de estudo da eletroatividade do biomaterial imobilizado pelo compósito com quitosana e $BMMIBF_4$ porém utilizando um feltro que não era recoberto por nenhum tipo de nanotubos de carbono (Fc). Este Fc também foi desenvolvido pelo professor José Maurício Rosolen da USP de Ribeirão Preto e serviu como o eletrodo de trabalho nos estudos voltamétricos.

Para imobilizar o citocromo c, o Fc foi mergulhado na solução com o compósito de citocromo c, quitosana e $BMMIBF_4$ por um período de 12 horas a 4 ^{o}C e deixado mais 12h em temperatura ambiente fora da solução para evaporar o solvente formando assim o eletrodo modificado Fc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$. Em seguida o eletrodo foi colocado em 5 mL de solução de PBS e a medida eletroquímica foi realizada aplicando um intervalo de potencial de -0,6V até 0,3V a 25mV.s^{-1}.

De acordo com a figura 4.12, foi observado que o perfil voltamétrico do eletrodo modificado Fc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$ era diferente dos eletrodos que apresentavam nanotubos de carbono na superfície das microfibras

(FCSNTc/Quit/Cit/BMMIBF$_4$ e FCSNTc/Quit/Cit). Para este eletrodo foi observado apenas uma onda ampla de corrente catódica a partir de -0,35 V, que diminui ao longo de apenas 5 ciclos realizados, indicando que para este substrato, o citocromo c imobilizado no compósito não desempenha a sua atividade eletroquímica devido a falta de interação dos seus sítios ativos com a superfície do feltro de microfibra de carbono.

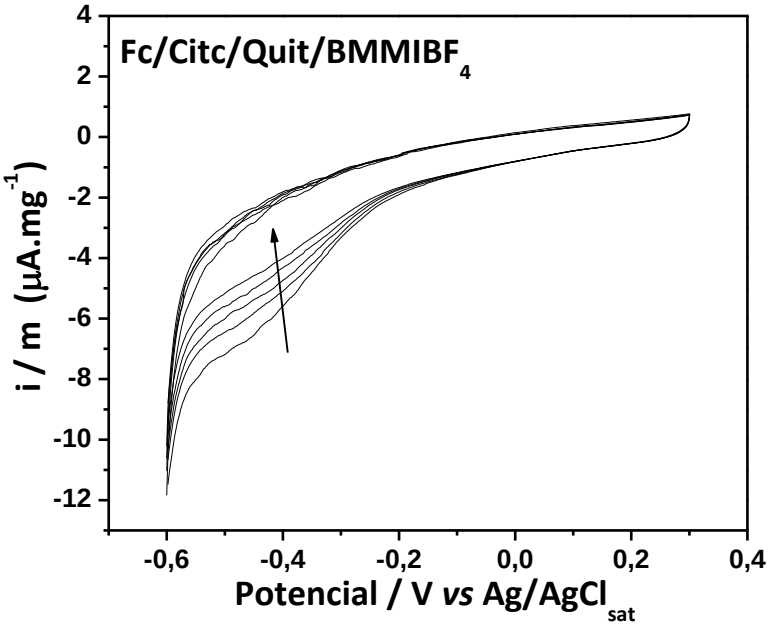


Figura 4.12 *Voltamograma cíclico do eletrodo Fc/Citc/Quit/BMMIBF$_4$ em solução tampão PBS pH 7.0 (v=25mV.s^{-1}).*

Considerando este resultado da figura 4.12, com todos os outros dados obtidos sobre a eletroatividade do citocromo c nos compósitos citados em eletrodo de carbono vítreo (CV) e em FCSNTc, podemos afirmar que a presença dos nanotubos de carbono representam uma melhora na atividade eletroquímica da biomolécula mais significativa do que a presença do líquido iônico no compósito. Estes dados em questão se contrapõem quando comparados com estudos que utilizam quitosana, líquido iônico com nanotubos de carbono dispersos nos

compósitos, pois neste caso, a eletroatividade do citocromo c somente é melhorada quando líquido iônico é incorporado.

De acordo com o trabalho apresentado na literatura por Zhang e colaboradores [46], que estudaram o comportamento eletroquímico do citocromo c em compósitos semelhantes aos deste trabalho, mostraram que ao utilizar eletrodo de trabalho de carbono vítreo com nanotubos de carbono de múltiplas camadas (MWCNT) disperso nos compósitos, o citocromo c apresenta uma melhora na sua eletroatividade somente quando o liquido iônico está presente, pois assim, ele estaria favorecendo a interação da heme-proteína com os nanotubos de carbono e deixando os sítios ativos mais disponíveis e facilitando assim a transferência direta de elétrons. No entanto, os autores não mencionam o fato dos nanotubos de carbono apresentarem uma melhor dispersão quando o líquido iônico é incorporado e desta forma, melhorando a interação com a biomolécula.

No caso dos FCSNTc, os nanotubos já se encontram imobilizados nas paredes das microfibra de carbono que compõem o feltro, e desta maneira o líquido iônico não precisa agir como agente dispersante, como apresentados nos eletrodos de CV por Zhang e colaboradores. [46]

4.3.1. Atividade eletrocatalítica do citocromo c no FCSNTc

Após os estudos eletroquímicos do citocromo c imobilizado nos compósitos com quitosana e líquido iônico, foram realizados testes de detecção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com os eletrodos modificados, para obtermos informações sobre a sensibilidade destes novos biossensores.

Experimentos eletrocatalíticos foram realizados através do monitoramento da corrente de redução do analito, sendo a técnica cronoamperométrica a mais sensível e adequada para tal estudo. Como a detecção amperométrica consiste em informar a variação da corrente em função do tempo através da aplicação de um potencial constante, houve a necessidade de determinar o valor do potencial necessário para reduzir o H_2O_2 eletrocataliticamente para os novos eletrodos.

Para tal finalidade, a técnica de voltametria cíclica foi utilizada para monitorar a corrente de redução do H_2O_2, com o intervalo de potencial de -0,70 V a 0,30 V. Foram utilizados 5 mL da solução tampão de PBS pH 7,0, saturada de gás nitrogênio, na cela eletroquímica com agitação magnética moderada (400 rpm) e a variação da concentração foi determinada pela adição de alíquotas de uma solução 0,1 mol L^{-1} de H_2O_2.

A figura 4.13 abaixo apresenta os voltamogramas cíclicos da atividade eletrocatalítica do eletrodo FCSNTc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$ através da variação da concentração de H_2O_2 para 0,20, 0,40, 1,00, e 1,40 mmol L^{-1} (b – e) a uma velocidade de varredura de 25 mV s^{-1}.

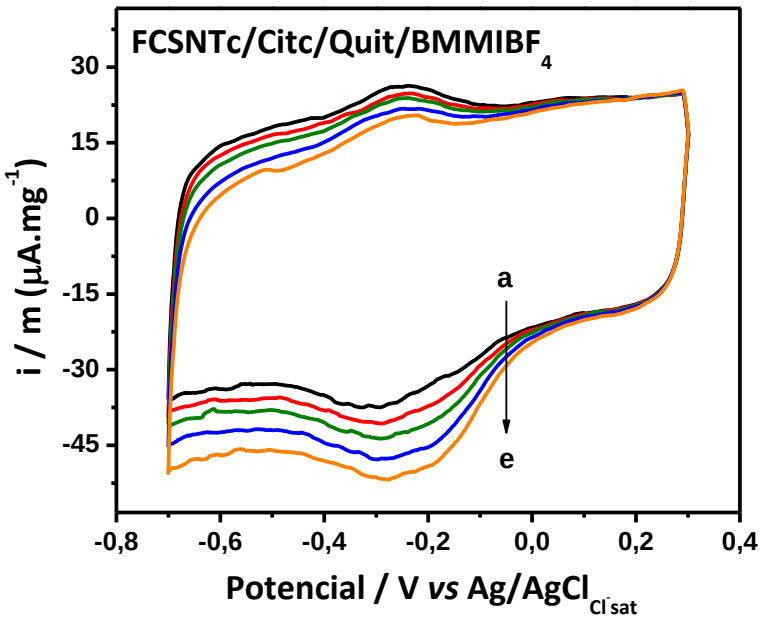


Figura 4.13. *Voltamogramas cíclicos do eletrodo FNTc/Citc/Quit/BMMIBF$_4$ em diferentes concentrações de H_2O_2: (a) 0,00, (b)0,20, (c) 0,40, (d) 1,00 e (e) 1,40 mmol L^{-1}. Velocidade de varredura 25 mV s^{-1}*

De acordo com os resultados, o voltamograma (a) apresenta somente os picos típicos do processo redox do citocromo c, devido a sua eletroatividade no meio eletrolítico. Em seguida ao adicionar uma alíquota capaz de manter a solução numa concentração de 0,20 mmol L^{-1} de H_2O_2 (b), foi observado um aumento na intensidade de corrente de pico catódico, com um valor máximo em aproximadamente -0,30 V. Como pode ser visto, quando se aumenta a concentração do analito para 0,40, 1,00 e 1,40 mmol L^{-1} (c – e) na solução, ocorre o aumento da corrente de pico no sentido catódico e a diminuição da corrente de pico anódico. Estes fenômenos caracterizam um processo de redução eletrocatalítica indicando que no potencial de -0,30 V esteja ocorrendo a reação de redução do H_2O_2 catalisada pelo citocromo c imobilizado no eletrodo.

O experimento apresentado na figura 4.13 foi importante para determinar qual seria o melhor potencial de polarização do eletrodo durante os experimentos de

detecção de H_2O_2 por cronoamperometria. E como pode ser visto o potencial de -0,30 V foi suficiente para o H_2O_2 ser reduzido pelo citocromo c e deste modo sendo escolhido como o potencial de redução para os experimentos de detecção.

Para comprovar que os picos observados no voltamograma da figura 4.13 estão relacionados com os processos de redução do H_2O_2 pelo citocromo c na superfície dos FCSNTc modificados, foi realizada uma nova detecção do H_2O_2, sob as mesmas condições experimentais e de concentração, utilizando um feltro de microfibra de carbono sem o recobrimento dos nanotubos de carbono (Fc) com o compósito de citocromo c, quitosana e $BMMIBF_4$ (Fc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$) e de um feltro FCSNTc sem nenhum tipo de compósito.

Como pode ser observado na figura 4.14, os perfis de corrente para a detecção de H_2O_2 para o eletrodo Fc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$ (a) e o FCSNTc (b) são bem diferentes do observado para o eletrodo FCSNTc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$ (figura 4.13). Vemos na figura 4.14 (a) que nenhum pico de corrente é observado, indicando que nenhuma interação deva estar ocorrendo entre os sítios ativos do citocromo c com a superfície do eletrodo de Fc. Para o FCSNTc, devido a ausência do citocromo c , nenhum processo redox fora registrado e o aumento da corrente indica que uma pequena quantidade de H_2O_2 esta sendo reduzida na superfície do eletrodo.

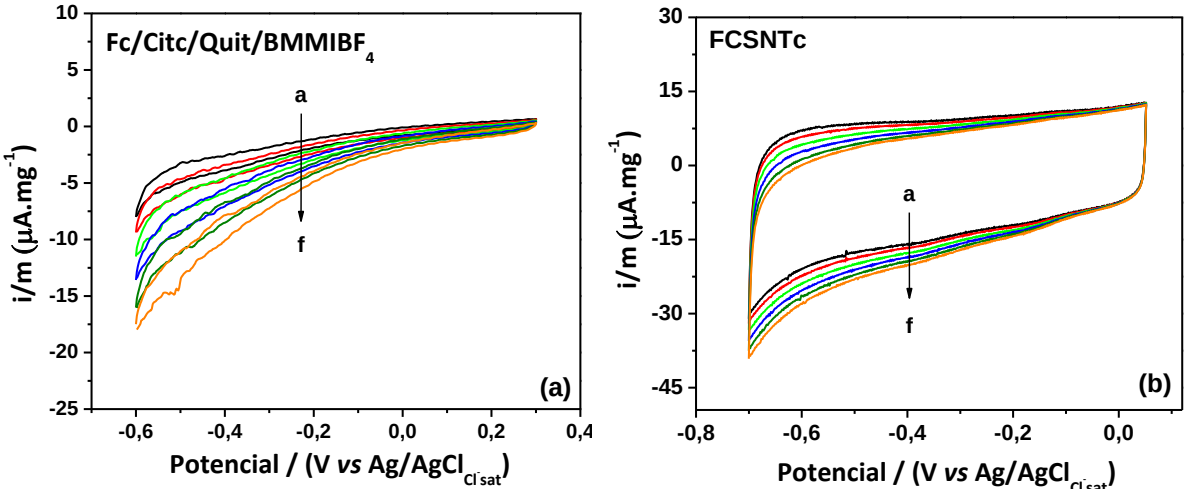


Figura 4.14. *Perfil i/E dos eletrodos (a) Fc/Citc/Quit/BMMIBF$_4$ e (b) FCSNTc em diferentes concentrações de H_2O_2: (a) 0,00, (b)0,20, (c) 0,40, (d) 0,60, (e) 0,80 e (f) 1,00 mmol L^{-1} em solução tampão PBS pH 7,0.*

Através das figuras 4.14 (a) e (b), podemos concluir que a presença dos nanotubos de carbono são fundamentais para promover os processos redox do citocromo c e que o processo de detecção eletrocatalítica do H_2O_2 esteja ocorrendo através da biomolécula, já que no eletrodo na ausência do citocromo c o valor de corrente relacionada o processo de redução do analito foi menor.

Dando seguimento nos estudos de detecção foram realizados testes amperométricos, para se obter uma maior sensibilidade em relação a quantificação de H_2O_2 em solução. Para tal finalidade, foi utilizada a técnica de cronoamperometria aplicando-se o potencial de redução de -0,30 V nos eletrodos FCSNTc/Citc/Quit e FCSNTc/Citc/Quit/BMMIBF$_4$.

Para os testes, a variação da concentração do analito foi condicionada a adição de alíquotas de 10 µL da solução de H_2O_2 0,10 mmol L^{-1} em 5 mL do eletrólito de solução tampão fosfato PBS pH 7,0, saturado de gás nitrogênio. Deste modo os saltos de corrente de redução observados nos experimentos estão relacionados ao incremento de 0,20 mmo L^{-1} na concentração do analito em solução.

Como procedimento experimental, antes de iniciar cada teste, os eletrodos foram mantidos, sob o potencial de -0,30 V, por um período de 40 minutos, para manter a variação da corrente de fundo o mais estável possível, sem a presença do analito.

O principal parâmetro a ser utilizado para comparar o desempenho da resposta eletrocatalítica do citocromo c nos diferentes eletrodos é a sensibilidade de detecção do H_2O_2 obtidos pela curva analítica. O cálculo desta grandeza foi realizado pela construção de um gráfico que relaciona os valores de corrente ($i-i_o$) dos patamares, após a adição do analito com a sua concentração no eletrólito. Deste gráfico ao aplicar uma regressão linear aos pontos experimentais, obteve-se uma reta, cujo coeficiente angular corresponde a sensibilidade (S) ao biossensor frente à detecção do analito. Da reta obtida, anotou-se o valor do coeficiente de correlação (r^2), pois quanto mais próximo ao valor de 1,0, melhor é a adequação da reta aos dados experimentais. A figura 4.15 a seguir apresenta os cronoamperogramas para os eletrodos modificados juntamente com as curvas analíticas para determinação da sensibilidade.

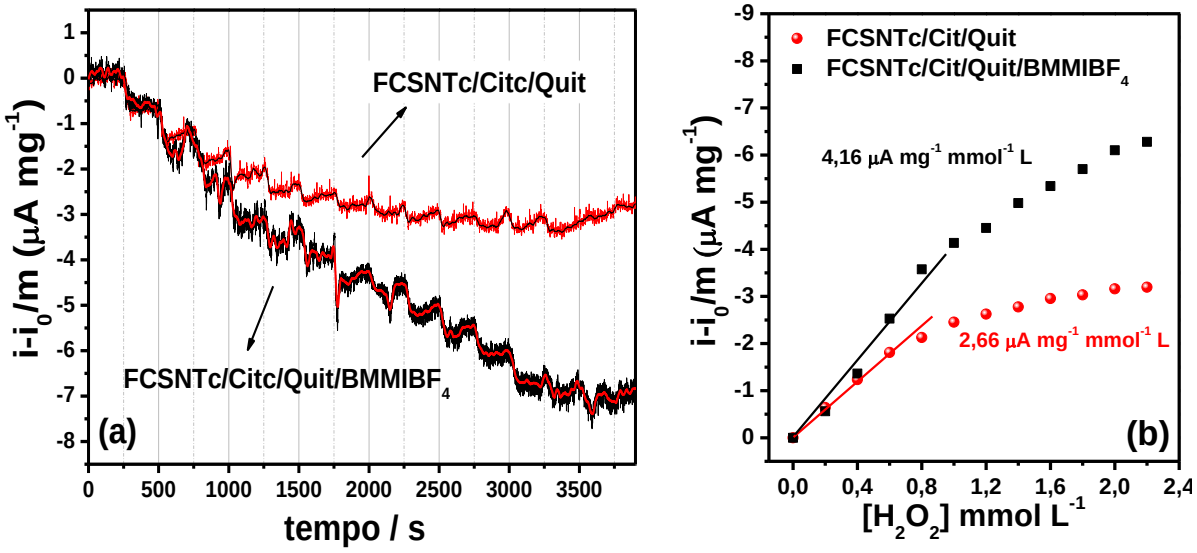


Figura 4.15. *(a) cronoamperograma e (b) curvas analíticas dos eletrodos modificados e polarizados a -0,30 V durante a detecção de H_2O_2 com incrementos de 0,20 mmol L^{-1} na concentração do analito em solução tampão fosfato pH 7.0.*

Analisando a figura 4.15 (a) vemos que ao adicionar alíquotas que corresponde a 0,20 mmol L^{-1} de H_2O_2 cada uma, ocorreu um salto de corrente de redução, sendo este aumento mais pronunciado quando se utilizou o eletrodo modificado FCSNTc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$.

Este salto de corrente ocorre, pois ao adicionar uma quantidade de analito no eletrólito, o citocromo c, que se encontra no estado reduzido, se oxida ao reduzir quimicamente o H_2O_2 a H_2O. Como o eletrodo esta polarizado a um potencial de -0,30 V, a forma oxidada do citocromo c é reduzida eletroquimicamente na superfície do eletrodo, o que resulta no aumento da corrente catódica. Ou seja, a quantidade de citocromo c que é reduzido na superfície do eletrodo é proporcional à quantidade de H_2O_2 que se reduz e um esquema ilustrativo destes processos esta representado na figura 4.16 a seguir.

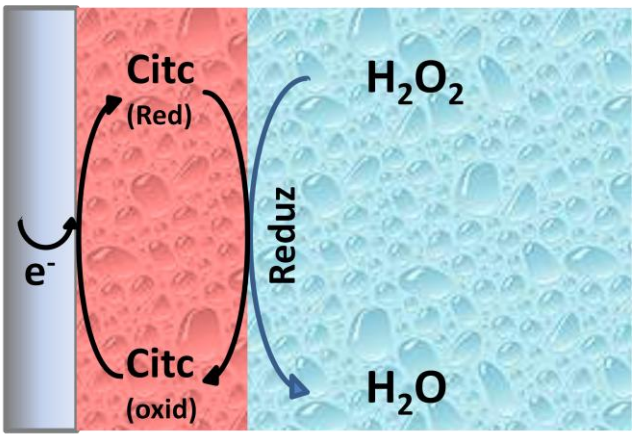


Figura 4.16. *Ilustração esquemática de redução do H_2O_2 por parte do citocromo c imobilizado no eletrodo a -0,30 V vs $Ag/AgCl_{Cl^- sat}$*

Após reação de redução do analito, o valor da corrente tende a formar um patamar estável pelo fato do sistema atingir um limite difusional das espécies e o próximo salto de corrente somente ocorre quando uma nova alíquota de H_2O_2 é adicionada ao eletrólito.

Analisando os dados das curvas analíticas da figura 4.15 (b) (pagina 62) vemos que a sensibilidade para o eletrodo FCSNTc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$ foi de 4,18 µA mg^{-1} $mmol^{-1}$ L, com coeficiente de correlação de 0,990, limite de detecção (3 vezes o desvio padrão da corrente residual sem o analito/sensibilidade) de 5,5 x 10^{-5} mol L^{-1} e faixa linear até 1,0 x 10^{-3} mol L^{-1}. Já para o eletrodo FCSNTc/Citc/Quit, sem a presença do líquido iônico, a sensibilidade obtida foi de 2,66 µA mg^{-1} $mmol^{-1}$ L, com coeficiente de correlação de 0,989, limite detecção (3 vezes o desvio padrão da corrente residual sem o analito / sensibilidade) foi de 10,0 x 10^{-5} mol L^{-1} e faixa linear até 0,80 x 10^{-3} mol L^{-1}.

Os resultados apresentados até esta seção, apontam que a presença dos FCSNTc desempenham uma função importante no comportamento analítico do biossensor de H_2O_2 e que a presença do líquido iônico $BMMIBF_4$ incorporada ao compósito também esta influenciando nessa melhora da sensibilidade oferecendo menor resistência à transferência de carga. Uma das razões plausíveis pelo melhor desempenho do citocromo c imobilizado em presença do $BMMIBF_4$ esta relacionada a um comportamento diferenciado da biomolécula, onde um número maior de moléculas de citocromo c sejam capazes de manter os seus sítios ativos disponíveis para interagir com os nanotubos de carbono.

Com o intuito de verificar a influência de cada componente no desempenho do biossensor, serão apresentados os estudos eletroquímico e eletrocatalíticos do citocromo c em FCSNTc sem o componente quitosana.

4.4. Atividade eletroquímica e eletrocatalítica do citocromo c em compósitos sem quitosana

Nesta seção serão apresentados os dados obtidos dos estudos realizados da interação do citocromo c com os FCSNTc no compósito sem a presença do componente quitosana. Como o novo compósito consistiu em manter a mesma concentração de citocromo c, a porcentagem relacionada com a solução de quitosana foi substituída por solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0. Deste modo a solução final continha 25% de solução de citocromo c (10 mg mL^{-1}) com 75% de solução PBS. Para o compósito com líquido iônico foi mantido a relação de 3% do $BMMIBF_4$ ao volume total da solução.

Partindo destas soluções os eletrodos foram denominados como FCSNTc/Citc para o feltro mergulhado na solução contendo somente o citocromo c e FCSNTc/Citc/$BMMIBF_4$ para o feltro mergulhado na solução contendo o citocromo c e o líquido iônico $BMMIBF_4$.

Para os estudos eletroquímicos do citocromo c nestes novos eletrodos modificados, foram realizados experimentos por voltametria cíclica com intervalo de potencial de -0,70 V até 0,05 V a 25 mV s^{-1} em solução tampão fosfato pH 7,0, saturada com gás nitrogênio, cujo perfis eletroquímicos estão apresentados a figura 4.17, juntamente com voltamograma cíclico do feltro FCSNTc sem nenhum tipo de compósito.

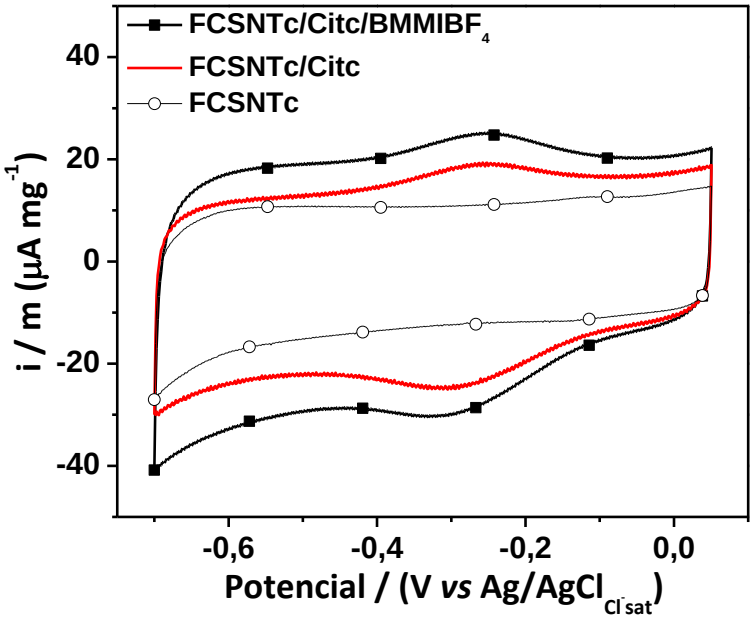


Figura 4.17 *Voltamogramas cíclicos dos eletrodos FCSNTc/Citc/BMMIBF$_4$, FCSNTc/Citc e FCSNTc em solução tampão fosfato PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7,0. Velocidade de varredura de 25 mV s^{-1}.*

De acordo com a figura 4.17 podemos observar que o perfil eletroquímico para o citocromo c é semelhante aos obtidos para os eletrodos onde a quitosana fazia parte integrante de compósito (figura 4.11 pagina 52), devido à presença do par de picos redox relacionados aos processos de oxidação e redução do átomo de ferro do grupo heme.

Para discutir sobre o desempenho eletroquímico do citocromo c nesses novos eletrodos, a tabela 3 a seguir apresenta os valores de Epa, Epc e ∆Ep juntamente com o parâmetro de potencial formal (E$^{o'}$) obtido por (Epa + Epc)/2.

Tabela 3 Parâmetros eletroquímicos do citocromo c imobilizado em diferentes eletrodos

Eletrodo modificado	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	$E^{o'}$(mV)	∆Ep (mV)
FCSNTc/Citc	-0,249	-0,310	-279,5	61
FCSNTc/Citc/BMMIBF$_4$	-0,250	-0,328	-289	78
FCSNTc/Citc/Quit	-0,249	-0,308	-278,5	59
FCSNTc/Citc/Quit/BMMIBF$_4$	-0,260	-0,344	-302	84

Por estes valores vemos que entre os eletrodos que não apresentam a quitosana no método de imobilização (FCSNTc/Citc e FCSNTc/Citc/$BMMIBF_4$) o valor do Epa manteve praticamente o mesmo valor e o potencial de pico catódico , Epc, foi mais negativo em presença do líquido iônico, apresentando valor de ΔEp 17 mV superior. Este comportamento eletroquímico no aumento do ΔEp se repete, quando comparamos com os resultados dos eletrodos que contém a quitosana em presença e ausência de líquido iônico (FCSNTc/Citc/Quit e FCSNTc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$), devido a influencia da carga positiva do cátion imidazólio do $BMMIBF_4$ sobre a superfície negativa dos nanotubos de carbono. Novamente, este aumento de ΔEp, sugere que a carga mais positiva da superfície do eletrodo devido a presença do líquido iônico, acarreta em interações de repulsão com a heme-proteína que também apresenta carga positiva, aumentando a dificuldade da reação de redução na superfície do eletrodo, resultando no deslocamento do Epc para valores mais negativos. [85]

Analisando agora os dados obtidos entre os eletrodos FCSNTc/Citc e FCSNTc/Citc/Quit, ou seja, sem o líquido iônico $BMMIBF_4$, observa-se que seus parâmetros eletroquímicos são praticamente idênticos, indicando que a presença da quitosana não estaria interferindo nos processos redox entre o citocromo c e a superfície do eletrodo, agindo somente como meio de imobilização. Entretanto comparando os dados entre os eletrodos FCSNTc/Citc/$BMMIBF_4$ e FCSNTc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$, foi observado que na presença da quitosana o valor de Epc foi mais negativo e com valor de ΔEp maior,indicando que além da interferência, já discutida sobre a presença do líquido iônico, a quitosana exerce também uma certa influencia formando uma barreira de modo que mais líquido iônico encontra-se em contato com a superfície do eletrodo. Essa mesma conclusão pode ser tirada ao

observar os valores do potencial formal ($E^{o'}$) que relaciona ao fato de quanto menos negativo for este valor, melhor é a reversibilidade dos processos de transferência de elétrons entre a heme-proteína e a superfície do eletrodo. [85] De acordo com os dados de $E^{o'}$ na tabela 3, observa-se somente um aumento do valor deste parâmetro eletroquímico quando temos a presença do líquido iônico, sendo este aumento bem mais pronunciado quando a quitosana esta junto com o $BMMIBF_4$.

Em seguida os eletrodos FCSNTc/Citc/$BMMIBF_4$ e FCSNTc/Citc foram submetidos aos experimentos de voltametria cíclica em diferentes velocidades. Para estes testes foram selecionados as velocidades de varredura 10, 25, 30, 40, 50, 70, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 900, 950 e 1000 mV s^{-1} e a partir dos valores de Epa, Epc, ipa, ipc, foram determinados os parâmetros eletroquímicos como a variação da corrente de pico em função da velocidade de varredura e o estudo da relação entre o potencial de pico com o logaritmo da velocidade de varredura na cinética de transferência de elétrons da biomolécula.

A figura 4.18 (a) apresenta os perfis i/E para ambos os eletrodos. Como pode ser observado os voltamogramas obtidos são bem definidos e com picos persistentes nos dois sentidos de varredura, indicando que a biomolécula permanece conectada a superfície do eletrodo. No entanto, com o aumento da velocidade de varredura foi observado que o espaçamento entre os valores de potencial dos picos também aumentaram.

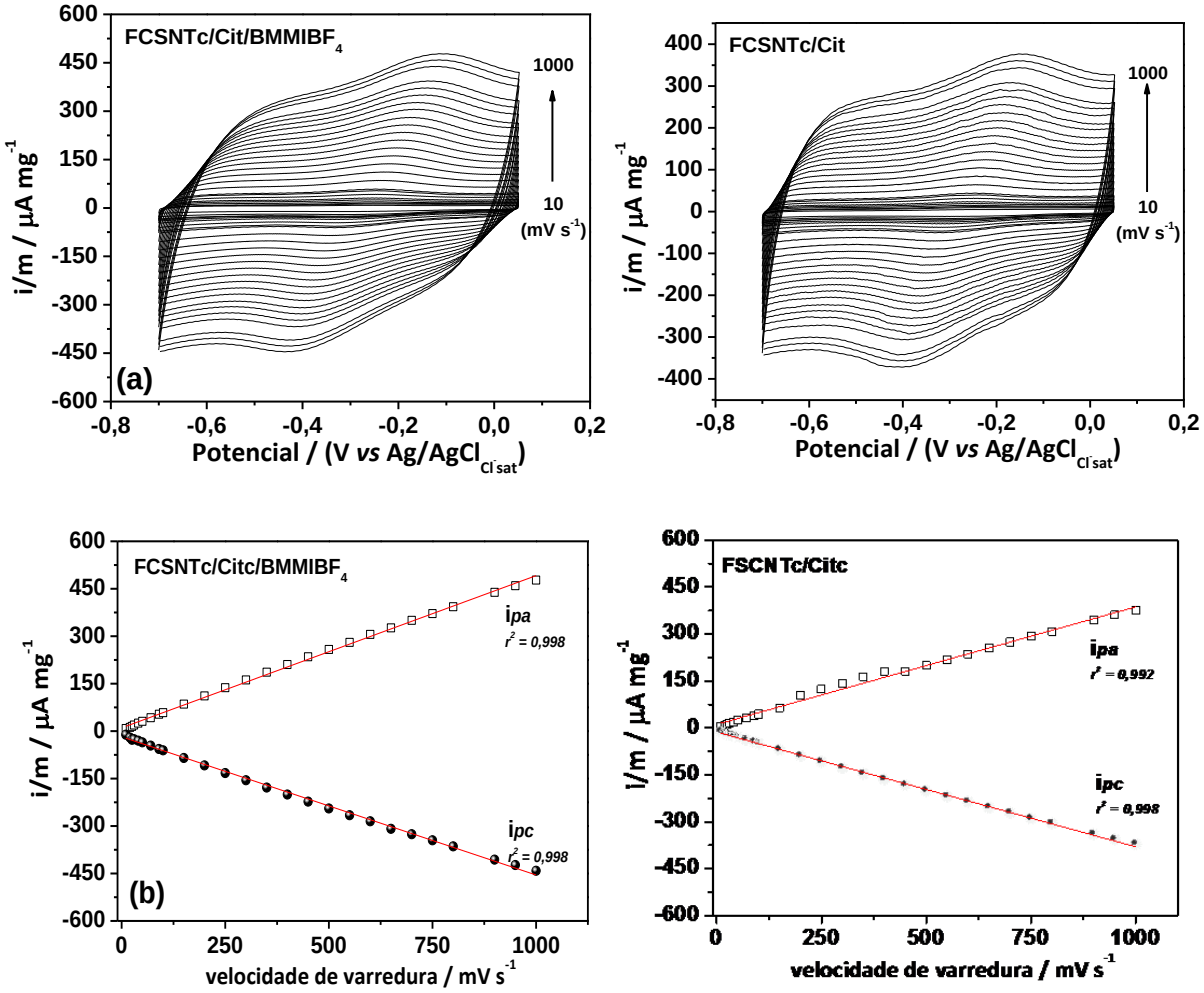


Figura 4.18 *Perfis (a) i/E e (b) i/v dos eletrodos FCSNTc/Citc/BMMIBF$_4$ e FCSNTc/Citc em diferentes velocidades de varredura.*

A figura 4.18 (b) mostra os gráficos da corrente de pico (ipa e ipc) em função da velocidade de varredura obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos. Como pode ser observado, a variação para as correntes de pico anódica e catódica foram lineares com as diferentes velocidades de varredura, indicando assim que o citocromo c imobilizado apresenta um comportamento eletroquímico característico de espécies que estão confinadas na superfície de eletrodos. [3,86]

Devido a este perfil linear obtidos na figura 4.18 (b), foi possível realizar os cálculos propostos por Laviron, que formulou expressões a partir da voltametria linear para o caso de espécies eletroativas confinadas na superfície de eletrodos,

para obter informações de parâmetros cinéticos-eletroquímicos através da construção de gráficos que relacionam a variação do potencial de pico (Ep) com o potencial forma ($E^{o'}$) conhecido como $\Delta E = Ep - E^{o'}$, em função do logaritmo da velocidade de varredura (log v). [87,88] Segundo a teoria o coeficiente de transferência de elétrons (α), o número de elétrons envolvido no processo redox (n) e a constante de velocidade heterogênea de transferência de elétrons (ks) podem ser determinados através do emprego de fórmulas, conforme indicado nas equações I e II a seguir, quando os valores de ΔE obtidos pelos voltamogramas são superiores a 200/n mV.

$$\frac{k_a}{k_c} = \frac{\frac{2{,}3\ RT}{(1-\alpha)nF}}{\frac{2{,}3\ R\ T}{\alpha nF}} = \frac{\alpha}{1-\alpha} \qquad (Eq.I)$$

$$k_s = \frac{nF\alpha v_c}{RT} = \frac{(1-\alpha)nFv_a}{RT} \qquad (Eq.II)$$

Das equações I e II k_a e k_c são as inclinações obtidas das retas do gráfico de $Ep-E^{o'}$ vs log (v) para ΔE superior a 200/n mV , R é a constante dos gases, T é a temperatura em Kelvin, F é a constante de Faraday e ν_a e ν_c representam as velocidades de varredura no intercepto das linhas retas dos processos anódicos e catódico, respectivamente, obtidos através da extrapolação quando o valor de $y = Ep-E^{o'}$ (ou ΔE) é igual a zero. [8,87,88]

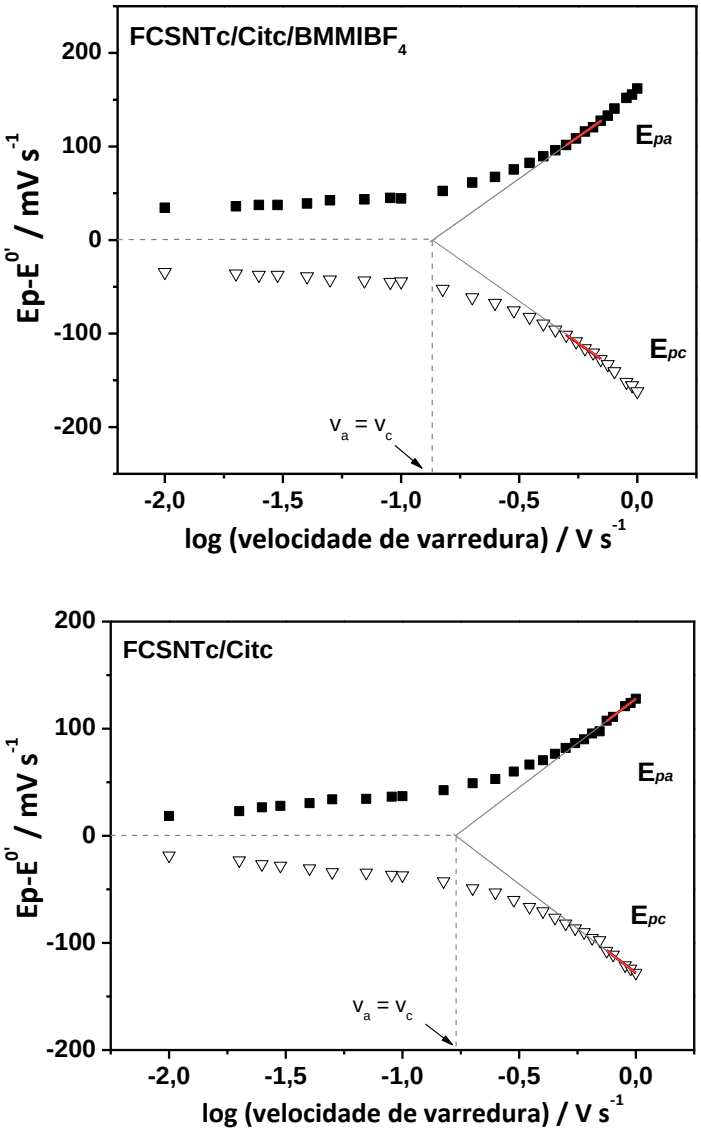


Figura 4.19 *Perfil Ep-E$^{o'}$/ log v dos eletrodos FCSNTc/Citc/BMMIBF$_4$ e FCSNTc/Citc*

Analisando os gráficos de Ep-E$^{o'}$/log v da figura 4.19, pode ser visto para ambos os eletrodos, que em velocidades menores o valor de ΔE = (Ep-E$^{o'}$) é praticamente constante e independente do logaritmo da velocidade de varredura e na medida em que a velocidade de varredura aumenta, a separação dos picos começa a aumentar, e os valores de ΔE tornam-se proporcionais ao logaritmo da velocidade de varredura.

Esses fenômenos foram previstos por Laviron e sugerem a ocorrência de um processo de cinética de transferência eletrônica rápida em velocidades menores e em altas velocidades esteja ocorrendo uma limitação deste processo ocasionando a separação dos picos.

Para o eletrodo FCSNTc/Citc/$BMMIBF_4$ foi observado que os valores de ΔE foram superiores a 200/n mV a partir da velocidade de varredura de 500 mV s^{-1} e para o eletrodo FCSNTc/Citc a partir de 750 V s^{-1}. A partir das inclinações de Epa e Epc com ΔE maior que superiores a 200/n mV foram determinados os valores de ka e kc respectivamente e v_a e v_c para ΔE = 0. Utilizando as equações I e II os parâmetros ks, α e número de elétrons (n) foram encontrados, cujos valores foram reunidos da tabela 4.

Tabela 4. *Parametros cinéticos dos eletrodos de FCSNTc modificados.*

Eletrodo modificado	$Ks^{(1)}$ (s^{-1})	ka	kc	$\alpha^{(2)}$	$n^{(2)}$	ν_a e ν_c (V s^{-1})
FCSNTc/Citc	2,41	167,48	-167,48	0,5	0,7	0,172
FCSNTc/Citc/$BMMIBF_4$	1,80	170,36	-170,36	0,5	0,7	0,131

(1)encontrado a partir da equação II; (2)encontrado a partir da equação I

De acordo com a teoria, valores altos de ks significam que a transferência de elétrons entre o material imobilizado e a superfície do eletrodo é promovida mais facilmente. Partindo dos resultados obtidos observa-se que entre os eletrodos modificados o valor de ks foi ligeiramente maior para o FCSNTc/Citc, indicando que para este eletrodo a transferência de elétrons foi um pouco mais privilegiada.

Para verificar essa afirmação, foi realizada uma comparação entre os ks encontrados com outros valores de trabalhos na literatura. Pela tabela 5, os dados de ks apresentados variam de 0,75 a 29 s^{-1} e independente do método de imobilização ou do substrato utilizado, todos os biossensores foram considerados de

bom desempenho. Analisando os dados na tabela 5, observa-se que os valores de ks para o citocromo c nos FCSNTc, foram maiores que alguns biossensores, e portanto podendo ser considerados eficientes em promover a transferência de elétrons na superfície do eletrodo.

Tabela 5. *Comparação dos valores de Ks para o citocromo c imobilizado em diferentes eletrodos, em solução tampão fosfato 0,1M pH 7,0*

Eletrodo	k_s (s^{-1})	ref
Au/Citc/poli(anilinasulfonada)	0,47	[89]
CV/Citc/Quit/AuNP/MWCNT	0,97	[82]
CV/Citc/HidrogelAgarose/LI	1,26	[90]
Au/Citc/poli(tertiofeno-3carboxilico)	1,5	[91]
CV/Citc/MWCNT	4,0	[10]
CV/Citc/Quit/MWCNT/LI	4,8	[46]
ITO/Citc/silicamesoporosa	29,2	[92]
FCSNTc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$	1,8	-
FCSNTc/Citc/Quit	2,4	-

PC = polímeros condutores; AuNP = nanopartículas de ouro; MWCNT = nanotubos de carbono multiwalls; LI = líquidos iônicos

A principal razão para estes feltros apresentarem um bom desempenho cinético esta relacionada ao fato dos nanotubos de carbono apresentarem menor resistência a transferência de elétrons. Para verificar essa afirmação serão utilizados os dados obtidos na figura 4.20 que apresenta o perfil eletroquímico do par $Fe(CN)_6^{4}/Fe(CN)_6^{-3}$ nos eletrodos de FSCNTc e de um feltro de microfibras de carbono sem o recobrimento dos nanotubos de carbono (Fc).

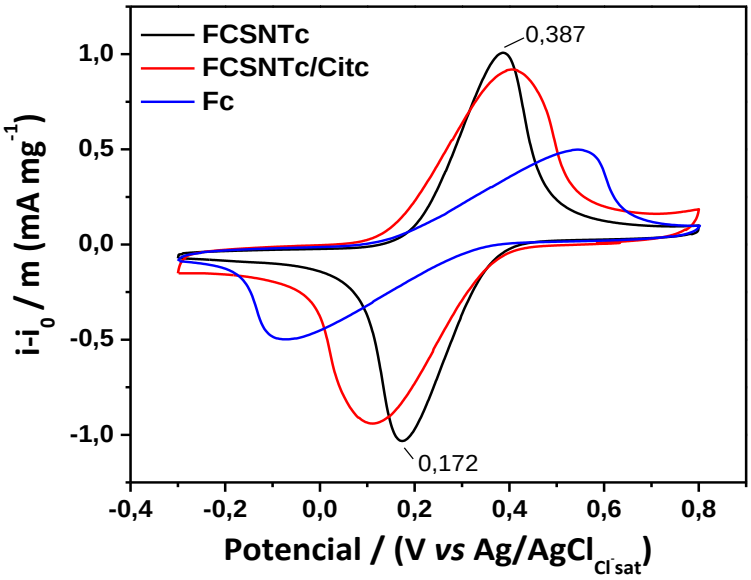


Figura 4.20 *Voltamogramas cíclicos dos eletrodos FCSNTc, FCSNTc/Citc e Fc em solução contendo $K_3Fe(CN)_6$ 0,01 mol L^{-1} + $K_4Fe(CN)_6$ mol L^{-1} + KCl 0,10 mol L^{-1}.*

Pelos voltamogramas da figura 4.20, podemos destacar como aspecto mais importante a diferença encontrada no valor de ΔEp (Epa – Epc) entre os eletrodos de feltro de microfibra de carbono. Para o feltro sem recobrimento de nanotubos (Fc), o valor de ΔEp foi de 459 mV enquanto que para o FCSNTc o valor encontrado foi 215 mV. Esta diminuição de 244 mV entre os valores encontrados mostra o favorecimento da reversibilidade da reação eletroquímica do par $Fe(CN)_6^{-4}$/ $Fe(CN)_6^{-3}$ devido a uma menor resistência na transferência de elétrons na superfície do eletrodo que contem os nanotubos de carbono. Além disso, o voltamograma do FCSNTc apresentou um aumento nos valores de Ipa e Ipc em função de uma maior área eletroativa disponível para reação eletroquímica. O voltamograma do eletrodo FCSNTc/Citc mostra que mesmo contendo um biomaterial imobilizado, os nanotubos de carbono ainda promovem a reação do eletroquímica do par $Fe(CN)_6^{-4}$/ $Fe(CN)_6^{-3}$.

Tendo em vista o desempenho eletroquímico do citocromo c nestes, foram realizados experimentos de detecção de peróxido de hidrogênio.

Para verificar a eficiência eletrocatalítica destes eletrodos, os valores das correntes de redução do H_2O_2 foram monitorados pela técnica de cronoamperometria, através da adição de alíquotas de 10 µL de uma solução 0,10 mol L^{-1} do analito em 5 mL do eletrólito de solução tampão fosfato PBS pH 7,0, saturado de gás nitrogênio, garantindo um incremente de 0,20 mmol L^{-1} na concentração para a detecção. O potencial aplicado para realizar a detecção foi de -0,30 V, pois ao realizar experimentos de voltametria cíclica dos eletrodos FCSNTc/Citc e FCSNTc/Citc/$BMMIBF_4$ em solução tampão PBS com diferentes concentrações de H_2O_2, foi observado que neste potencial a corrente catódica aumentava com o aumento da concentração do analito, indicando que o processo de redução ocorria neste valor de potencial. Partindo deste dado, foram iniciados os testes amperométricos, aplicando-se inicialmente o potencial de -0,30 V por um período de 40 minutos, antes de cada experimento, para manter estável a corrente de fundo. A figura 4.21 a seguir apresenta os resultados obtidos.

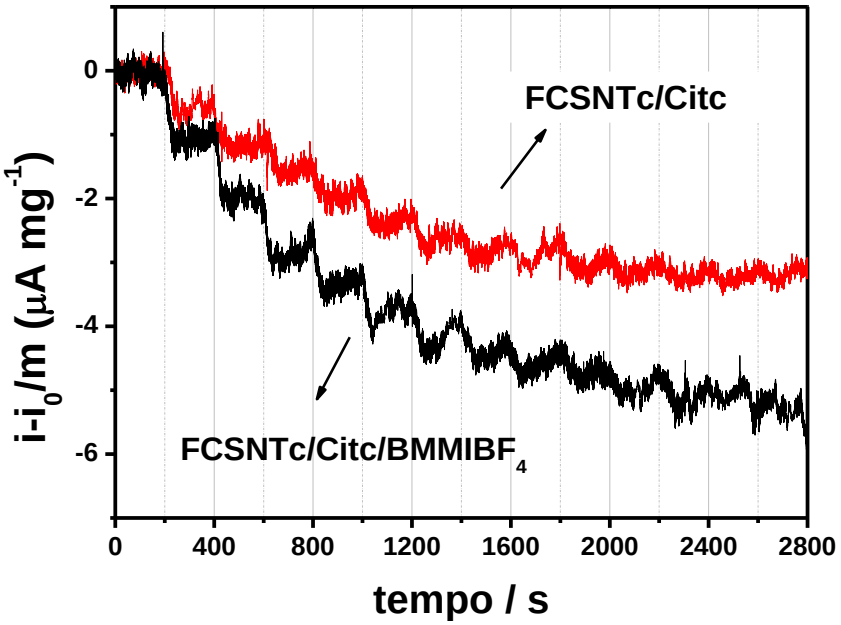


Figura 4.21 *Cronoamperogramas da detecção de H_2O_2 dos eletrodos FCSNTc/Citc e FCSNTc/Citc/$BMMIBF_4$ polarizados a -0,30 V perante aos incrementos de 0,20 mmol L^{-1} na concentração do analito em solução tampão fosfato PBS pH 7,0.*

De acordo com a figura 4.22 observa-se que a cada incremento de 0,20 mmol L^{-1} de H_2O_2, acarreta-se em um salto da corrente catódica devido a reação de redução do analito na superfície do eletrodo, seguido da formação de um patamar constante da corrente. Observa-se também que para ambos os eletrodos o sinal de corrente catódico aumentava com as sucessivas adições de H_2O_2 e para valores maiores de concentração o salto de corrente era menos pronunciado, onde a corrente tendia a formar um patamar mais estável devido a uma saturação do sistema.

Para verificar a eficiência destes novos sensores na detecção de H_2O_2, foram calculados os valores de sensibilidade. Por motivos de comparação, a figura 4.22, apresenta as curvas analíticas de todos os eletrodos com FCSNTc utilizados, juntamente com os respectivos valores de sensibilidade.

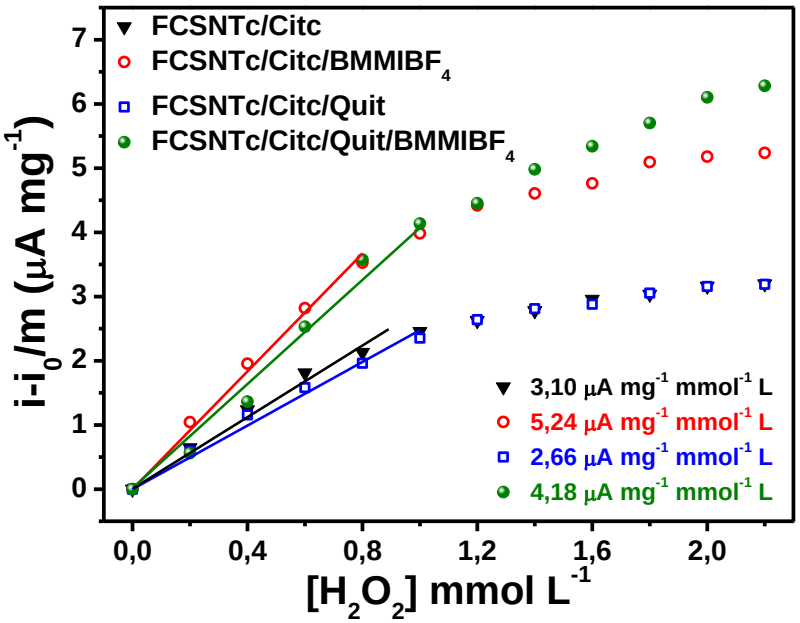


Figura 4.22 *curvas analíticas dos eletrodos modificados das detecções de H_2O_2 perante os incrementos de 0,20 mmol L^{-1} na concentração do analito em solução tampão fosfato PBS pH 7,0 a -0,30 V.*

Pelas curvas analíticas da figura 4.22 obteve-se a sensibilidade de 5,24 µA mg^{-1} $mmol^{-1}$ L para o eletrodo FCSNTc/Citc/$BMMIBF_4$, com coeficiente de correlação de 0,992, limite detecção (3 vezes o desvio padrão da corrente residual sem o analito / sensibilidade) de 7,10 x 10^{-5} mol L^{-1} e faixa linear até 0,80 x 10^{-3} mol L^{-1} e para o eletrodo FCSNTc/Citc obteve-se 3,10 µA mg^{-1} $mmol^{-1}$ L de sensibilidade de detecção, com coeficiente de correlação de 0,987, limite detecção (3 vezes o desvio padrão da corrente residual sem o analito / sensibilidade) foi de 10,17 x 10^{-5} mol L^{-1} e faixa linear até 0,80 x 10^{-3} mol L^{-1}. Deste modo, constatou-se novamente que em presença do líquido iônico a resposta eletrocatalítica do biossensor apresentou maior sensibilidade.

Para discutir a influência dos compostos utilizados na imobilização do citocromo c sobre os eletrodos FCSNTc, a tabela 6 apresenta os resultados dos parâmetros obtidos de $E^{0'}$, ΔEp, sensibilidade e limite de detecção. De modo geral, observa-se que os eletrodos FCSNTc/Citc/$BMMIBF_4$ e FCSNTc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$ apresentaram parâmetros eletroquímicos e eletrocatalíticos aproximados e que o mesmo comportamento foi obtido quando se compara os eletrodos FCSNTc/Citc e FCSNTc/Citc/Quit.

Tabela 6. Parâmetros eletroquímicos e eletrocatalíticos do citocromo c imobilizado em diferentes eletrodos

Eletrodo modificado	$E^{o'}$ (mV)	ΔEp (mV)	Sensibilidade µA mg^{-1} $mmol^{-1}$ L	Limite de detecção mol L^{-1}
FCSNTc/Citc	-279,5	61	3,10	10,1 x 10^{-5}
FCSNTc/Citc/Quit	-278,5	59	2,66	10,0 x 10^{-5}
FCSNTc/Citc/$BMMIBF_4$	-289	78	5,24	7,1 x 10^{-5}
FCSNTc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$	-302	84	4,18	5,5 x 10^{-5}

Partindo destes dados podemos observar que a presença da quitosana nos eletrodos modificados não interfere na eletroatividade do citocromo c, pois

comparando os resultados obtidos entre os eletrodos separados nas duas classes na tabela 6, vemos que os eletrodos com quitosana apresentaram parâmetros com valores próximos aos dos eletrodos sem, indicando que nestes casos a função de imobilizar a heme-proteína na superfície do eletrodo não esteja causando efeito significativo. Ao comparar os eletrodos que contém o líquido iônico $BMMIBF_4$, foi observado que os seus parâmetros foram superiores, indicando que a presença do material totalmente iônico esteja proporcionando maior influência quanto ao comportamento eletroquímico do citocromo c. Ou seja, a presença do líquido iônico modifica o microambiente ao redor da heme-proteína favorecendo a acessibilidade de uma quantidade maior de centros ativos aos nanotubos de carbono da superfície do eletrodo, resultando em processos eletroquímicos com melhor desempenho.

Comparando os valores de sensibilidade entre os eletrodos de FCSNTc, observa-se que em presença do líquido iônico os sensores foram mais eficientes, e que a presença da quitosana resultou numa diminuição no desempenho analítico, pois estes apresentaram sensibilidades menores frente a mesma quantidade de analito.

No entanto, estes valores de sensibilidade podem ser somente comparados entre os eletrodos FCSNTc, pois a unidade de corrente obtidas foi padronizada em relação a massa do feltro. Ao considerar a área tridimensional geométrica dos feltros, em cm^{-2}, as sensibilidades dos eletrodos foram superiores quando comparados com os resultados de biossensores que utilizam eletrodos bidimensionais. A tabela 7 a seguir apresenta os valores da sensibilidade comparando com outros trabalhos da literatura.

Tabela 7 Parâmetros eletrocatalíticos da sensibilidade de biossensores de citocromo c na detecção de H_2O_2

Eletrodo modificado	Sensibilidade $\mu A\ cm^{-2}\ mmol^{-1}\ L$	Ref
FCSNTc/Citc	27,97	-
FCSNTc/Citc/$BMMIBF_4$	70,24	-
FCSNTc/Citc/Quit	22,36	-
FCSNTc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$	64,95	-
CV/Citc/Organohidrogel	0,11	[93]
Au/Cit/PASA	0,39	[89]
CV/Citc/MWCNT/LI	7,45	[94]

AuNP = nanopartículas de ouro; MWCNT = nanotubos de carbono multiwalls; LI = líquidos iônicos; PASA = poli(anilina sulfonada)

Este resultado superior nos valores da sensibilidade estão relacionados ao fato da grande área superficial dos FCSNTc, devido aos nanotubos de carbono, garantindo que as dimensões nanométricas destes fios condutores, interagem mais facilmente com as moléculas de citocromo c.

Outro parâmetro cinético estudado foi a obtenção da constante cinética aparente de Michaelis-Menten (K_m^{app}) que fornece informações sobre a afinidade da biomolécula com o analito através da cinética enzimática na superfície do eletrodo.

Para determinar o valor de K_m^{app} foi utilizada a expressão de Lineweaver-Burk, representada pela equação III, onde I_{ss} é a corrente de estado estacionário

$$\frac{1}{Iss} = \frac{1}{Imax} + \frac{K_m^{app}}{Imax\ C} \qquad (Eq.III)$$

após a adição do analito, I_{max} é a corrente máxima medida nas condições saturadas do analito e C é a concentração do analito. Este parâmetro pode ser obtido, pois durante as detecções amperométricas a corrente de redução do analito tende a formar um patamar a concentrações suficientemente altas devido a uma saturação do sistema.

Da equação III, constrói-se um gráfico de $1/I_{ss}$ em função de 1/C e determina-se o coeficiente angular somente para a região onde o valor da corrente atinge um patamar devido as altas concentrações do analito. A tabela 8 apresenta os valores obtidos de K_m^{app} para os eletrodos de FCSNTc modificados.

Tabela 8 Valores de K_m^{app} encontrado para os diferentes eletrodos de FCSNTc

Eletrodo modificado	K_m^{app} (mmol L^{-1})
FCSNTc/Citc	0,47
FCSNTc/Citc/$BMMIBF_4$	0,43
FCSNTc/Citc/Quit	0,38
FCSNTc/Citc/Quit/$BMMIBF_4$	0,88

De acordo com a teoria proposta por Michaelis-Menten sobre a constante aparente, quanto mais baixo for o valor de K_m^{app} maior é a afinidade entre a biomolécula e o analito resultando em uma cinética enzimática rápida na superfície do eletrodo. [95] Como para todos os eletrodo de FCSNTc os valores encontrados foram numericamente baixos, sugere-se que nestes casos o citocromo c apresenta uma boa afinidade para realizar a catálise durante a detecção do H_2O_2. Para comprovar essa afirmação estes resultados obtidos foram comparados com outros trabalhos da literatura que utilizam o citocromo c em reações eletrocatalíticas de H_2O_2 e caracterizados como biossensores de elevada afinidade com o analito devido a obtenção de K_m^{app} que variavam entre 0,40 e 1,5 mmol L^{-1}. [10,46,82,92] Como para os biossensores formados com FCSNTc apresentaram K_m^{app} menores que 1, conclui-se que eles também podem ser considerados de alta eficiência frente a redução do H_2O_2.

Embora tenha sido observado boa resposta eletroquímica do citocromo c nestes eletrodos, vale destacar a relevância dos dados obtidos para o eletrodo FCSNTc/Citc, pois a sua obtenção resultou na formação de um biossensor de

terceira geração já que neste caso nenhum outro material foi utilizado para imobilizar a biomolécula ou mediar a reação de redução do analito.

4.5. O efeito do pH na eletroatividade do citocromo c

Como a estrutura conformacional de heme-proteínas é dependente do valor do pH e isso pode mudar seu o comportamento redox, foi realizado um experimento de voltametria cíclica dos eletrodos FCSNTc/Citc e FCSNTc/Citc/BMMIBF4 em diferentes valores de pH da solução tampão fosfato PBS. Ao realizar os testes em solução PBS com pH 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0, foi observado que o citocromo se manteve eletroativo, devido a presença dos picos dos picos anódico e catódico em todas as soluções utilizadas. No entanto, os valores de Epa e Epc da biomolécula tiveram um deslocamento para potenciais mais negativos com o aumento do valor do pH, sendo representado pela figura 4.23 abaixo que apresenta a relação entre os valores encontrados para os Epa e Epc dos eletrodos modificados com os diferentes valores do pH da solução tampão fosfato PBS.

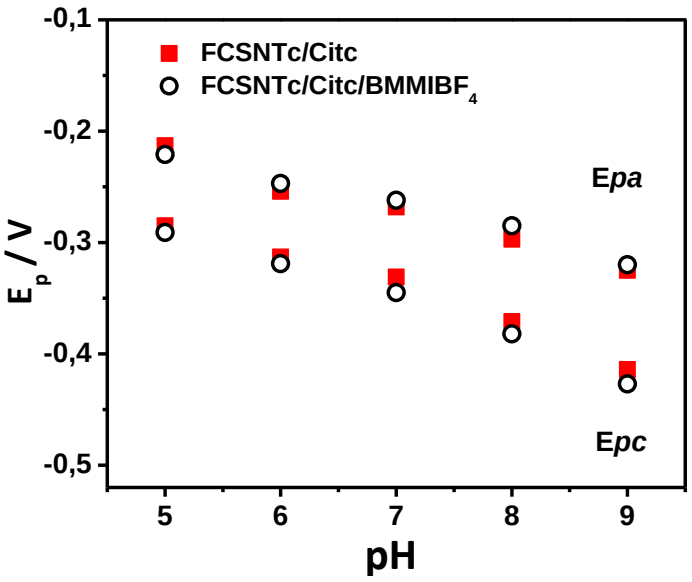


Figura 4.23 Variação do potencial de pico Ep em função do valor do pH da solução tampão fosfato PBS.

Este comportamento é esperado quando se trata da eletroquímica de heme-proteínas, [74,94,96-99] pois o mecanismo redox acaba sendo influenciado pela desprotonação dos aminoácidos que circundam o grupo heme ou por mudanças na quantidade de moléculas de água que solvatam o átomo de ferro central que dificultam a transferência de elétrons. Apesar deste deslocamento nos valores de Ep, este estudo demonstrou que mesmo variando-se o pH da solução o processo de imobilização do citocromo c na superfície do eletrodo manteve eficiente, pois qualquer alteração em sua estrutura pode ocasionar a perda de interação da heme-proteína coma superfície do eletrodo. [94,96]

4.6. Caracterização espectroscópica dos diferentes compósitos de citocromo c

A propriedade redox do citocromo c está relacionada com o átomo de ferro central do grupo heme, que se encontra hexa-coordenado no seu estado nativo, apresentando um quinto e sexto ligante, resultantes da ligação fora do plano do grupo heme, com um átomo de nitrogênio do aminoácido Histidina e com um átomo de enxofre de uma Metiodina, respectivamente. Estas ligações são sensíveis a diversos fatores externos e qualquer alteração ocasionada, pode levar a modificação de seu comportamento funcional como heme-proteína. [100-103]

Uma das formas de estudar a conformação de estruturas de biomoléculas em solventes esta na utilização de técnicas espectroscópicas como o UV-Visivel (UV-Vis) e o dicroísmo circular pois estas são sensíveis às mudanças nas cadeias polipeptídicas, caso o meio onde a proteína se encontra não seja favorável. [5,102-105]

O espectro de absorção de uma heme-proteína obtido a partir destas duas técnicas fornecem informações sobre duas transições eletrônicas principais, sendo uma denominada banda *Soret*, que esta intimamente relacionada com as ligações referentes ao estado de oxidação do átomo de ferro do grupo heme, e uma outra denominada banda Q, que esta relacionada com a sequencia dos aminoácidos. Deste modo, as bandas nos espectros obtidos nestas regiões, estão relacionadas com a conformação da estrutura secundária da biomolécula, e a sua posição e intensidade, fornecendo informações sobre a integridade do material em estudo.

Estas duas técnicas são complementares e, geralmente a banda *Soret* é mais intensa do que a banda Q nos espectros de UV-Vis e o pelo dicroísmo circular se obtém mais informações sobre as bandas Q. [102]

De acordo com o estado de oxidação do átomo de ferro do grupo heminico o citocromo c apresenta comprimento de ligações diferentes. Consequentemente, este diferente estado de oxidação ocasiona uma modificação na sua estrutura, resultando em diferentes espectros de absorção no UV-Vis e Dicroísmo circular. O citocromo c no seu estado nativo, o átomo de ferro se encontra oxidado (Fe^{+3}) e apresenta duas bandas características no UV-Vis, sendo uma bem intensa em 409 nm (banda *Soret*) e outra menos intensa em 530 nm (banda Q). Para o citocromo com o átomo de ferro reduzido (Fe^{+2}) são características três bandas, uma em 414 nm (banda *Soret*) e duas na banda Q em 520 e 550nm. [83,106]

Como o citocromo c está misturado no compósito contendo quitosana e líquido iônico, surgiu o interesse em verificar se estes componentes promovem alguma alteração na biomolécula. Para realizar o estudo por UV-Vis, foram preparadas as soluções de citocromo c (Cit c), de citocromo c com solução de

quitosana (25/75% v/v) (Citc/Quit) de 3% de liquido iônico e uma solução de citocromo c e PBS (25/75% v/v) (Citc/BMMIBF$_4$) e de 3% de liquido iônico e uma solução de citocromo c e quitosana (25/75% v/v) (Citc/Quit/BMMIBF$_4$). Depois de preparar as soluções, elas foram colocadas em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico registrando os espectros de absorbância de 300 a 700 nm, com demonstrado na figura 4.24.

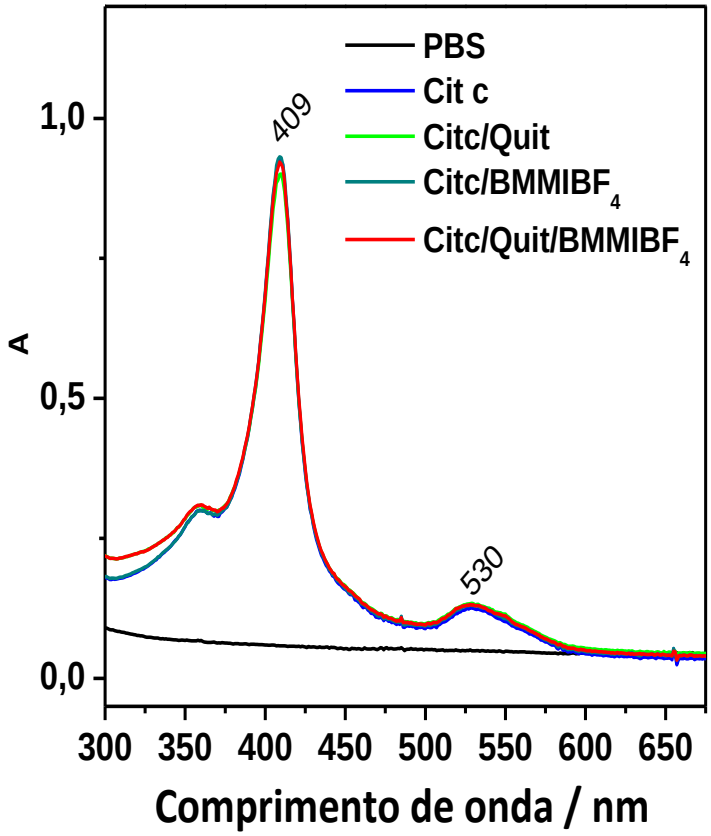


Figura 4.24. *Espectro UV-Vis da solução de PBS pH 7, BMMIBF$_4$ puro, solução de citocromo c e da solução de citocromo c com o líquido iônico.*

Ao analisar as bandas no espectro de UV-Vis da figura 4.24, observa-se para todas as soluções preparadas, a presença da banda *Soret* intensa em 409 nm e da banda Q em 530 nm características do citocromo c puro, no seu estado natural com o átomo de ferro oxidado (Fe^{3+}). Ou seja, como não foi observado nenhum deslocamento dos valores destas bandas, vimos que na presença da quitosana e do

$BMMIBF_4$ o novo microambiente proporcionado ao redor da heme-proteína não modifica seu estado de oxidação mantendo a sua integridade e estrutura conformacional.

Além destas bandas mencionadas, a região em 695 nm do espectro de UV-Vis do citocromo c, também nos fornece informações importantes, pois está relacionada com a ligação axial do sexto ligante do grupo heme. [107-110] Esta banda é característica da ligação entre átomo de ferro do grupo heme com o átomo de enxofre do resíduo da metiodina na posição 80 (Met^{80}) e a ausência desta banda no espectro do citocromo c caracteriza a ruptura desta ligação e a possível desnaturação da biomolécula. [108,110]

Como a ruptura desta ligação pode estar relacionada com o solvente em que a citocromo c se encontra, foi realizado um novo experimento de UV-Vis na região entre 660 e 750 nm, mudando a concentração do líquido iônico. Pois desta maneira, poderíamos verificar se o $BMMIBF_4$ estaria interferindo neste tipo de ligação.

Neste momento foram realizados novos experimentos de UV-Vis na região de 660 nm ate 750 nm, para verificarmos a banda em 695nm, utilizando uma solução de citocromo c, uma solução de 3% de liquido iônico e uma solução de citocromo c e quitosana (25/75% v/v) (Citc/Quit/$BMMIBF_4$) e uma nova solução contendo uma quantidade excessiva de 10% de liquido iônico e uma solução de citocromo c e quitosana (25/75% v/v). A figura 4.25 a seguir apresenta os resultados do espectro de UV-Vis, juntamente com uma representação esquemática do grupo heme hexa coordenado com as ligações axiais com o quinto e sexto ligante com a histidina 18 (His^{18}) e Metiodina 80 (Met^{80}) respectivamente, e do esquema da ruptura da ligação com a Met^{80}.

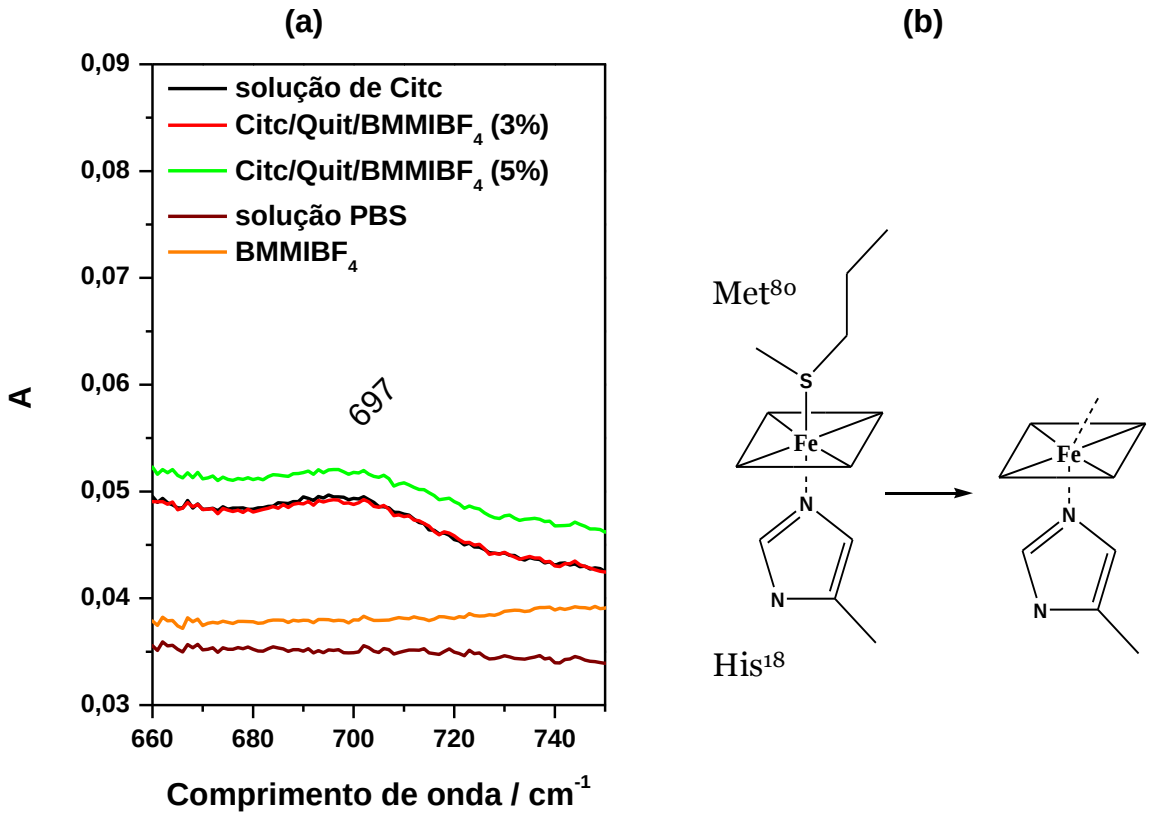


Figura 4.25 (a) Espectro UV-Vis da solução de citocromo c com diferentes quantidades de líquido iônico e (b) esquema de ruptura da ligação axial do átomo de Fe do grupo heme com o átomo de S da Met^{80}

Como pode ser observado na figura 4.25 (a), foi obtida uma banda em 697 nm, sugerindo que a ligação do sexto ligante entre os átomos de ferro com o enxofre da Met^{80} não foi perdida na presença do líquido iônico $BMMIBF_4$. Em comparação foram colocados os espectros de absorção da solução tampão fosfato PBS pH 7,0 e do $BMMIBF_4$.

Este experimento foi realizado, pois dados da literatura comentam que a presença de componentes indesejáveis para o citocromo c, como por exemplo, a adição de solventes orgânicos, glicerol e outros líquidos iônicos, podem facilmente romper esta ligação e atrapalhar em sua função redox, como representada na figura 4.25 (b). [83,108,110,111] Como a banda não foi perdida, os resultados mostram que o

compósito formado não é agressivo ao microambiente do sitio ativo do citocromo c, garantindo a sua integridade conformacional.

Outra técnica utilizada para estudar a estrutura secundária de biomoléculas foi a espectroscopia de dicroísmo circular, que nos fornece resultados sobre a interação da luz circularmente polarizada com os aminoácidos da sequencia dos peptídicos. Para o citocromo c, dependendo do estado de oxidação do átomo de ferro (Fe^{+2} ou Fe^{+3}) o espectro de dicroísmo circular apresenta bandas características (tabela 9) e de acordo com o ambiente onde ele está, estas bandas também podem sofrer modificações.

Tabela 9 Bandas de dicroísmo circular características dos diferentes estados de oxidação do citocromo c [101,110]

Citocromo c	Grupo Heme	Sequência dos aminoácidos
Fe^{2+}	418 nm positivo	220 nm e 220 nm negativo
Fe^{3+}	400 nm positivo e 418 nm negativo	210 nm e 220 nm negativo

Foram utilizadas as mesmas soluções preparadas de citocromo c nos experimentos de UV-Vis, e de acordo com as limitações do equipamento, todas as soluções tiveram que ser diluídas pelo menos 20 vezes, e a medida foi realizada com intervalo de comprimento de onda de 200nm a 600nm, utilizando uma cela de quartzo especifica para a medida.

Para verificar possíveis modificações na estrutura secundária do citocromo c, foi realizado o experimento de dicroísmo circular inicialmente na região de 200 a 300 nm de todas as soluções para obtermos informações a respeitos da disposição das α-hélices que configuram a estrutura da biomolécula, cujos espectros registrados estão demonstrado na figura 4.26.

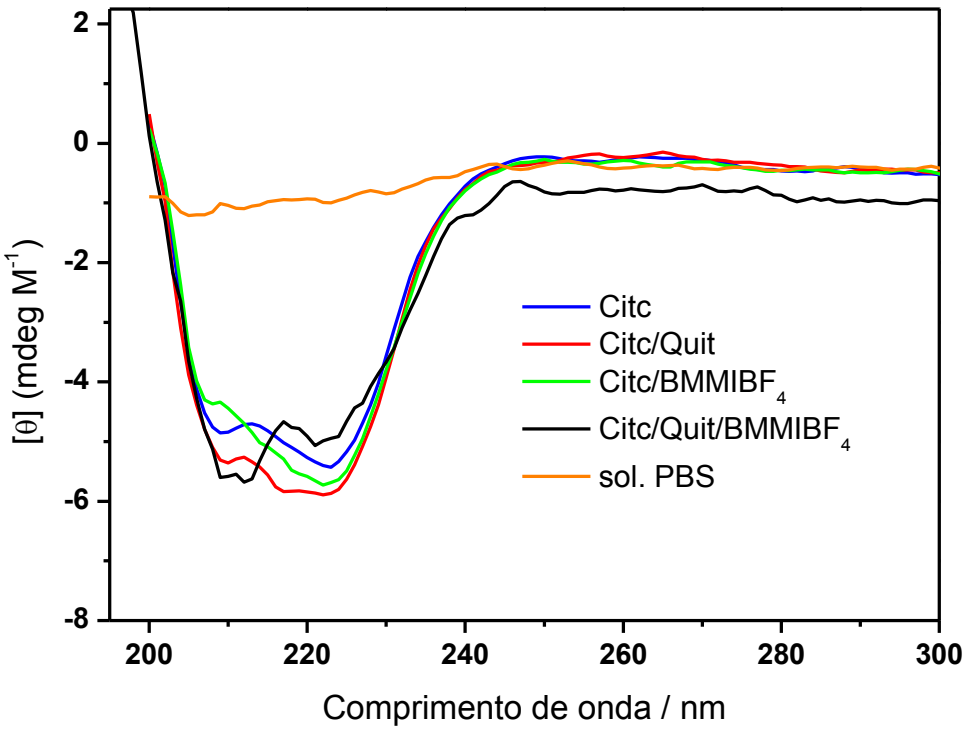


Figura 4.26 *Espectros de dicroísmo circular de diferentes soluções com o citocromo*

De acordo com o espectro da figura 4.26, podemos observar, que para a solução de citocromo c (Citc) tem-se a presença de duas bandas negativas em 208nm e 221nm, sendo elas características para citocromo c Fe^{+3} e ao analisar os espectros das soluções do citocromo c com quitosana (Citc/Quit), do citrocromo com $BMMIBF_4$ (Citc/$BMMIBF_4$) e do citocromo c com a quitosana e o $BMMIBF_4$ (Citc/Quit/$BMMIBF_4$), foram observados as duas bandas nas mesmas posições. Isto demonstra que os componentes presentes no compósito não modificam a sequencia dos aminoácidos que circundam o sitio ativo, pois dados da literatura mostram que a mudanças na estrutura secundaria do citocromo ocasionam o desaparecimento dessas bandas. [83]

Entretanto, observa-se nesta mesma figura que a intensidade das bandas para as soluções que contem o líquido iônico possuem uma proporção diferente, indicando uma leve modificação na distribuição das α-hélices de tal maneira que

mantem o grupo heme mais acessível e facilita o processo de transferência de elétrons. Fato que justificaria a melhora da resposta eletroquímica do citocromo c na presença do material iônico. No entanto, não foi possível realizar os cálculos quantitativos da porcentagem das α-hélices pois os íons do cátion imidazolio interferem na intensidade obtida pelo espectro, obtendo-se informações qualitativas sobre a estrutura secundária do citocromo c nestas soluções com líquido iônico.

Ao estudar a região de 300 a 500nm, obtemos informações a respeito da banda *Soret*, relacionada ao átomo de ferro do grupo heme do citocromo c. Para o estado de oxidação Fe^{+3} são características as bandas 400nm positiva e 418nm negativa e para o Fe^{+2} somente uma banda positiva em 418nm. Nesta região do espectro do dicroísmo circular foram utilizadas as soluções das medidas realizadas no UV-Vis para a banda em 697nm, que contém o citocromo c com quitosana e $BMMIBF_4$ e as misturas de citocromo c com o liquido iônico a 5%.

Ao obter o espectro da Figura 4.27 (a) das soluções de citocromo c, foi observado que as bandas estão na mesma posição do espectro obtido da solução de citocromo c com PBS, com uma banda positiva em 402nm e uma negativa em 417nm.

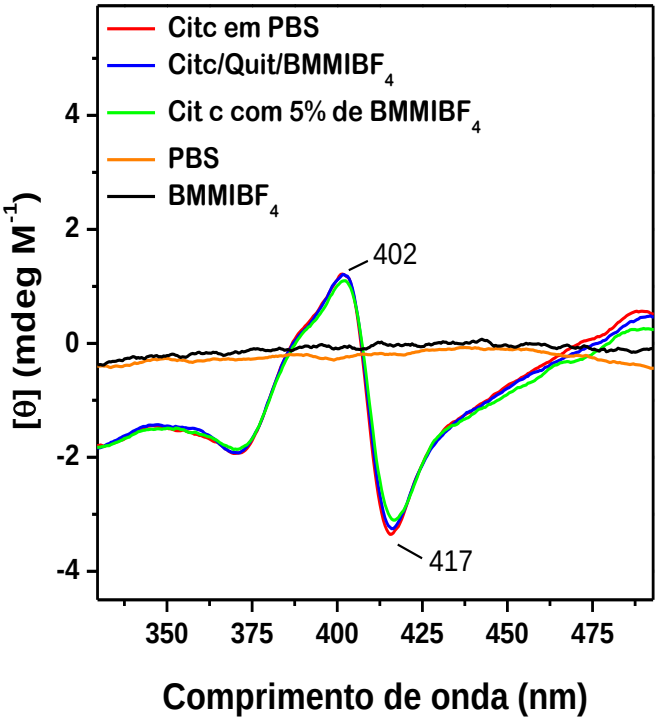


Figura 4.27(a) *Espectros de dicroísmo circular de soluções de citocromo c em PBS com diferentes concentrações de BMMIBF$_4$*

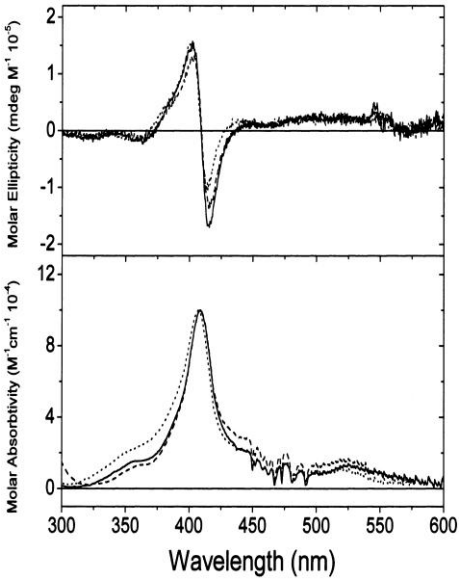


Figura 4.27(b) *Espectro DC (cima e UV-Vis (baixo) característico do citocromo c Fe^{+3} em PBS.*[101]

Estas bandas são características do citocromo c Fe^{+3} e até para a concentração de 5% de BMMIBF$_4$ utilizado, as bandas permaneceram na mesma região, indicando que a presença dos íons do liquido iônico não interferem no estado de oxidação do ferro e, caso o átomo de ferro estivesse reduzido, no espectro de dicroísmo circular deveríamos observar somente uma banda positiva em 418nm. [101,112]

A permanência da banda negativa em 417 nm no dicroísmo circular corrobora com a banda 697nm do espectro do UV-Vis, evidenciando que formação do compósito não modifica a estrutura secundária e nem o estado oxidado do átomo de ferro com o grupo Met^{80}. De acordo com a literatura a presença da banda negativa em 416 resulta da interação do grupo Phe^{82} com o grupo heme no mesmo plano da ligação com a Met^{80}. Caso ocorra a perda da ligação Met^{80}-Fe prevista por

o uso de solventes inadequados e alguns líquidos iônicos, ocorre um distúrbio na orientação e na distancia do grupo Phe^{82} em relação ao grupo heme e esta banda negativa é perdida.

A figura 4.27(b) apenas demonstra os espectros típicos de dicroísmo circular e UV-Vis do citocromo c Fe^{+3} e serviu para comparar e demonstrar que os materiais do compósito apresentado neste relatório, não proporcionam mudanças estruturais na biomolécula. [101]

4.7. Espectroscopia Raman Ressonante e caracterização morfológica dos eletrodos modificados por MEV

A microscopia Raman Ressonante também é uma técnica espectroscópica utilizada para se obter dados a respeito de tipos de ligação entre átomos e interações com diferentes substratos, em estudos de heme-proteinas. No caso do citocromo c nativo, os modos vibracionais característicos se encontram na região entre 1300 nm e 1700 nm, devido aos estiramentos de ligação C-C dos aminoácidos e C-N do grupo porfirínico (grupo heme), com valores de bandas em aproximadamente 1370 nm e 1570 nm respectivamente. [105, 113-121] Como a heme-proteína é sensível ao modo de imobilização, substrato utilizado e o meio em que se encontra, a posição destas bandas podem ser deslocada para valores maiores ou menos de comprimento de onda, caso ocorra alguma modificação no seu estado de oxidação ou na estrutura conformacional. [114,115]

Para nanotubos de carbono, a espectroscopia Raman também é muito utilizada na verificação de interações de suas paredes eletrônicas com diversos compostos. [120] De modo característico, o espectro Raman de um nanotubo de

carbono apresenta uma banda intensa em aproximadamente 1580 nm, denominada banda-G tangencial, que esta associada ao modo de estiramento ν(C=C) e outra banda em aproximadamente 1320 nm (banda D) que esta diretamente relacionada ao grau de desordem na sequencia dos átomos de carbono devido a substituição por heteroátomos ou a presença de buracos e defeitos de parede. Ou seja, se um nanotubo de carbono apresentar defeitos na sequencia dos átomos de carbono, a banda D, é observada nos espectros Raman.

Pensando em investigar a interação do citocromo c com o feltro modificado, foi realizado o experimento de Raman Ressoante, utilizando os eletrodos FCSNTc, FCSNTc/Citc, FCSNTc/Citc/Quit, FCSNTc/Citc/BMMIBF$_4$ e FCSNTc/Citc/Quit/BMMIBF$_4$, com um laser de comprimento de onda de 488 nm. Os espectros obtidos estão apresentados na figura 4.28.

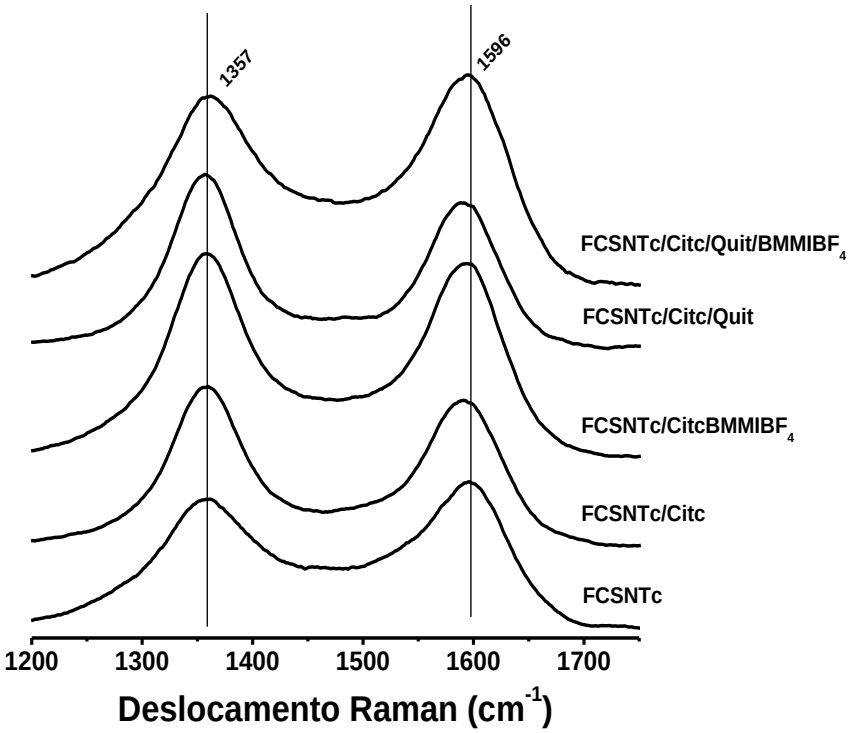


Figura 4.28 Espectros Raman dos eletrodos FCSNTc modificados. Excitação do laser 488 nm

Como pode ser observado, o espectro Raman na figura 4.28 para o FCSNTc apresentou a banda-G em 1596 nm juntamente com a banda-D em 1357 nm. A presença da banda-D indica que o os nanotubos de carbono do tipo “cup stacked” que recobrem as microfibras de carbono do feltro apresentem um elevado grau de defeitos, pois em casos de folhas de grafeno sem defeitos, este pico não é observado. [85]

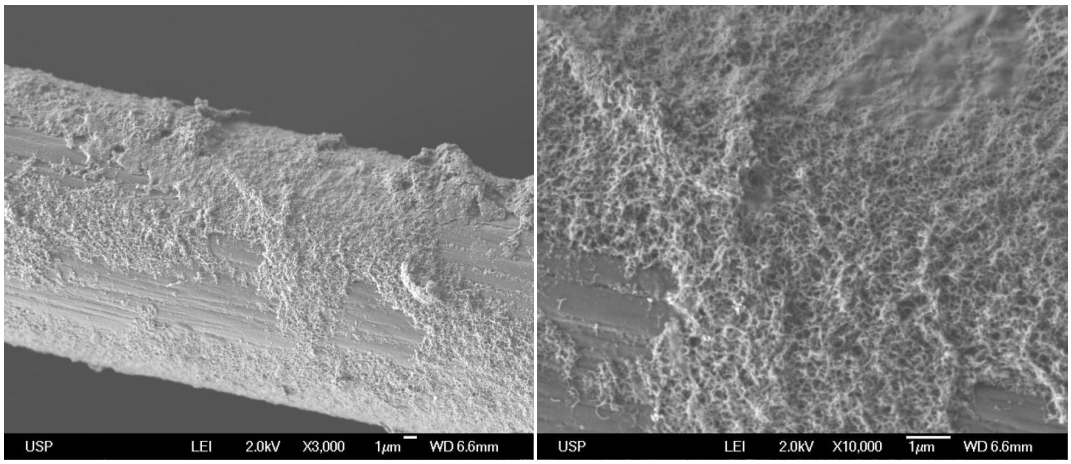
A partir dos espectros obtidos para todos os outros eletrodos modificados, foi observado que as bandas características do nanotubo de carbono são predominantemente intensas, não sendo possível observar as bandas características do citocromo c. No entanto, pode ser observado que a banda-G apresentou um leve deslocamento para valores menores de comprimento de onda e a banda-D permaneceu na mesma posição.

Como na espectroscopia Raman de nanotubos de carbono, a variação da posição atribuída à banda-G esta associada a uma modificação da densidade de elétrons e da condutividade elétrica nas paredes nos nanotubos, o deslocamento observado na posição da banda-G nos espectros evidenciou a existência da interação eletrônica entre as paredes dos nanotubos de carbonos do feltro com o biomaterial. Um comportamento semelhante também foi observado para a modificação deste tipo de feltro com análogos do azul da Prússia com polímeros condutores, onde a interação dos nanotubos de carbono com este material híbrido fora observada pelo deslocamento da posição da banda-G. [78]

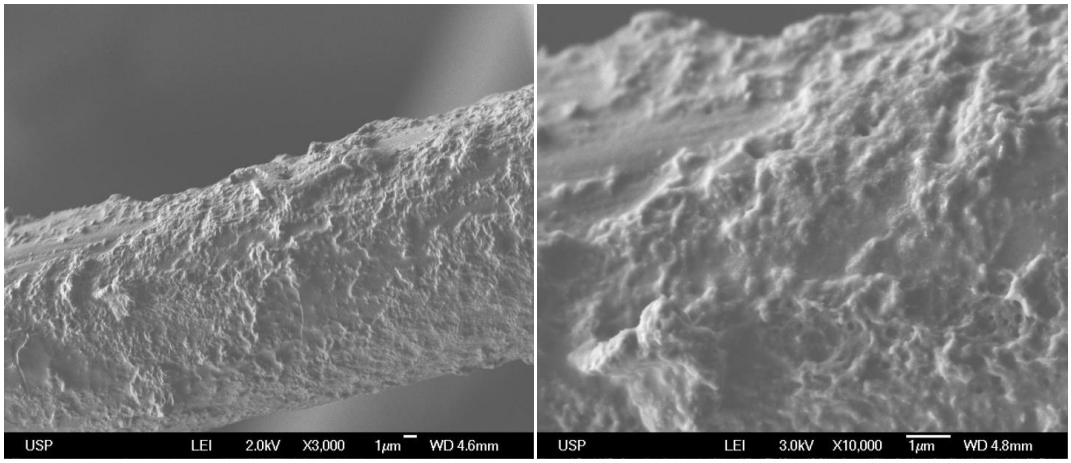
Para obsevar a estrutura superficial dos eletrodos, foi utilizada a técnica de Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV) do eletrodo FCSNTc não modificado e dos eletrodos que apresentam os compósitos para a imobilização do citocromo c, denominados , FCSNTc/Citc, FCSNTc/Citc/Quit, FCSNTc/Citc//BMMIBF$_4$ e

FCSNTc/Citc/Quit/BMMIBF$_4$. Como o feltro de fibra de carbono é uma estrutura tridimensional, foram retiradas duas imagens de cada eletrodo sendo uma com magnitude de 3000 vezes de aumento, para obter detalhes do recobrimento de uma microfibra, e a segunda imagem fora retirada da mesma posição, no entanto a uma magnitude de 10000 vezes de aumento para obter mais detalhes da superfície. As imagens esta representadas na figura 4.29 a seguir.

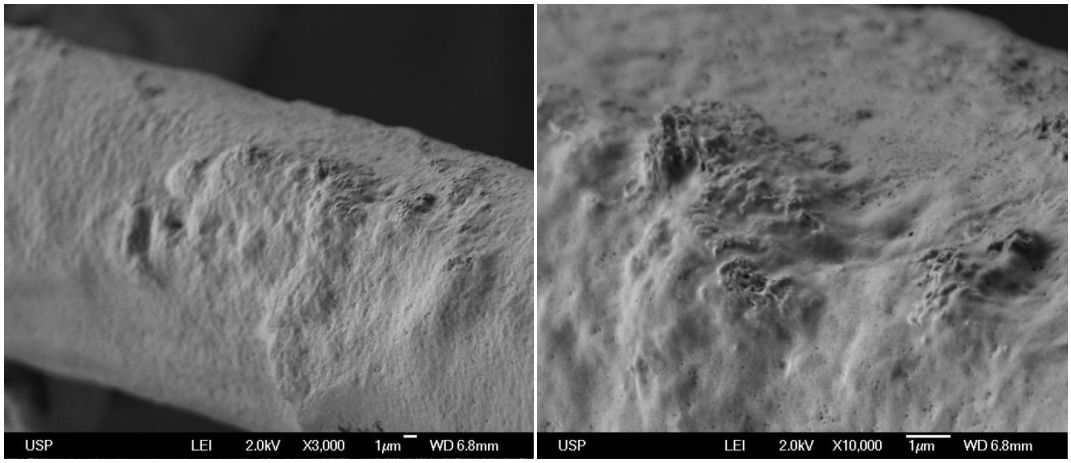
FCSNTc



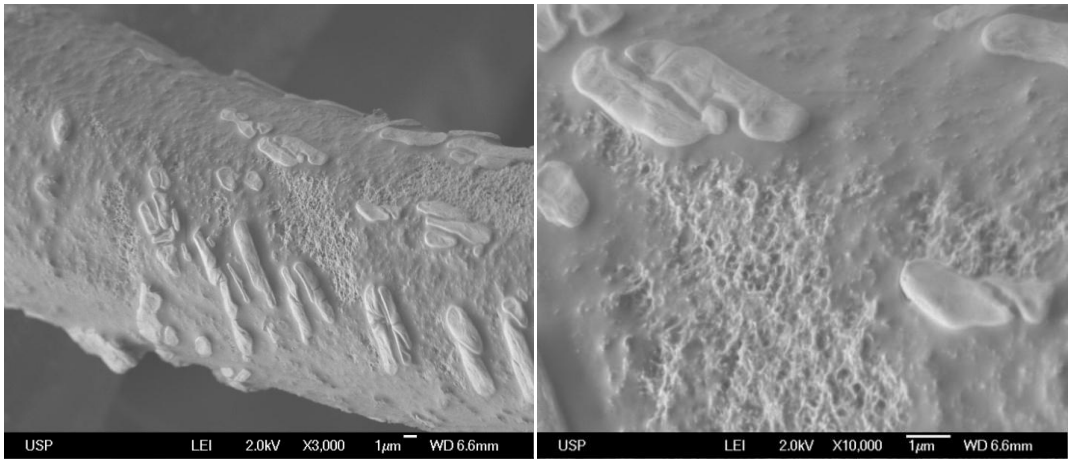
FCSNTc/Citc



FCSNTc/Citc/Quit



FCSNTc/Citc/BMMIBF$_4$



FCSNTc/Citc/Quit/BMMIBF$_4$

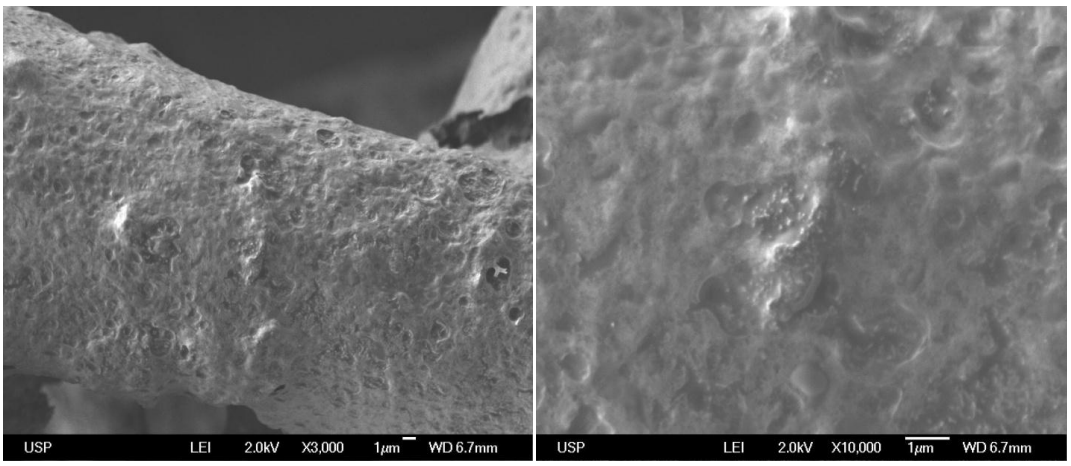


***Figura 4.29**. Imagens de MEV dos eletrodos modificados com diferentes compósitos, e magnitudes de 3000 e 10000 vezes de aumento.*

Como pode ser observado na imagem do eletrodo FCSNTc, as microfibras de carbono (que possuem espessura de aproximadamente 20 µm) apresentam os nanotubos de carbono recobrindo sua superfíce, sendo mais detalhada na imagem com magnitude de 10000 vezes de aumento.

A imagem do eletrodo FCSNTc/Citc mostra que somente nas regiões onde se encontram os nanotubos de carbono observa-se o citocromo c, indicando uma afinidade da heme-proteína com o nanomaterial de carbono. Para o FCSNTc/Citc/Quit, como a quantidade de quitosana é superior aos outros componentes, observa-se que a fibra é completamente encoberta por uma camada do compósito. Na imagem do eletrodo FCSNTc/Citc/BMMIBF$_4$ vemos que como o líquido iônico não evapora no processo de secagem, ele permanece na superfície das fibras em forma de aglomerados juntamente com o citocromo c recobrindo os nanotubos, e por fim na imagem do eletrodo FCSNTc/Citc/Quit/BMMIBF$_4$ o compósito inteiro recobre totalmente a fibra.

Estes dados da morfologia dos eletrodos modificados mostram independente dos componentes utilizado para imobilizar o citocromo c, o compósito encobre as microfibras de carbono desta plataforma tridimensional de maneira bem homogenia.

5. Conclusões

Partindo das abordagens discutidas nesta tese sobre os métodos de imobilização, tipo de substrato e dos diferentes compósitos apresentados, foi possível destacar as etapas do desenvolvimento de um novo sensor de citocromo c com aplicação na detecção eletrocatalítica de peróxido de hidrogênio. Este novo dispositivo não se enquadra na classificação de biossensores, pois o mesmo não apresenta especificidade ao analito peróxido de hidrogênio.

Os estudos iniciais da atividade eletroquímica do citocromo c imobilizado sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo apresentaram resultados fundamentais sobre a formação de um compósito de quitosana e o líquido iônico $BMMIBF_4$, indicando que o método para imobilizar a biomolécula na superfície do eletrodo pode variar o seu comportamento eletroativo.

Na busca de melhorar a resposta eletroquímica do sensor a utilização dos materiais nanoestruturados tridimensionais como os feltros de microfibra de carbonos recobertos com nanotubos de carbono do tipo “cup stacked” – FCSNTc, apresentou a melhor eficiência eletroquímica do citocromo c já que as dimensões nanométricas dos nanotubos favorecem a acessibilidade aos sítios ativos da heme-proteína, facilitando a reação de transferência de elétrons. Além disso foi mostrado que a interação deste novo substrato com o líquido iônico apresentou sensibilidades maiores quando comparadas com os outros métodos de imobilização que utilizam a quitosana.

Os resultados obtidos pelas técnicas espectroscópicas corroboram com os dados eletroquímicos, mostrando que o líquido iônico $BMMIBF_4$ é amigável ao microambiente criado ao redor do grupo heme eletroativo não modificando a estrutura secundária da biomolécula.

Por fim, os desempenhos encontrados nos eletrodos pela imobilização do citocromo c em FCSNTc sem quitosana, sugere a formação de novos sensores que se baseiam nos princípios de funcionamento dos biossensores de terceira geração, pelo fato da transferência direta de elétrons da heme-proteína ocorrer diretamente na superfície do eletrodo com os nanotubos de carbono imobilizados nas microfibras de carbono. E deste modo surgem novas plataformas com potencial aplicação para novos sensores e biossensores que apresentem comportamento semelhante aos apresentados nesta tese.

6. Perspectivas Futuras

Na busca de produzir biossensores com melhores desempenhos eletroquímicos, a utilização de outros materiais, como polímeros condutores, mediadores inorgânicos, líquidos iônicos etc., para imobilizar biocomponentes foram propostos para tornar a transferência de elétrons mais efetiva.

Tendo em vista a utilização do polímero condutor poli(5-amino-1-naftol) (poli(5A1N)) para imobilização de biomoléculas [6,123] e na melhora na eletroatividade de polímeros condutores como a poli(anilina) e seus análogos eletropolimerizados em líquido iônicos [124], foi sugerido a formação de um biossensor para o citocromo c utilizando como matriz imobilizadora o poli(5A1N) formado no líquido iônico $BMMIBF_4$. Nesta seção serão apresentados os dados obtidos inicialmente da eletropolimerização do polímero condutor poli(5A1N), juntamente com um estudo de caracterização dos filmes obtidos exclusivamente no líquido iônico BMMIBF4, utilizando o eletrodo de trabalho de carbono vítreo (CV).

Conforme descrito na literatura por Cintra e colaboradores [125-127], o poli(5A1N) é obtido da polimerização do monômero bifuncional 5-amino-1-naftol (5A1N) (figura 6.1) em solução aquosa ácida (pH próximo de zero), pois desta maneira os grupos –OH do monômero não são desprotonados e o crescimento do filme polimérico ocorre pela oxidação dos sítios de nitrogênio (o que garante o caráter condutor do polímero), deixando os grupos –OH livres para serem utilizados como possíveis ancoradores de biomoléculas.

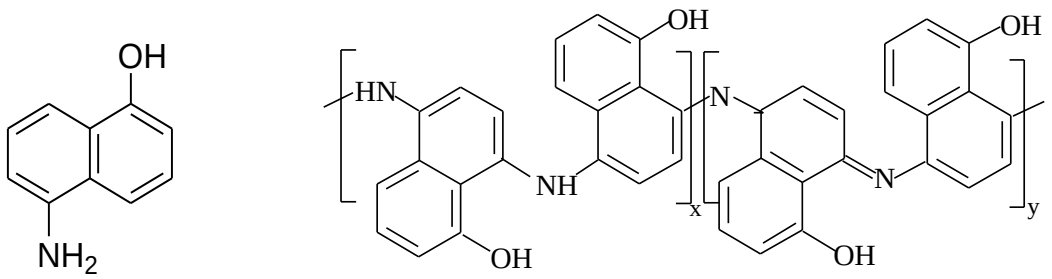


Figura 6.1. Estrutura do monômero bifuncional 5A1N e do poli(5A1N)

Para realizar a eletropolimerização em líqudo iônico o procedimento de formação do filme foi baseado nos estudos que utilizam o meio aquoso ácido. Desta forma, 1 mg do monômero 5A1N foi dissolvido em 1 mL de BMMIBF4, juntamente com o ácido orgânico difenil hidrogeno fosfórico (HDF) na concentração de 50 mmol L^{-1} para manter o meio ácido e garantir a eletroatividade do polímero. O crescimento do filme polimérico foi monitorado por voltametria cíclica, utilizando carbono vítreo (CV) como eletrodo de trabalho, e a figura 6.2 a seguir apresenta o voltamograma de formação do filme.

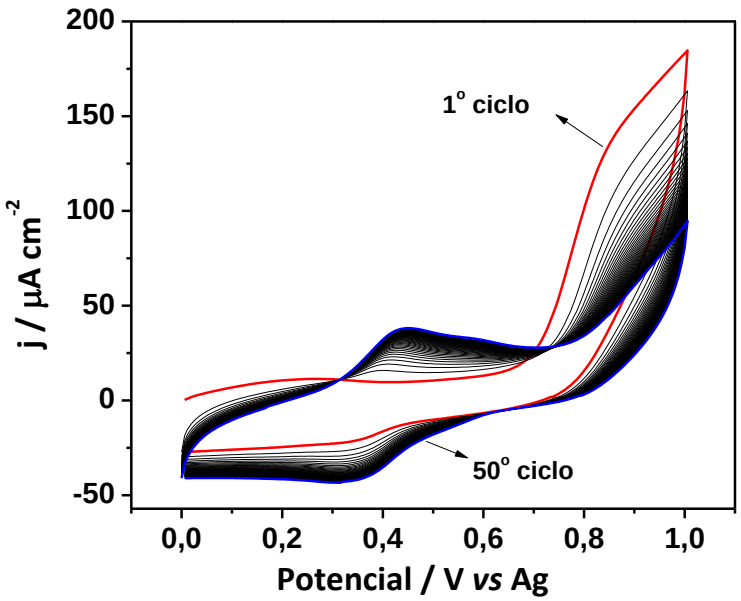


Figura 6.2. Eletropolimerização do poli(5A1N) em $BMMIBF_4$ e HDF 50 mmol L^{-1}. Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}

Pelo voltamograma cíclico da figura 20, pode-se observar o aumento da corrente anódica em valores acima de 0,70V relacionados com a oxidação do agrupamento amina, presente no monômero, formando os radicais necessários para o início da polimerização. No entanto a partir do segundo ciclo pode-se observar o início da polimerização com a presença do pico anódico na região de 0,40V e do pico catódicos em aproximadamente 0,35V. Vemos que estes picos aumentam de intensidade ao decorrer dos ciclos realizados indicando a deposição do material eletroativo na superfície do eletrodo.

Curiosamente a formação deste polímero ocorreu sem a necessidade de modificar o intervalo de potencial, pois como descrito por Cintra [125], em meio aquoso ácido é necessário permanecer os dois primeiros ciclos a um valor de potencial para a oxidação do monômero, e em seguida o potencial final tem que ser reduzido para não permitir que o próprio monômero radicalar reoxide e forme subprodutos não eletroativos.

Ao realizar o mesmo procedimento de eletropolimerização do 5A1N, acima citado, porém em $BMMIBF_4$ sem adicionar o HDF para deixar o meio ácido, foi observado que o filme de poli(5A1N) foi formado na superfície do eletrodo de CV conforme figura 6.3. Este resultado se contrapõe aos dados obtidos na literatura em meio aquoso, onde a formação do filme polimérico com caráter condutor somente ocorre em meios ácidos. No voltamograma da figura 6.3 observa-se no primeiro ciclo a oxidação do monômero a radical em aproximadamente 0,70V, seguindo do crescimento do filme nos ciclos subsequentes, devido a presença dos picos de oxidação e redução em 0,35V e 0,25 V respectivamente.

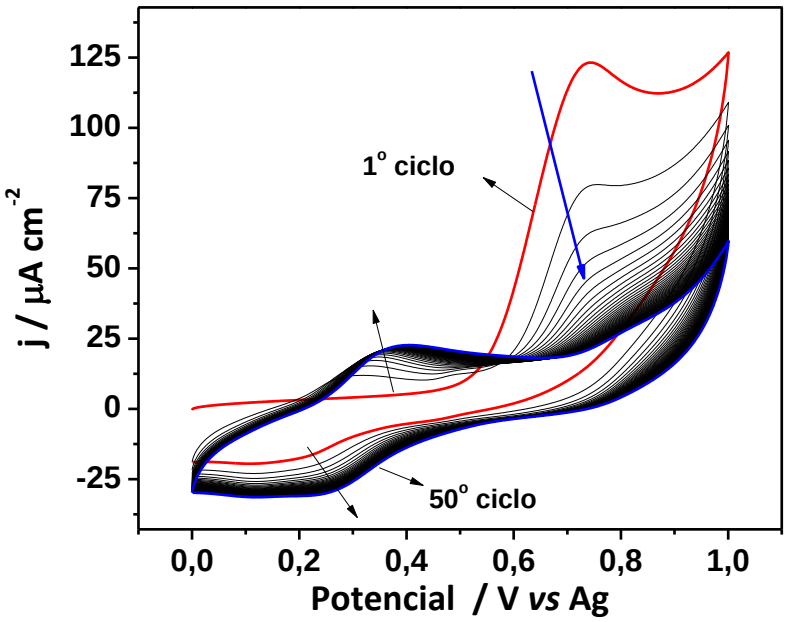


Figura 6.3 Eletropolimerização do poli(5A1N) em $BMMIBF_4$ sem ácido

Partindo destes resultados, pode-se dizer que o método de eletropolimerização do poli(5A1N) no líquido iônico BMMIBF4 segue um novo mecanismo, pois neste caso, não foi necessário modificar o valor do potencial de oxidação do monômero e nem manter o pH do eletrólito próximo a zero. Da mesma forma obtida nos trabalhos de Camilo e colaboraderes, onde verificaram que os polímeros poli(anilina) [128] e o poli(sulfeto de fenileno-feninelamina) [129] conseguem manter os seus estados mais condutores (mais oxidados) estáveis no líquido iônico, a eletropolimerização do 5A1N deve ser estabilizada pelos íons volumosos do líquido iônico BMMIBF4, que impedem que ele reoxide a valores de potencial elevado, evitando a formação de subprodutos não eletroativos.

Apesar de ter sido obtido o poli(5A1N) no líquido iônico sem ácido (figura 6.3), a quantidade de material depositada na sua superfície não foi a mesma. Pois ao integrar a quantidade de carga relacionada aos processos de oxidação e redução durante a formação do polímero, e fazer a relação da carga de um material

eletroativo com a sua quantidade na superfície do eletrodo, foi possível confirmar que em presença de ácido, o poli(5A1N) se polimeriza em maior quantidade para o mesmo número de ciclos realizados. A figura 6.4 apresenta estes resultados.

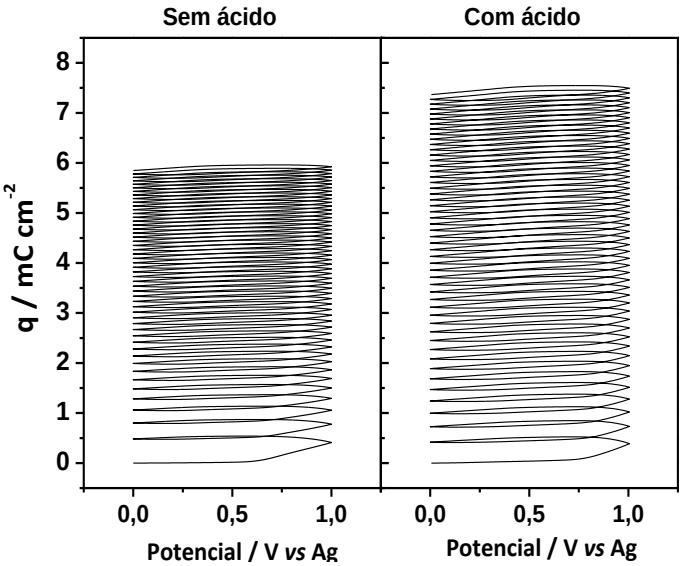


Figura 6.4 Perfil de crescimento dos filmes de poli(5A1N) nas diferentes soluções de BMMIBF4 em função da carga do material depositado em CV durante 50 ciclos.

Inicialmente vemos na figura 6.4 que durante os primeiros ciclos a quantidade de carga é maior, devido a oxidação do monômero formando os radicais necessários para o início da eletropolimerização. Ao longo dos ciclos realizados vemos que a variação da carga do filme vai diminuindo indicando que a velocidade de formação do polímero também decresce. Entretanto, ao final dos 50 ciclos realizados, foi observado que quantidade de carga do poli(5A1N) foi superior na solução contendo BMMIBF4 com o ácido HDF.

A fim de avaliar a estabilidade dos filmes poliméricos formados, foram realizados novos voltamogramas cíclicos em líquido iônico sem a presença do monômero e um dos parâmetros estudados foi o comportamento destes filmes quando submetidos a ciclos com diferentes velocidades de varredura. Nesta etapa o filme eletropolimerizado em $BMMIBF_4$ com o ácido HDF, foi ciclado em $BMMIBF_4$

contendo o ácido HDF e o filme eletropolimerizado em $BMMIBF_4$ puro, foi ciclado em $BMMIBF_4$ puro. Os resultados obtidos a 10, 20, 50, 100, 200 e 300 mV s^{-1} estão apresentados na figura 6.5.

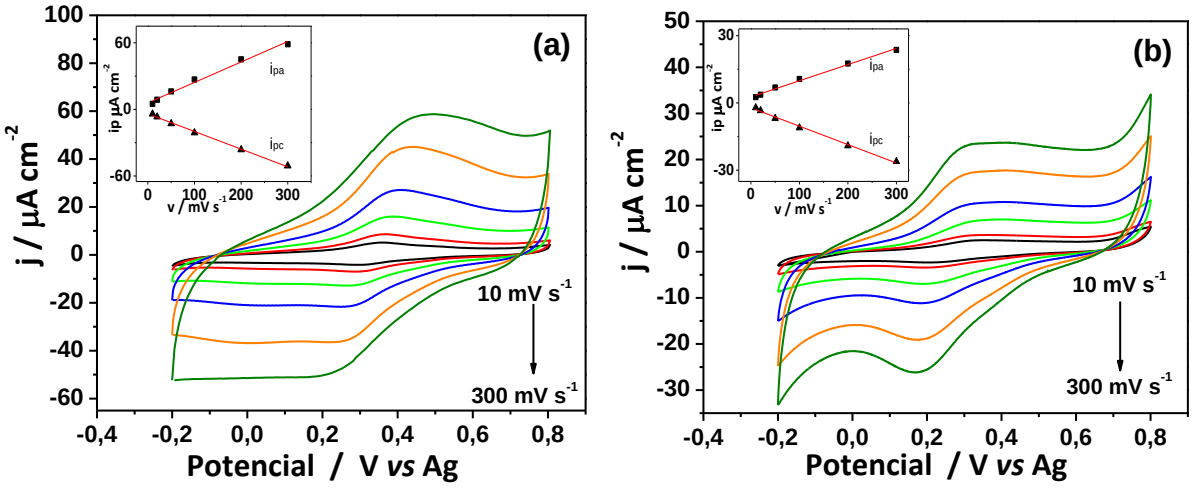


Figura 6.5 Perfil j/E dos filmes de poli(5A1N) (a) eletropolimerizado com $BMMIBF_4$/HDF e ciclado em $BMMIBF_4$/HDF e (b) eletropolimerizado em $BMMIBF_4$ e ciclado em $BMMIBF_4$ puro em diferentes velocidades de varredura.

Pela Figura 6.5 observa-se que em todas as velocidades de varredura, ambos os filmes permanecem eletroativo devido a permanência dos picos de oxidação e redução. Pelos voltamogramas também vemos que a intensidade de corrente de pico para o poli(5A1N) em HDF é maior que em líquido iônico puro e a figura inserida nos voltamogramas mostra uma relação linear da corrente de pico com a velocidade de varredura (mV s^{-1}) demonstrando uma estabilidade no novo meio eletrolítico.

Para demonstrar esta diferença observada na quantidade de material depositado, a Figura 6.6 apresenta os voltamogramas cíclicos da eletroatividade do polímero com ácido e sem ácido a 20 mV s^{-1}. O voltamograma indicado como "HDF/HDF" esta relacionado a eletroatividade do polímero em $BMMIBF_4$ com HDF sendo eletropolimerizado em $BMMIBF_4$ com HDF. Já o voltamograma indicado como

"$BMMIBF_4/BMMIBF_4$" esta relacionado a eletroatividade do polímero em $BMMIBF_4$ puro sendo eletropolimerizado em $BMMIBF_4$ sem ácido.

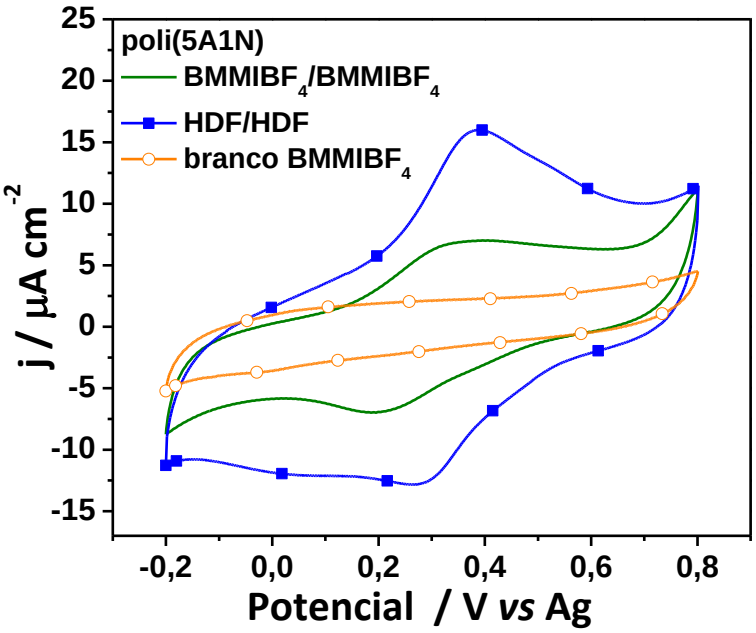


Figura 6.6 Perfil j/E dos diferentes filmes de poli(5A1N) utilizando o líquido ionico $BMMIBF_4$.

Pela figura 6.6 observa-se que a intensidade da corrente dos processos redox do filme HDF/HDF foi maior que o filme $BMMIBF_4/BMMIBF_4$, devido ao simples fato de que durante a eletropolimerização a quantidade de material gerada na superfície do eletrodo foi maior na presença do ácido. No entanto, a corrente obtida em líquido iônico sem ácido também mostra que nestas condições, o material consegue manter o processo de transferência de elétrons, sugerindo que o processo de compensação de cargas seja diferente ao processo encontrado em meio aquoso ácido por se tratar de um meio eletrolítico diferente.

Aproveitando a obtenção do poli(5A1N) no líquido iônico sem a presença do ácido, foi realizado uma imagem de microscopia de Varredura Eletrônica – MEV, conforme apresentado na figura 6.7 a seguir, para verificar a sua morfologia após a deposição sobre o eletrodo de trabalho.

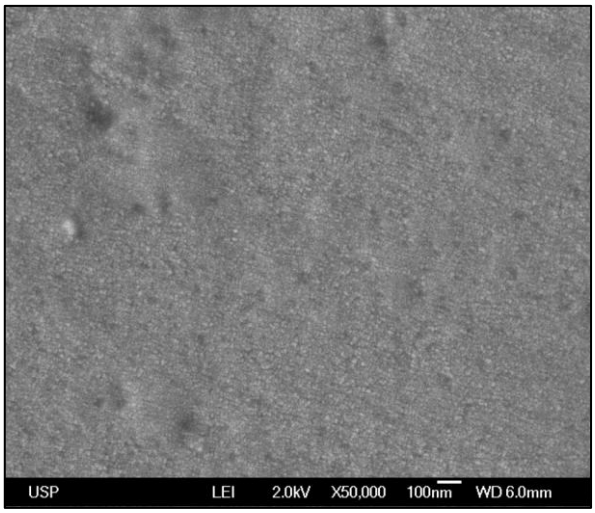


Figura 6.7 Imagem de MEV do filme de poli(5A1N) obtido em $BMMIBF_4$ puro

Como pode ser observado, o filme polimérico apresenta uma homogeneidade na superfície do eletrodo. Este perfil também foi observado por Cintra para o poli(5A1N) em meio aquosos, indicando a formação de um filme fino.

Com isso, os resultados obtidos do poli(5-amino-1-naftol) em líquido iônico (com e sem a presença de ácidos) foram bem interessantes e deste modo, estamos diante de uma forma alternativa de produção do polímero condutor para ser utilizado como ancorador de biocomponentes na construção de um biossensor, sendo este próximo passo a perspectiva futura para aprimorar os sensores e biossensores que utilizam este polímero para auxiliar a transferência direta de elétrons.

7. Referências Bibliográficas

[1] Wu, Y., Hu, S., *Microchim. Acta,* 159 (2007) p1-17

[2] Clark Jr. L.C., Lyons, C., *Ann. NY Acad. Sci.,* 102 (1962) p29

[3] Freire, R.S., Pessoa, C.A., Mello, L.D., Kubota, L.T., *J. Braz. Chem. Soc.,* 14 (2003) p230-243

[4] Zhang, W., Li, G., *J. Japan Soc. Anal. Chem.,* 20 (2004) p603-609

[5] Xu, J.S., Zhao, G.C., *Int. J. Electrochem. Sci.,* 3 (2008) p519-527

[6] Massafera, M.P., Cordoba de Torresi, S.I., *Sens.Actuators B,* 137 (2009) p476-482

[7] Valentini, F., Cristofanelli, L., Carbore, M., Palleschi, G., *Electrochim. Acta,* 63 (2012) p37-46

[8] Wang, J., Li. M., Shi, Z., Li, N., Cu, Z., *Anal. Chem.,* 74 (2002) p1993-1997

[9] Cui, K.,Song, Y., Guo, C., Xu, F., Zhang, Y., Shi, Y., Wang, Li., Hou, H., Li, Z., *Sens. Actuators B,* 160 (2011) p435-440

[10] Zhao, G-C., Yin, Z.Z., Zhang, L., Wei, X.W., *Electrochem. Commu.* 7 (2005) p256-260

[11] Baise, P/M/. Paggi, D.A., Doctorovich, F.,Hildebrandt, P., Estrin, D.A., Murgida, D.H., Marli, M.A., *J. Am. Chem. Soc.,* 131 (2009) p16248-16256

[12] Mirkin, N., Jaconcic, J., Stojanoff, V., Moreno, A., *Eur. J. Biochem.,* 51 (1976) p376-380

[13] Pelletier, H., Kruatt, J., *Science,* 258 (1992) p1748-1755

[14] Sivakolundu, S.G., Mabrouk, P.A., *J. Am. Chem. Soc*., 122 (2003) p1513-1521

[15] Solmaz, S.R., Hunte, C., *J. Bio. Chem.,* 283 (2008) p17542 – 17549

[16] Colon, W., Roder, H., *Nature,* 3 (1996) p1019-1025

[17] Margoliash, E., Smith, E.L., Kreil, G., Tuppy, H., *Nature* 193 (1961) p1125-1127

[18] Compton, D.L., Laszlo, J.A., *J. Electroanal. Chem.,* 553 (2003) p187-190

[19] Chun, Y., Cui, S-Q., Zhao, J., Yang, Z.S., *Biolectrochemistry,* 70 (2007) p416-420

[20] Liu, Y.C., Zhao, J., Wu, W.L., Yang, Z.S., *Electrochim. Acta,* 52 (2007) p4848-4852

[21] Yue, H., Khoshtariya, D., Waldeck, D.H., Grochol, J., Hildebrandt, P., Murgida, D.H., *J.Phys. Chem. B,* 110 (2006) p19906-19913

[22] Alvin-Koh, W,C., Rahman, A., Choe, E.S., Lee, D.K., Shim, Y.B., *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) p1374-1381

[23] Song, Y., Wang, L., Cui, K., Liu, L., Zhang, M., Wang, l., Li, Z., *J. Electroanal. Chem.,* 656(2011) p206-210

[24] Balamurugan, A., Chen, S-M., *Biosens. Biolectron*, 24 (2008) p976-980

[25] Chen, X., Yan, H., Wu, W-L., Yang, Z-S., *Thin Solid Filns,* 517 (2009) p2787-2791

[26] Eguilaz, M., Agui, L., Sedenho, Y., Pingarron, J.M., *J. Electroanal. Chem.,* 644 (2010) p30-35

[27] Siao, H,W., Chen, S-M.,Lin, K-C., *J. Solid. State. Electrochem.,* 15 (2011) p1121-1128

[28] Teles, F.R.R., Fonseca, L.P., *Mat. Sci. Engineering C.,* 28 (2008) p1530-1543

[29] Xu, J., Peng, R., Ran, Q., Xian, Y., Tian, Y., Jin, L., *Talanta,* 82 (2010) p1511-1515

[30] Wen, Y., Xu, J., Li, D., Kong, F., He, H., *Syn. Met.,* 162 (2012) p 1308-1314

[31] Aubin, M.E., Schiffleri, K.H., *Langmuir,* 21 (2005) p12080-12084

[32] Zhu, A., Tian, Y., Liu, H., luo, Y., *Biomaterials* 20 (2009) p3183-3188

[33] Ge, B., Lisdat, F., *Anal. Chim. Acta,* 454 (2002) p53-64

[34] Chen, X., Ferrigno, R., Yang, J., Whitesides, G.M., *Langmuir* 18 (2002) p7009-7015

[35] Zhao, H., *J. Chem. Technol. Biotechnol,* 85 (2010) p891-907

[36] Feher, E., Major, B., Bako, K.B., Gubicza, L., *Biochem. Soc. Trans.,* 35 (2007) p1624-1627

[37] Fujita, K., MacFarlene, D.R., Forsyth, M., *Chem. Commun., (2005) p4804-4806*

[38] Liu, Y., Wang, M., Zhao, F., Xu, Z., Dong, S., *Biosens.Biolectron.,* 21 (2005) p984-988

[39] Kaushik, A., Khan, R., Solanki, P.R., Pandey, P., Alam, J., Ahmad, S., Malhotra., *Biosens. Bioelec.,* 24 (2008) p676-683

[40] Lopes, E.C.N., Sousa, K.S., Airoldi, C., *Thermochim. Acta,* 483 (2009) p21-28

[41] Ruan C., Li, T., Niu, Q., Lu, M., Lou, J., Gao, W., Sun, W., *Electrochim. Acta.,* 64 (2012) p183-189

[42] Mitala, J.J., Michael, A.C., *Anal. Chimi. Acta,* 556 (2006) p326-332

[43] Pavinatto, F.J., Caseli, L., Oliveira Jr., O.N., *Biomacromolecules,* 11 (2010) p1897-1908

[44] Zhang, M., Smith, A., Gorski, W., *Anal. Chem.,* 76 (2004) p5045-5050

[45] Huang, H., Hu, N., Zeng, Y., Zhou, G., *Anal. Biochem.,* 308 (2002) p141-151

[46] Zhang, Y., Zheng. J., *Electrochim. Acta.* 54 (2008) p749-754

[47] Xu, H., Xiong, H.Y., Zeng, Q.X., Jia, L., Wang, Y., Wang, S.F., *Electrochem. Commu.*, 11 (2009) p286-289

[48] Kang, X., Wang, J., Tang, Z., Wu, H., Lin, Y., *Talanta,* 78 (2009) p120-125

[49] Gomathi, P., Kim, M.K., Park, J.J., Ragupathy, D., Rajendran, A., Lee, S.C., Kim, J.C., Ghim, H.D., *Sens. Actuators B,* 155 (2011) p897-902

[50] Kilbanov, A.M., *Nature,* 409 (2001) p241-246

[51] Wei, D., Ivaska, A., *Anal. Chim. Acta,* 607 (2008) p126-135

[52] Lau, R.M., van Rantwijk,F., Seddon, K.R., Sheldon, R., *Org. Letters.,* 26 (2000) p4189-4191

[53] Fujita, K., Ohno, H., *Biopolymers,* 12 (2010) p1093-1099

[54] Shiddiky, M.J.A., Torriero, A.A., *Biosens. Bioelectron.,* 26 (2011) p1775-1787

[55] Park, S., Kazlauskas, R., *Cur.Op. Biotech.,* 14 (2003) p432-437

[56] Rantwijk, F., Lau, R.M., Sheldon, R.A., *Trends Biotech.,* 21 (2003) p131-138

[57] Nakamura, T., *Anal. Sci.,* 27 (2007) p253-259

[58] Okrasa, K., Jampel, E.G., Therisod, M., *Tetrahedron,* 14 (2003) p2487-2490

[59] Opallo, M., Lesniewski, A., *J. Electroanal. Chem.,* 656 (2011) p2-6

[60] Ueki, T., Watanabe, M., *Macromolecules,* 11 (2008) p3739-3749

[61] Sheldon, R., *Chem. Commun.,* (2001) p2399-2407

[62] Rantwijk, F., Sheldon, R.A., *Chem. Rev.,* 107 (2007) p2757-2785

[63] Camilo, F.F., Kawano, Y., Torresi, R.M., *Electrochim. Acta,* 52 (2007) p6427-6437

[64] Scheller, F.W., Wollenberger, U., Lei, C., Jin, W., Ge, Be., Lehmann, C., Lisdat, F., Fridman, V., *Rev. Mol. Biotech.,* 82 (2002) p411-424

[65] Xi, F., Liu, L., Wu, Q., Lin, X., *Biosens. Bioelectron.,* 24 (2008) p29-34

[66] Xen, Y., Yang, X., Hu, G., Chen, S., Jia, N., *Electrochim. Acta,* 54 (2008) p744-748

[67] Lu, X., Zhang, Q., Zhang, l., Li, J., *Electrochem. Commu.* 8 (2006) p874-878

[68] Fujita, K., MacFarlene, D.R., Forsyth, M., Fujita, M.Y., Murata, K., Nakamura, N., Ohno, H., *Biomacromolecules* 8 (2007) p2080-2086

[69] Wu, X., Du, P., Wu, P., Cai, C., *Electrochim. Acta,* 54 (2008) p738-743

[70] Li, J., Liu. L., Xiao, F., Gui, Z., Yan, R., Zhao, F., Hu, L., Zeng, B., *J. Electroanal. Chem.,* 613 (2008) p51-57

[71] Lu, X., Hu, J., Yao, X., Wang, Z., Li, Z., *Biomacromolecules,* 7 (2006) p975-980

[72] Safavi, A., Maleki, N., Moradlou, A., Sorouri, W., *Electrochem. Commun.,* 10 (2008) p420-423

[73] Zhao, G.C., Xu, M.Q., Ma, J., Wei, X.W., *Electrochem. Commun.,* 9 (2007) p920-924

[74] Sheng, Q.L., Zheng, J.B., Guan, X.D.S., Lin, W.H., Li, Y.Y., Liu, R-X., *Electrochim. Acta,* 55 (2010) p3185-3191

[75] Li, J., Fan, C., Ziao, F., Yan, R., Fan, S., Zhao, F., Zeng, B., *Electrochim. Acta,* 52 (2007) p6178-6185

[76] Kragl, U., Eckstein, M., Kaftzik, N., *Cur. Op. Biotech.,* 13 (2002) p565-571

[77] Rosolen, J.M., Matsubara, E.Y., Lala, M.S., Montoro, LA., *S. J. Power Sources,* 162 (2006) 620

[78] Gonçales, V.R., Matsubara, E.Y., Rosolen, J.M., Cordoba de Torresi, S.I., *Carbon,* 49 (2011) p3039-3047

[79] Kiema, G.K., Aktay, M., McDermott, M.T., J. Electroanal. Chem., 540 (2003) p123-132

[80] Wan, Y., Creber, A.M., Peppley, B., Bui, V.T., *J. Memb. Sci.,* 280 (2006) p666-674

[81] Bhattari, N., Cunn, J., Xhang, M., *Adv. Drug. Deliv. Rev.,* 62 (2010) p83-99

[82] Xiang, C., Zou, Y., Sun, L-X., Xu. F., *Talanta* 74 (2006) p206-211

[83] Bihari, M., Russel, T.R., Hoagland, D.A., *Biomacromolecules*, 11 (2010) p2944-2948

[84] Wei, W., Danielson, N.D., *Biomacromolecules,* 12 (2011) p290-297

[85] Du, P., Liu, S., Wu, P., Cai, C., *Electrochim. Acta.* 52 (2007) p6534-6547

[86] Santiago, M., Lima, P.R., Santos, W. J.R., Kubota, L.T., *Sens. Actuators B,* 146 (2010) p213-220

[87] Laviron, E., *J. Electroanal. Chem.* 100 (1979) p263-270

[88] Laviron, E., *J. Electroanal. Chem.* 101 (1979) p19-28

[89] Li, J., Tan, S.N., Ge, H., *Anal. Chim. Acta.* 335 (1996) p137-145

[90] Wang, S., Guo, Z., Zhang, H., *Biolectrochemistry* 82 (2011) p55-62

[91] Darian, F., Park, S.J., Akutsu, H., Shim, Y.B., *Biosens. Biolectron.* 23 (2007) p161-167

[92] Wang, Y., Qian, K., Guo, K., Kong, J., Yu, C., Liu, B., *Microchim Acta* 157 (2011) p87-95

[93] Xiong, H.Y., Chen, T., Zhang, X.H., Wang, S.F., *Electrochem. Commu.,* 9 (2007) p1648-1654

[94] Rahimi, P., Ghourchian, H., Rafiee-Pour, H-A., *Analyst* 136 (2011) p3803-3808

[95] Xiong, H.Y., Chen, T., Zhang, X., Wang, S.F., *Electrochem. Commu.,* 9 (2007) p2671-2675

[96] Feng, J.J., Zhao, G., Juan, J., Chen, H.Y., *Anal. Biochem*. 342 (2005) p280-286

[97] Rong, X., Xu, J.J., Chen, H.Y., *Electrochim. Acta,* 56 (2011) p9378-9385

[98] Long, J.S., Silvester, D. S., Wildgoose, G.G., Surkus, A-E., Flechsig, G.U., Compton, R.G., *Biolectrochemistry*, 74 (2008) p183-187

[99] Salimi, A., MamKhezri, H., Hallaj, R., Zandi, S., *Electrochim. Acta.* 52 (2007) p6097-6105

[100] Antalik, M., Fedunova, D., Bajelova, J., *Open Macromol. J.,* 4 (2010) p53-55

[101] Nantes,I.L., Zucchi, M.R., Nascimento, O.R., Alario, A.F., *J. Bio. Chem.,* 276 (2001) p153-158

[102] Xu. Q., Keiderling, T.A., *Biopolymers,* 73 (2004) p716-726

[103] Jiang, X., Xhang, X., Bai, H., Qu, X., Jiang, J., Wang, E., Dong, S., *Spectrochim. Acta Part A,* 61 (2005) p943-951

[104] Liu, G., Shao, W., Zhu, S., Tang, W., *J. Inorg. Biochem.,* 60 (1995) p123-131

[105] Mugnol, K.C.U., Ando, R. A., Nagayasu, R.Y., Alario, A.F., Brochsztain, S., Santos, P.S., Nascimento, O.R., Nantes, I.L., *Biophys J.*, 94 (2008) p4066-4077.

[106] Loget, G., Chevance, S., Poriel, C., Simonneaux, G., Lagrost, C., Berthelot, R., *Chem. Phys. Chem.,* 12 (2011) p411-418

[107] DiCarlo, C.M., Compton, D.L., Evans, K.O., Laszlo, J.A., *Bioelectrochemistry* 68 (2006) p134-143

[108] Crilly, S., Magner, E., *Phys. Chem. Chem. Phys.,* 12 (2010) p 10093-10097

[109] Santucci, R., Ascoli, F., *J. Inorg. Biochem.,* 10 (1997) p211-214

[110] Fujita, K., Foryth, M., MacFarlene, D., Reid, R.W., Elliot G.D., *Biotech. Bioeng.*, 94 (2006) p1209-1213

[111] Wei, W., Danielson, N.D., *Biomacromolecules,* 12 (2011) p290-297

[112] Stenner, R.S., *J. Phys. Chem. B, 112 (2008) p10358-10366*

[113] Weidinger, I.M., Murgida, D.H., Dong, W., Mohwald, H., Hildebrandt, P., *J. Phys. Chem. B,* 110 (2008) p522-529

[114] Droghetti, E., Ollerich, S., Hildebrandt, P., Smulevich, G., *Biophys. J.,* 91 (2006) p3022-3031

[115] Murgida, D.H., Hildelbrandt. P., *Acc. Chem. Res.,* 37 (2004) p854-861

[116] Mondal, K.C., Strydom, A.M., Erasmus, R.M., Keartland, J.M., Coville, N.J., *Mat. Chem. Phys.,* 111 (2008) p386-390

[117] Wackernarth, H., Murgida, D.H., Oellerich, S., Dopner, S., Hildebrandt, P., *J. Mol. Struct.,* 5630563 (2001) p51-59

[118] Cavalu, S., Pinzaru, S.C., Leopold, N., Kiefer, W., *Biopolymers* 62 (2001) p 341-348

[119] Ly, H.K., Wisitruangsakul, N., Sezer, M., Feng, J.J., Kranich, A., Weidinger, I.M., Zebger, I., Murgida, D.H., Hildebrandit, P., *J. Electroanal. Chem.,* 660 (2011) p367-376

[120] Murgida, D.H., Hildebrandt, P., *Chem. Soc. Rev.,* 37 (2009) p937-945

[121] Hu, S., Morris, I.K., Singh, J.P., Smith, K.M., Spiro, T.G., *J. Am. Chem. Soc.,* 115 (1993) p12446-12458

[122] Dresselhaus, M.S., Dresselhaus, G., Jorio, A., Saito, R., *Phys. Reports,* 49 (2005) p47-49

[123] Takahashi, S.H., Cordoba de Torresi, S.I., *Syn. Met., 159 (2009) p2159-2161*

[124] Camilo, F.F., Silveira, L.T., Torresi, R.M., Cordoba de Torresi, S.I., *Phys. Chem. Chem. Phys.,* 10 (2008) p1457-1462

[125] Cintra, E.P., Torresi, R.M., Louarn, G., Cordoba de Torresi, S.I., *Electrochim. Acta,* 49 (2004) p1409-1415

[126] Cintra, E.P., Cordoba de Torresi, S.I., Errien. N., Louarn, G., *Macromolecules,* 36 (2003) p2079-2084

[127] Cintra, E.P., Cordoba de Torresi, S.I., *J. Electroanal. Chem.,* 518 (2002) p33-40

[128] Camilo, F.F., Silveira, L.T., Torresi, R.M., Cordoba de Torresi, S.I., *Electrochim. Acta.,* 53 (2007) p1217-1224

8. Súmula Curricular

DADOS PESSOAIS

Leonardo Teixeira Silveira

Data do Nascimento: 08 de Outubro de 1981

Local: São Bernardo do Campo, São Paulo – Brasil

EDUCAÇÃO

Pós-Graduação	Universidade de São Paulo – Instituto de Química
2007 – atual	- Doutorado em Ciências Química – Área: Físico Química Orientador: Prof^{a}. Dr^{a}. Susana Ines Córdoba de Torresi Bolsista: CAPES
2005 – 2007	- Mestrado em Química – Área: Físico-química Titulo: "Estudo espectroeletroquímico das propriedades condutoras dos polímeros poli(sulfeto de fenileno fenilenamina) e poli(anilina) em líquido iônico". Orientador: Prof^{a}. Dr^{a}. Susana Ines Córdoba de Torresi Bolsista: CNPq
Graduação:	Faculdade São Bernardo – FASB – São Bernardo do Campo
2001 – 2004	- Bacharel em Química, Atribuições Tecnológicas e Licenciatura Plena
Técnico:	Colégio Leonor Mendes de Barros – São Bernardo do Campo
1996 – 2000	- Curso Técnico em Química (1997-2000) Com prêmio Lavoisier cedido pelo CRQ 4^{0} Região pelo melhor desempenho acadêmico.

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado pela Agência Financiadora CAPES (outubro/2007-setembro/2011)

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Abril 2012 – Maio 2012	Assistente Editoria da Revista Química Nova Sociedade Brasileira de Química – SBQ Instituto de Química - USP
Agosto 2008 – Novembro 2008	Estágio no Programa de Apoio ao Ensino (PAE), junto à disciplina: QFL 2426 – Físico química Experimental XVIII – IQ/USP
Fevereiro 2008 – julho 2008	Estágio no Programa de Apoio ao Ensino (PAE), junto à disciplina: QFL 2142 – Fundamentos da Química – IQ/USP
Fevereiro 2007 – julho 2007	Estágio no Programa de Apoio ao Ensino (PAE), junto à disciplina: QFL 2636 – Eletroquímica e Eletroanalítica – IQ/USP
Fevereiro 2006 – julho 2006	Estágio no Programa de Apoio ao Ensino (PAE), junto à disciplina: QFL 314 – Química Orgânica Experimental – IQ/USP
Fev/Jun 2004 – Ago/Nov 2004	Monitor junto à disciplina: Físico-Química I e II Faculdade São Bernardo
Fev/Jun 2003 – Ago/Nov 2003	Monitor junto à disciplina: Físico-Química I e II Faculdade São Bernardo
Fevereiro 2001 – Agosto 2005	Analista Químico Empresa: Houghton do Brasil Ltda. Mauá, São Paulo – Brasil
Abril 1999 – Janeiro 2001	Estagiário Técnico Químico Empresa: Unioil Lubrificantes Ltda. Diadema, São Paulo – Brasil

PUBLICAÇÕES EM PERIÓDICOS CIENTÍFICOS

3. Silveira, L.T., Matsubara, E Y., Rosolen, J.M., Torresi, R.M., Córdoba de Torresi, S.I., "*Electrochemical studies of cytochrome c with ionic liquids onto a new carbon fiber recovered with carbon nanotubes substrate for biosensors application"* em preparação.

2. Camilo, F.F., **Silveira, L.T.,** Torresi R.M., Córdoba de Torresi S.I., "On the stabilization of pernigraniline salt by the synthesis and oxidation of polyaniline in hydrophobic ionic liquids" *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10 (2008) 1457-1462

1. Camilo, F.F., **Silveira, L.T.,** Torresi R.M., Córdoba de Torresi S.I., "Spectro-eletrochemical study of a soluble derivative of poly(aniline) in a room temperature ionic liquid" *Electrochimica Acta*, *53 (2007) 1217-1224*

PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSO

***10 -* Silveira, L. T**., Matsubara, E.Y., Rosolen, J.M., Torresi, R.M., Córdoba de Torresi, S.I., *"Electrochemical behavior of cytochrome c immobilized in a modified carbon nanonutes felts electrode with ionic liquid composite",* apresentado na forma de poster no Workshop Electrochemistry towards high performance systems: the use of nanomaterials, em Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, Dezembro de 2011.

***9 -* Silveira, L. T**., Matsubara, E.Y., Rosolen, J.M., Torresi, R.M., Córdoba de Torresi, S.I., *"Estudo eletroquímico da interação do citocromo c em compósitos com líquido*

iônico e feltros com nanotubos de carbono", apresentado na forma oral no XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – SIBEE, em Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brasil, Agosto de 2011.

***8* - Silveira, L. T**., Matsubara, E.Y., Rosolen, J.M., Torresi, R.M., Córdoba de Torresi, S.I., *"Atividade eletroquímica do citocromo c imobilizado por um novo compósito de hidrogel de quitosana e líquido iônico",* apresentado na forma de pôster na 34^0 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - SBQ, em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, Maio de 2011.

***7* - Silveira, L. T**., Cintra, E.P., Torresi, R.M., Córdoba de Torresi, S.I., *"Electrochemical studies of thin films of poly(5-amino-1-naphthol) in a room temperature ionic liquid",* apresentado na forma de pôster no 61st Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, em Nice, França, Outubro de 2010

***6* - Silveira, L. T**., Limachi D.G.B., Cintra, E.P., Torresi, R.M., Córdoba de Torresi, S.I., *"Eletropolimerização e caracterização eletroquímica do polímero condutor poli(5-amino-1-naftol) em líquido iônico",* apresentado na forma de pôster na 33^0 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - SBQ, em Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, Maio de 2010.

***5* - Silveira, L. T**., Camilo, F.F., Torresi, R.M., Córdoba de Torresi, S.I., *"Uso de líquido iônico na modificação da superfície de eletrodos para imobilização de enzimas",* apresentado na forma de pôster no XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – SIBEE, em Fortaleza, Ceará, Brasil, Abril de 2009.

***4* - Silveira, L. T**., Camilo, F.F., Torresi, R.M., Córdoba de Torresi, S.I., *"Utilização de líquidos iônicos na construção de biossensores enzimáticos",* apresentado na forma de pôster na 31^0 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - SBQ, em Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, Maio de 2008.

***3* - Silveira, L. T**., Camilo, F.F., Torresi, R.M., Córdoba de Torresi, S.I., *"Optimization of conductive porperties of PANI and PPSA conducting polymers in hydrofobic room temperature ionic liquids.",* apresentado na forma de pôster no VI Encontro da SBPMat – 6th Brazilian Meeting, em Natal, Rio Grande do Norte, Brasil, Novembro de 2007.

2 - Silveira, L.T., Camilo, F.F, Córdoba de Torresi, S.I., Torresi, R.M., "*Obtenção da pernigranilina sal do polímero poli(anilina) em líquido iônico*", apresentado na forma oral no XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – SIBEE, Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, Abril de 2007.

1 - Silveira, L. T., Camilo, F.F., Córdoba de Torresi, S.I., *"Comportamento eletroquímico de um copolímero solúvel de poli(anilina) e poli(sulfeto de fenileno) em um novo líquido iônico",* apresentado na forma de pôster na 29ª Reunião Anual da SBQ, Águas de Lindóia, Brasil, Maio de 2006.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS POR OUTROS AUTORES

5 – Córdoba de Torresi**.,** Silveira, L.T., Gonçales, V.R., Matsubara, E.Y., Rosolen, J.M., Nogueira, F.B., Minadeo, M., "*Micro/nanostructured carbon composite applied*

in second and third generation biosensors ", apresentado na forma oral na 220th Electrochemical Society Meeting, em Boston, Estados Unidos, Setembro de 2011

4 – Córdoba de Torresi**.,** Silveira, L.T., Galhardo K.S., "*On The Use Of Ionic Liquids To Immobilize Biomolecules Onto Different Sensing Platforms*", apresentado na forma oral no 62st Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, em Turku, Finlandia, Maio de 2011

3 – Córdoba de Torresi**.,** Silveira, L.T., Camilo, F.F., "*Optimizing thin film deposition and electrolytic media in the search of stable electroactive polymers*", apresentado na forma oral no 61st Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, em Nice, França, Outubro de 2010

2 – Gonçales, V.R., Silveira, L.T., Galhardo K.S., Massafera, M.P.,Córdoba de Torresi, S.I., "*Relação geometria/tamanho/reatividade em materiais nanoestruturados aplicados a sensores e biossensores*", apresentado na forma oral no 2º Workshop do INCTBioanalítica, Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, Maio de 2010.

1 – Limachi, D.G.B., Cintra, E.P., Silveira, L.T.,Córdoba de Torresi, S.I., " Eletroatividade do polímero condutor poli(5-amini-1-naftol) em líquido iônico", apresentado na forma de poster na III Semana de Tecnologia do Instituto Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil, Setembro de 2009.

MONITORIAS E CURSOS COMPLEMENTARES

- Monitor da 6ª Escola de Eletroquímica do Instituto de Química da USP - 2011
- Monitor da 5ª Escola de Eletroquímica do Instituto de Química da USP - 2010
- Monitor da 4ª Escola de Eletroquímica do Instituto de Química da USP - 2009
- Monitor da 3ª Escola de Eletroquímica do Instituto de Química da USP - 2008
- Curso de Técnicas Eletroquímicas localizadas e XPS

  Instituto de Química/USP – Novembro de 2008 – Duração: 6 h
- Monitor da 2ª Escola de Eletroquímica do Instituto de Química da USP - 2007
- Curso de Espectroscopia Vibracional Prof. Oswaldo Sala – VIBROS I

  Instituto de Química/USP – Julho de 2006 – Duração: 30 h