UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Paulo Augusto Raymundo Pereira

**Preparação e caracterização de superfícies bifuncionais nanoestruturadas de Pt/Au
obtidas via *template* para aplicação em sensores e biossensores**

São Carlos

2016

PAULO AUGUSTO RAYMUNDO PEREIRA

Preparação e caracterização de superfícies bifuncionais nanoestruturadas de Pt/Au obtidas via *template* para aplicação em sensores e biossensores

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado.

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2016

DEDICO...

À Deus, pois sem ELE nada se realizaria;

À toda minha família, em especial aos meus pais, Paulo e Fátima, sem os quais nunca chegaria aonde cheguei;

À minha irmã Pauline, por me entender muito bem, ser uma irmã maravilhosa e sempre cuidar de tudo;

Ao meu avô, Pedro Raymundo, *in memoriam*;

Ao meu primo-irmão Bruno Raymundo, o amigo, o companheiro e muitas outras definições que apenas palavras não expressariam tudo o que deveria significar;

O meu mais profundo e sincero Obrigado!!!

AGRADECIMENTOS

Principalmente a DEUS, por estar sempre ao meu lado e em todos os momentos e por realizar todos os meus sonhos, como este.

Ao Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado, pela orientação, confiança, discussões científicas, convívio, incentivo e paciência que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e para meu desenvolvimento pessoal.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Júnior (Chu), pela colaboração, discussões, sugestões e considerações.

Aos amigos do Grupo de Polímeros do Instituto de Física de São Carlos: Dr. Flávio M. Shimizu, Dra. Juliana Coatrini e Andrey Coatrini, pela amizade, interação e cooperação em diversos trabalhos acadêmico-científicos.

À Maria Helena O. Piazzetta, ao Ângelo L. Gobbi e a todo o pessoal do Laboratório de Microfabricação (LMF/LNNano/CNPEM), de Campinas, pela infraestrutura disponibilizada e pelo conhecimento compartilhado.

Aos Profs. Drs. Mauro Bertotti, e Ronaldo Censi Faria, pelas contribuições e enriquecimento deste trabalho.

Aos colegas do Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos (GMEME): Anderson, Camila, Naiza, Codorna, Diego, Erica, Vanessa, Thiago, Polyana, Thiago Canevari e em particular ao Dyovani pela a colaboração com as medidas de AFM e impedância eletroquímica.

Ao Sr. João Tiengo e Dr. Marcelo Calegaro pela ajuda e convívio durante o doutoramento.

À Tamiris Trevisan Negri pela ajuda, apoio e incentivo principalmente com o exame proficiência Toefl.

Às amigas Kátia, Vívian e Milena (As Panteras) pela amizade e excelente convívio no início da minha chegada a São Carlos.

À todos os amigos e funcionários do IQSC/USP, ao STI, em particular ao Flávio Oliveira pela amizade e prontidão para atender as nossas ocorrências computacionais, e a todos do Serviço de Pós-Graduação, pela colaboração, empenho e dedicação. Aos amigos da oficina mecânica do IQSC, em particular ao Ednelson pelos excelentes serviços prestados.

Ao meu “primo-irmão” Bruno Raymundo, pelo apoio, incentivo, amizade, carinho e companheirismo e por estar sempre presente em minha vida.

À toda família Manzano Maria: José Roberto, Roseli, Roberta e Renata, pela amizade, apoio e carinho. Minha segunda família!

À Roberta Manzano Maria pelo amor, carinho, paciência, convívio, grande apoio nos momentos difíceis que passei no qual gostaria de dividir este título.

À Comissão de Pós-Graduação, por não limitar os agradecimentos e assim fazer com que possamos agradecer a todos os necessários.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, atrapalharam e/ou contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e para a obtenção do título de Doutor, tornando esse dia ainda mais saboroso, meus sinceros agradecimentos!

E, por último, porém não menos importante, à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido (Processo 2012/17689-9) e a(o) assessor(a) deste projeto, cujas observações e questões sempre foram de grande valia para o enriquecimento deste trabalho.

Curriculum Vitae

Formação acadêmica/titulação

- 2012** Doutorado em Química Analítica.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Preparação e Caracterização de Superfícies Bifuncionais Nanoestruturadas de Au-Pt Obtidas Via Template Para Aplicação em Sensores e Biossensores
Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2009 - 2011** Mestrado em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
Título: ESTUDO DE FILMES POLIMÉRICOS DE COMPLEXOS A BASE DE TIOFENO-SCHIFF NA CONSTRUÇÃO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS, Ano de obtenção: 2011
Orientador: Prof. Dr. Marcos Fernando de Souza Teixeira
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino Júnior
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2004 - 2008** Graduação em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
Orientador: Prof. Dr. Marcos Fernando de Souza Teixeira
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

- 2012 - 2012** Curso de curta duração em 7ª Escola de Eletroquímica. (Carga horária: 40h).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

Revisor de periódico

1. Biosensors and Bioelectronics

Vínculo

2016 - Atual

2. Analytica Chimica Acta (Print)

Vínculo

2016 - Atual

3. Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and System

Vínculo

2015 - Atual

Prêmios e títulos

2011	PRIMEIRO MELHOR TRABALHO QUÍMICA AMBIENTAL NO 18o ENCONTRO DA SBQ REGIONAL INTERIOR PAULISTA - INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS METEOROLÓGICA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE CHUMBO EM PARTICULADOS ATMOSFÉRICOS, SECRETÁRIA REGIONAL INTERIOR PAULISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA.
2010	HONORABLE MENTION at the XV BRAZILIAN MEETING ON INORGANIC CHEMISTRY (New Mediator for Electrochemical Biosensor Based on Ruthenium Oxo-Complex, Sociedade Brasileira de Química (SBQ).
2015	MELHOR PAINEL APRESENTADO NA SEÇÃO DE ELETROQUÍMICA E ELETROANALÍTICA, REALIZADA DURANTE A 38ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, EM ÁGUAS DE LINDÓIA – SP.

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. SOARES, JULIANA COATRINI, SOARES, ANDREY COATRINI, **Raymundo-Pereira, Paulo Augusto**, RODRIGUES, VALQUIRIA DA CRUZ, SHIMIZU, FLAVIO, MELENDEZ, MATIAS ELISEO, SCAPULATEMPO NETO, CRISTOVAM, CARVALHO, ANDRE LOPES, LEITE, FÁBIO DE LIMA, MACHADO, SERGIO A. S., OLIVEIRA JR., OSVALDO NOVAIS
Adsorption according to the Langmuir-Freundlich model is the detection mechanism of the antigen p53 for early diagnosis of cancer. PCCP. Physical Chemistry Chemical Physics (Print). , v. 18, p. 8412-8418, 2016.
2. VICENTINI, FERNANDO CAMPANHÃ, **Raymundo-Pereira, Paulo A.**, JANEGITZ, BRUNO C., MACHADO, SERGIO A.S., FATIBELLO-FILHO, ORLANDO
Nanostructured carbon black for simultaneous sensing in biological fluids. Sensors and Actuators. B, Chemical. , v.227, p.610 - 618, 2016.
3. **Raymundo-Pereira, Paulo A.**, TEIXEIRA, MARCOS F. S., CAETANO, FÁBIO R., BERGAMINI, MÁRCIO F., MARCOLINO-JÚNIOR, LUIZ H.
A Simple and Rapid Estimation of Totals Polyphenols Based On Carbon Paste Electrode Modified With Ruthenium Oxo-Complex. Electroanalysis (New York, N.Y.). , v.27, p.2371 - 2376, 2015.
4. **Raymundo-Pereira, Paulo A.**, MASCARENHAS, ANA C. V., TEIXEIRA, MARCOS F. S.
Evaluation of the Oxo-bridged Dinuclear Ruthenium Ammine Complex as Redox Mediator in an Electrochemical Biosensor. Electroanalysis (New York, N.Y.). , v.28, p.562 - 569, 2015.
5. CAMPOS, ANDERSON M., **Raymundo-Pereira, Paulo A.**, Cincotto, Fernando H., Canevari, Thiago C., MACHADO, SERGIO A. S.
Sensitive determination of the endocrine disruptor bisphenol A at ultrathin film based on nanostructured hybrid material SiO2/GO/AgNP. Journal of Solid State Electrochemistry (Print). , v.xx, p.xx - yy, 2015.

6. JANEGITZ, BRUNO C., BACCARIN, MARINA, **Raymundo-Pereira, Paulo A.**, DOS SANTOS, FABRÍCIO A., OLIVEIRA, GEISER G., MACHADO, SERGIO A.S., LANZA, MARCOS R.V., FATIBELLO-FILHO, ORLANDO, ZUCOLOTTI, VALTENCIR

The use of dihexadecylphosphate in sensing and biosensing. *Sensors and Actuators. B, Chemical.* , v.220, p.805 - 813, 2015.

7. Canevari, Thiago C., **Raymundo-Pereira, Paulo A.**, LANDERS, RICHARD, MACHADO, SÉRGIO A. S.

Direct Synthesis of Ag Nanoparticles Incorporated on a Mesoporous Hybrid Material as a Sensitive Sensor for the Simultaneous Determination of Dihydroxybenzenes Isomers. *European Journal of Inorganic Chemistry (Print).* , v.33, p. 5746 - 5754, 2013.

8. **Raymundo-Pereira, Paulo A.**, Teixeira, Marcos F.S., FATIBELLO-FILHO, ORLANDO, DOCKAL, EDWARD R., BONIFÁCIO, VIVIANE GOMES, MARCOLINO-JUNIOR, LUIZ H.

Electrochemical sensor for ranitidine determination based on carbon paste electrode modified with oxovanadium (IV) salen complex. *Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems (Print).* , v.33, p.4081 - 4085, 2013.

9. Canevari, Thiago C., **Raymundo-Pereira, Paulo A.**, LANDERS, RICHARD, BENVENUTTI, EDILSON V, MACHADO, SÉRGIO A.S.

Sol-gel thin-film based mesoporous silica and carbon nanotubes for the determination of dopamine, uric acid and paracetamol in urine. *Talanta (Oxford).* , v.116, p.726 - 735, 2013.

10. **Raymundo-Pereira, Paulo A.**, Martin, Cibely S., Bergamini, Marcio F., Bocchi, Nerilso, Teixeira, Marcos F.S.

Electrochemical evaluation of the a carbon-paste electrode modified with spinel manganese(IV) oxide under flow conditions for amperometric determination of lithium. *Electrochimica Acta.* , v.56, p.2552 - 2558, 2011.

11. Teixeira, Marcos F.S., Cincotto, Fernando H., **Raymundo-Pereira, Paulo A.**

Electrochemical investigation of the dimeric oxo-bridged ruthenium complex in aqueous solution and its incorporation within a cation-exchange polymeric film on the electrode surface for electrocatalytic activity of hydrogen peroxide oxidation. *Electrochimica Acta.* , v.56, p.6804 - 6811, 2011.

12. Ferreira-Ceccato, Aline Duarte, Ramos, Ercy Mara Cípulo, de Carvalho, Luiz Carlos Soares, Xavier, Rafaella Fagundes, Teixeira, Marcos Fernando de Souza, **Raymundo-Pereira, Paulo Augusto**, Proença, Camila dos Anjos, de Toledo, Alessandra Choqueta, Ramos, Dionei

Short terms effects of air pollution from biomass burning in mucociliary clearance of Brazilian sugarcane cutters. *Respiratory Medicine.* , v.105, p.1766 - 1768, 2011.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, SHIMIZU, F. M., COELHO, D., OLIVEIRA JUNIOR, O. N., MACHADO, S. A. S.

Biodevice hybrid based on bimetallic interdigitated microelectrodes array for electrochemical biosensing In: XIII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais (XIII SBPMat), 2014, João Pessoa/ PB.

Anais do XIII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais (XIII SBPMat). , 2014.

2. Cardoso C. X., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, LIMA, A. L., TEIXEIRA, M. F. S.

COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO NANOCOMPÓSITO DE PVDF/GRAFITE In: 11º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 2011, Campos do Jordão/SP.

Anais do 11º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS. , 2011.

3. BALDO, T. A., TEIXEIRA, M. F. S., GOMES, H. M., ZARA, F. J., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**

ABSORÇÃO DE METAIS TÓXICOS EM SIRIS-AZUIS (CALLINECTES DANAE) COMPARANDO MACHOS E FÊMEAS In: XXII Congresso de Iniciação Científica (CIC UNESP) - Segunda Fase, 2010, Marília/SP.

Anais do XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP (CIC UNESP). , 2010.

4. BALDO, T. A., TEIXEIRA, M. F. S., GOMES, H. M., ZARA, F. J., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.** ABSORÇÃO DE METAIS TÓXICOS EM SIRIS-AZUIS (CALLINECTES DANAE) COMPARANDO MACHOS E FÊMEAS In: XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP (CIC UNESP), 2010, Presidente Prudente/SP.

Anais do XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP (CIC UNESP). , 2010.

5. PROENÇA, C. A., TEIXEIRA, M. F. S., GOMES, H. M., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.** AVALIAÇÃO DE METAIS POLUENTES EM PARTICULADOS ATMOSFÉRICOS DA REGIÃO DE PRESIDENTE PRUDENTE POR ANÁLISE POLAROGRAFICA In: XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP (CIC UNESP), 2010, Presidente Prudente/SP.

Anais do XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP (CIC UNESP). , 2010.

6. SILVA, L. S., TEIXEIRA, M. F. S., GOMES, H. M., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.** DETERMINAÇÃO DE ZINCO EM ÁGUAS PLUVIAIS POR POLAROGRAFIA In: XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP (CIC UNESP), 2010, Presidente Prudente/SP.

Anais do XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP (CIC UNESP). , 2010.

7. OLIVEIRA, Y. A., TEIXEIRA, M. F. S., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, SILVA, M. R., ÂNGELO, A. C. D.

ESTUDO DO EFEITO DA NANOPARTICULA Pt SOBRE A RESPOSTA ELETROCATALITICA DO COMPLEXO DE VANADIO(IV) In: XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP (CIC UNESP), 2010, Presidente Prudente/SP.

Anais do XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP (CIC UNESP). , 2010.

8. MASCARENHAS, A. C. V., TEIXEIRA, M. F. S., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.** NOVO BIOSSENSOR PARA DETERMINAÇÃO DE GLICOSE In: XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP (CIC UNESP) - Segunda Fase, 2010, Marília/SP.

Anais do XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP (CIC UNESP). , 2010.

9. MASCARENHAS, A. C. V., TEIXEIRA, M. F. S., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.** NOVO BIOSSENSOR PARA DETERMINAÇÃO DE GLICOSE In: XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP (CIC UNESP), 2010, Presidente Prudente/SP.

Anais do XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP (CIC UNESP). , 2010.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **Raymundo-Pereira, Paulo A.**, COELHO, D., SHIMIZU, F. M., OLIVEIRA JUNIOR, O. N., MACHADO, SÉRGIO A. S.

Bifunctional Nanostructured Hybrid Surface Pt/Au-SAM for Biosensing Analysis In: 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (37ª RASBQ), 2015, Águas de Lindóia/SP.

Anais da 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2015.

2. **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, CANEVARI, T. C., MACHADO, SÉRGIO A.S.

Ultrasensitive Simultaneous Determination of Dihydroxybenzenes Isomers at Ultrathin Film Based On Hybrid Material SiO₂/MWCNT Decorated With Ag Nanoparticles In: 16th Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2015, Angra dos Reis/RJ.

Program of the 16th Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry. , 2015. p.120 -

3. Ferreira-Ceccato, Aline Duarte, Ramos, Ercy Mara Cípulo, CARVALHO-JUNIOR, L. C. S., CUISSI, R. C., PESTANA, P. R. S., LEITE, M. R., DAVID, R. M., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, PROENÇA, C. A., TEIXEIRA, M. F. S., OIKAWA, S., TOLEDO, A. C., RAMOS, D.

Long-term effects of biomass burning exposure on nasal mucociliary clearance in Brazilian sugarcane cutters In: European Respiratory Society - ERS Barcelona Annual Congress, 2013, Barcelona.

ERS Barcelona Annual Congress. , 2013. v.P1361. p.2090s -

4. TEIXEIRA, M. F. S., MASCARENHAS, A. C. V., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, SERAPHIM, P. M. Novel Electrochemical Biosensor Based on Mediator Ruthenium Oxo-Complex In: 64th Annual

Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2013, Queretaro.

64th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry - Electrochemistry for a New Era. , 2013. p.p. ISE124448 -

5. **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, CANEVARI, T. C., MACHADO, S. A. S.

Ultrathin Film Based On New Nanocomposite Nafion-Silica-MWCNT For Simultaneous Determination Of Dopamine, Uric Acid and Paracetamol In: XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2013, Campos do Jordão/SP.

Anais do XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica. , 2013.

6. **Raymundo-Pereira, Paulo A.**, Luiz H. Marcolino-Junior, Teixeira, Marcos F.S.

CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DE FILMES POLIMÉRICOS NANOESTRUTURADOS A BASE DE TIOFENO-SCHIFF In: XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE), 2011, Bento Gonçalves/RS.

Anais do XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE). Bento Gonçalves/RS: , 2011.

7. PROENÇA, C. A., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, FERREIRA, A. L., RAMOS, D., GOMES, H. M., TEIXEIRA, M. F. S.

Determinação de Metais Tóxicos em Material Particulado Atmosférico Proveniente das Atividades Canavieiras por Polarografia In: 34 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (34 RASBQ), 2011, Florianópolis/SC.

Anais da 34 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2011.

8. **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, MARCOLINO JUNIOR, L. H., TEIXEIRA, M. F. S.

Filmes poliméricos nanoestruturados de complexos com bases de Tiofeno-Schiff In: 34 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (34 RASBQ), 2011, Florianópolis/SC.

Anais da 34 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2011.

9. **Raymundo-Pereira, Paulo A.**, Luiz H. Marcolino-Junior, Teixeira, Marcos F.S.

FILMES POLIMÉRICOS NANOESTRUTURADOS Poli-[Ni(tiofeno-Salen)] OBTIDOS VIA ELETROPOLIMERIZAÇÃO In: XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE), 2011, Bento Gonçalves/RS.

Anais do XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE). Bento Gonçalves/RS: , 2011.

10. SILVA, L. S., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, GOMES, H. M., TEIXEIRA, M. F. S.

Monitoramento de Cádmi, Chumbo e Cobre Dissolvidos em Águas Pluviais por Polarografia In: 34 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (34 RASBQ), 2011, Florianópolis/SC.

Anais da 34 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ). , 2011.

11. **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, TEIXEIRA, M. F. S.

ESTUDO DE FILMES POLIMÉRICOS DE COMPLEXOS A BASE DE TIOFENO-SCHIFF NA CONSTRUÇÃO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS In: I Simpósio de Pós-graduação em Química, 2010, São José do Rio Preto/SP.

Anais do I Simpósio de Pós-graduação em Química. , 2010.

12. PEREIRA, P. A. R., Freitas, B. H., BOCCHI, N., TEIXEIRA, M. F. S.

Estudo do Desempenho Potenciométrico do Óxido Nanoestruturado $\text{Li}_{1,05}\text{Al}_{0,02}\text{Mn}_{1,98}\text{O}_{3,98}\text{F}_{0,02}$ como Sensor para Íons Lítio In: XVI Encontro de Química da Região Sul: A Química como Ciência, Educação e Tecnologia, 2008, Blumenau/SC.

Anais do XVI Encontro de Química da Região Sul. Blumenau/SC: , 2008.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. **Raymundo-Pereira, Paulo A.**, SHIMIZU, F. M., MACHADO, S. A. S.

Desenvolvimento de Superfície Híbrida Baseada em Arranjo de Microeletrodos Interdigitados Nanoestruturados de Pt/Au In: 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (37ª RASBQ), 2014, Natal/RN.

Anais da 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2014.

2. **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, MARCOLINO JUNIOR, L. H., TEIXEIRA, M. F. S.
Aplicabilidade de Filmes Poliméricos Nanoestruturados A Base de Tiofeno-Schiff para Determinação de Ácido Gálico In: 35 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2012, Águas de Lindóia/SP.

Anais da 35 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ). , 2012.

3. BALDO, T. A., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, ZARA, F. J., GOMES, H. M., TEIXEIRA, M. F. S.
Estudo da Propensão dos *Callinectes danae* em Acumular Metais Tóxicos In: 35 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2012, Águas de Lindóia/SP.

Anais da 35 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ). , 2012.

4. PROENÇA, C. A., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, CARVALHO-JUNIOR, L. C. S., Ferreira-Ceccato, Aline Duarte, RAMOS, D., TEIXEIRA, M. F. S.
Estudo de Metais tóxicos Associados ao Material Particulado Atmosférico na Cidade de Presidente Prudente por Polarografia de Pulso Diferencial In: 35 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2012, Águas de Lindóia/SP.

Anais da 35 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ). , 2012.

5. PROENÇA, C. A., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, FERREIRA, A. L., RAMOS, D., TEIXEIRA, M. F. S.
ANÁLISE DE METAIS TÓXICOS PROVENIENTES DA QUEIMA DE BIOMASSA EM PARTICULADO ATMOSFÉRICO POR POLAROGRAFIA In: 16º Encontro Nacional de Química Analítica - ENQA, 2011, Campos do Jordão/SP.

Anais do 16º Encontro Nacional de Química Analítica - ENQA. , 2011.

6. BALDO, T. A., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, GOMES, H. M., TEIXEIRA, M. F. S.
AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR METAIS TÓXICOS DA REGIÃO ESTUÁRIO SANTOS/SÃO VICENTE ATRAVÉS DA ANÁLISE POLAROGRÁFICA In: 16º Encontro Nacional de Química Analítica (16º ENQA), 2011, Campos do Jordão/SP.

Anais do 16º Encontro Nacional de Química Analítica (16º ENQA). , 2011.

7. PROENÇA, C. A., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, CARVALHO-JUNIOR, L. C. S., RAMOS, D., TEIXEIRA, M. F. S.
AVALIAÇÃO DE Cd, Pb E Cu EM PARTÍCULAS TOTAIS EM SUSPENSÃO (PTS) EM TERMINAL RODOVIÁRIO POR POLAROGRAFIA In: 16º Encontro Nacional de Química Analítica - ENQA, 2011, Campos do Jordão/SP.

Anais do 16º Encontro Nacional de Química Analítica - ENQA. , 2011.

8. BALDO, T. A., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, GOMES, V. M., ZARA, F. J., GOMES, H. M., TEIXEIRA, M. F. S.
ESTUDO DA VIABILIDADE DOS SIRIS-AZUIS "*Callinectes danae*" COMO BIOINDICADORES PARA ANÁLISE DE METAIS TRAÇOS UTILIZANDO A TÉCNICA DE PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (ICP) In: 16º Encontro Nacional de Química Analítica (16º ENQA), 2011, Campos do Jordão/SP.

Anais do 16º Encontro Nacional de Química Analítica (16º ENQA). , 2011.

9. PROENÇA, C. A., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, de Carvalho, Luiz Carlos Soares, FERREIRA, A. L., RAMOS, D., TEIXEIRA, M. F. S.
Influência das Variáveis Meteorológica sobre a Concentração de Chumbo em Particulados Atmosféricos In: 18º Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química-IPWS, 2011, São José do Rio Preto/SP.

Anais do 18º Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química-IPWS. , 2011.

10. BALDO, T. A., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, ZARA, F. J., GOMES, H. M., TEIXEIRA, M. F. S.
UTILIZAÇÃO DO BIOINDICADOR, *Callinectes danae*, PARA A QUANTIFICAÇÃO DE METAIS TÓXICOS PELA TÉCNICA DE POLAROGRAFIA DE PULSO DIFERENCIAL In: 18º Encontro da SBQ - Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, 2011, São José do Rio Preto/SP.

Anais do 18º Encontro da SBQ - Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti. , 2011.

11. BALDO, T. A., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, GOMES, H. M., ZARA, F. J., TEIXEIRA, M. F. S. Análise de Cádmio, Chumbo e Cobre por Polarografia em Siris-Azuis (*Callinectes danae*) Provenientes do Estuário de São Vicente/Santos In: 33 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2010, Águas de Lindóia/SP.

Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2010.

12. BALDO, T. A., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, GOMES, H. M., ZARA, F. J., TEIXEIRA, M. F. S. Avaliação da Contaminação por Metais Tóxicos (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+}) em Siris-Azuis (*Callinectes danae*) Utilizando Polarografia In: XVII Encontro de Química da Região Sul (SBQ-Sul), 2010, Curitiba/PR.

Anais do XVII Encontro de Química da Região Sul (SBQ Sul). , 2010.

13. PROENÇA, C. A., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, GOMES, H. M., TEIXEIRA, M. F. S. Avaliação de Metais Poluentes em Particulados Atmosféricos por Análise Polarográfica In: XVII Encontro de Química da Região Sul (SBQ-Sul), 2010, Curitiba/PR.

Anais do XVII Encontro de Química da Região Sul (SBQ Sul). , 2010.

14. MASCARENHAS, A. C. V., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, TEIXEIRA, M. F. S. BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO DE SEGUNDA GERAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE GLICOSE In: 33 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2010, Águas de Lindóia/SP.

Anais da 33 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2010.

15. OLIVEIRA, Y. A., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, TEIXEIRA, M. F. S. COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DE UM ELETRODO MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE Pt/C E COMPLEXO DE VANÁDIO In: 33 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2010, Águas de Lindóia/SP.

Anais da Sociedade Brasileira de Química (SBQ). , 2010.

16. SILVA, L. S., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, GOMES, H. M., TEIXEIRA, M. F. S. Determinação de Zinco em Águas Pluviais por Polarografia In: XVII Encontro de Química da Região Sul (SBQ-Sul), 2010, Curitiba/PR.

Anais do XVII Encontro de Química da Região Sul (SBQ Sul). , 2010.

17. **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, TEIXEIRA, M. F. S. ELETRODO DE PLATINA MODIFICADO COM OXO-COMPLEXO POLIPÍRIDIL DINUCLEAR DE RUTÊNIO: UM PROMISSOR SENSOR ELETROQUÍMICO In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2010, Águas de Lindóia/SP.

ANAIS DA 33 REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA (SBQ). , 2010.

18. **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, MARCOLINO JUNIOR, L. H., TEIXEIRA, M. F. S. ESTUDO DE FILMES POLIMÉRICOS DE COMPLEXOS A BASE DE TIOFENO-SCHIFF NA CONSTRUÇÃO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS In: XVII Encontro de Química da Região Sul (SBQ-Sul), 2010, Curitiba/PR.

Anais do XVII Encontro de Química da Região Sul (SBQ-Sul). , 2010.

19. OLIVEIRA, Y. A., **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, SILVA, M. R., ÂNGELO, A. C. D., TEIXEIRA, M. F. S.

Estudo Eletroquímico de um Eletrodo Modificado com Nanocompósito Pt/C-VO(5metil-salen)-Nafion In: XVII Encontro de Química da Região Sul (SBQ-Sul), 2010, Curitiba/PR.

Anais do XVII Encontro de Química da Região Sul (SBQ Sul). , 2010.

20. **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.**, MASCARENHAS, A. C. V., TEIXEIRA, M. F. S. NEW MEDIATOR FOR ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR BASED ON RUTHENIUM OXO-COMPLEX In: XV BRAZILIAN MEETING ON INORGANIC CHEMISTRY, 2010, Angra dos Reis/RJ.

ANAIS XV BRAZILIAN MEETING ON INORGANIC CHEMISTRY. , 2010.

21. **PEREIRA, P. A. R.**, MARCOLINO JUNIOR, L. H., CAETANO, F. R., BERGAMINI, M. F., TEIXEIRA, M. F. S.

Desenvolvimento de um EPCM com Oxo-complexo Polipiridil Dinuclear de Rutênio para

Determinação de Polifenóis Totais em Amostras Reais In: 15° Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA) e 3° Congresso Iberoamericano de Química Analítica (CIAQA), 2009, Salvador/BA.

Anais do 15° Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA) e 3° Congresso Iberoamericano de Química Analítica (CIAQA). , 2009.

22. TEIXEIRA, M. F. S., BOCCHI, N., **PEREIRA, P. A. R.**

Desenvolvimento de um Sensor para Íons Lítio Baseado na Nanoestrutura Espinélio $\text{Li}_{1,05}\text{Al}_{0,02}\text{Mn}_{1,98}\text{O}_{3,98}\text{F}_{0,02}$ In: Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - SIBEE, 2009, Fortaleza - CE.

Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica. , 2009.

23. Freitas, B. H., BOCCHI, N., PEREIRA, P. A. R., TEIXEIRA, M. F. S.

Estudo da Resposta Potenciométrica do Óxido $\text{Li}_{1,05}\text{Al}_{0,02}\text{Mn}_{1,98}\text{O}_4$ na Otimização de Sensor Seletivo para Íons Lítio In: 31 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia.

31 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2008.

24. PEREIRA, P. A. R., BRITO, I. A. O., Martin, C. S., Lanfredi, S., Nobre M. A. L.

Análise do Efeito da Distribuição de Cátions Zn^{2+} na Estrutura do Espinélio Inverso $\text{Zn}_7\text{Sb}_2\text{O}_{12}$ Sobre o Parâmetro de Rede. In: 30 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia.

30 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2007.

25. PEREIRA, P. A. R., Martin, C. S., LIMA, A. R. F., Lanfredi, S., Nobre M. A. L.

Preparação de Partículas Nanométricas Amorfas de $\text{Zn}_7\text{Sb}_2\text{O}_{12}$ In: 30 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia.

30 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2007.

26. PEREIRA, P. A. R., VITRO, P. H., Martin, C. S., Lanfredi, S., Nobre M. A. L.

Análise Distribuição de Tamanho de Poros em Pós Nanométricos do Óxido Tipo Espinélio Inverso $\text{Zn}_7\text{Sb}_2\text{O}_{12}$ Dopado com metais de transição Mn^{2+} , Co^{2+} e Cr^{3+} Obtida por Síntese Química In: XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2006, Bauru.

XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP. , 2006.

27. ALVES, W., PEREIRA, P. A. R., SALMAZO, L. O., FURLAN, M., TEIXEIRA, M. F. S., Nobre M. A. L., Lanfredi, S.

Efeito da Pressão de Compactação e Temperatura de Sinterização Sobre a Densificação de Cerâmicas de $\text{KSr}_2\text{Nb}_5\text{O}_{15}$ Preparadas Via Moagem de Alta Eficiência In: XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2006, Bauru.

XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP. , 2006.

28. PEREIRA, P. A. R., Nobre M. A. L., Lanfredi, S.

Efeitos da Temperatura de Pós-Cerâmicos de solução sólida $\text{Zn}_5\text{CoCrSb}_2\text{O}_{12}$: Metodologia de Análise Baseada em Medidas de Adsorção-Desorção de Nitrogênio. In: XVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2005, Presidente Prudente.

XVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp. , 2005.

29. PEREIRA, P. A. R., Lanfredi, S., TEIXEIRA, S. R., Nobre M. A. L.

Efeitos da Temperatura de Preparação de Pós Cerâmicos de Solução Sólida $\text{Zn}_5\text{CoCrSb}_2\text{O}_{12}$: Metodologia de Análise Baseada em Medidas de Adsorção-Desorção de Nitrogênio. In: XVII Congresso de Iniciação Científica, 2005, Presidente Prudente.

XVII Congresso de Iniciação Científica. , 2005.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **Raymundo-Pereira, Paulo A.**, COELHO, D., SHIMIZU, F. M., OLIVEIRA JUNIOR, O. N., MACHADO, SÉRGIO A.S.

Bifunctional Nanostructured Hybrid Surface Pt/Au-SAM for Biosensing Analysis, 2015. (Congresso, Apresentação de Trabalho).

2. **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A., CANEVARI, T. C., MACHADO, SÉRGIO A.S.**
Ultrassensitive Simultaneous Determination of Dihydroxybenzenes Isomers at Ultrathin Film Based On Hybrid Material SiO₂/MWCNT Decorated With Ag Nanoparticles, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho).
3. **Raymundo-Pereira, Paulo A., SHIMIZU, F. M., COELHO, D., OLIVEIRA JUNIOR, O. N., Machado, S. A. A.**
Biodevice hybrid based on bimetallic interdigitated microelectrodes array for electrochemical biosensing, 2014. (Congresso,Apresentação de Trabalho).
4. **Raymundo-Pereira, Paulo A., SHIMIZU, F. M., MACHADO, S. A. S.**
Desenvolvimento de Superfície Híbrida Baseada em Arranjo de Microeletrodos Interdigitados Nanoestruturados de Pt/Au, 2014. (Congresso,Apresentação de Trabalho).
5. **Raymundo-Pereira, Paulo A., Canevari, Thiago C., Machado, S. A. A.**
Ultrathin Film Based On New Nanocomposite Nafion-Silica MWCNT For Simultaneous Determination Of Dopamine, Uric Acid and Paracetamol, 2013. (Simpósio,Apresentação de Trabalho).
6. **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A., MARCOLINO JUNIOR, L. H., TEIXEIRA, M. F. S.**
Aplicabilidade de Filmes Poliméricos Nanoestruturados A Base de Tiofeno-Schiff para Determinação de Ácido Gálico, 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho).
7. **Raymundo-Pereira, Paulo A., Luiz H. Marcolino-Junior, Teixeira, Marcos F.S.**
CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DE FILMES POLIMÉRICOS NANOESTRUTURADOS A BASE DE TIOFENO-SCHIFF, 2011. (Simpósio,Apresentação de Trabalho).
8. **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A., MARCOLINO JUNIOR, L. H., TEIXEIRA, M. F. S.**
Filmes poliméricos nanoestruturados de complexos com bases de Tiofeno-Schiff, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho).
9. **Raymundo-Pereira, Paulo A., Teixeira, Marcos F.S., Luiz H. Marcolino-Junior**
FILMES POLIMÉRICOS NANOESTRUTURADOS Poli-[Ni(tiofeno-Salen) OBTIDOS VIA ELETROPOLIMERIZAÇÃO, 2011. (Simpósio,Apresentação de Trabalho).
10. **BALDO, T. A., RAYMUNDO-PEREIRA, P. A., GOMES, H. M., ZARA, F. J., TEIXEIRA, M. F. S.**
UTILIZAÇÃO DO BIOINDICADOR, Callinectes danae, PARA A QUANTIFICAÇÃO DE METAIS TÓXICOS PELA TÉCNICA DE POLAROGRAFIA DE PULSO DIFERENCIAL, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
11. **BALDO, T. A., RAYMUNDO-PEREIRA, P. A., GOMES, H. M., ZARA, F. J., TEIXEIRA, M. F. S.**
Análise de Cádmio, Chumbo e Cobre por Polarografia em Siris-Azuís (Callinectes danae) Provenientes do Estuário de São Vicente/Santos, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho).
12. **MASCARENHAS, A. C. V., RAYMUNDO-PEREIRA, P. A., TEIXEIRA, M. F. S.**
BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO DE SEGUNDA GERAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE GLICOSE, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho).
13. **OLIVEIRA, Y. A., RAYMUNDO-PEREIRA, P. A., TEIXEIRA, M. F. S.**
COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DE UM ELETRODO MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE Pt/C E COMPLEXO DE VANÁDIO, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho).
14. **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A., TEIXEIRA, M. F. S.**
ELETRODO DE PLATINA MODIFICADO COM OXO-COMPLEXO POLIPÍRIDIL DINUCLEAR DE RUTÊNIO: PROMISSOR SENSOR ELETROQUÍMICO, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho).
15. **RAYMUNDO-PEREIRA, P. A., TEIXEIRA, M. F. S.**

ESTUDO DE FILMES POLIMÉRICOS DE COMPLEXOS A BASE DE TIOFENO-SCHIFF NA CONSTRUÇÃO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS, 2010. (Simpósio,Apresentação de Trabalho).

16. RAYMUNDO-PEREIRA, P. A., MARCOLINO JUNIOR, L. H., TEIXEIRA, M. F. S.
ESTUDO DE FILMES POLIMÉRICOS DE COMPLEXOS A BASE DE TIOFENO-SCHIFF NA CONSTRUÇÃO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS., 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho).

17. RAYMUNDO-PEREIRA, P. A., MASCARENHAS, A. C. V., TEIXEIRA, M. F. S.
NEW MEDIATOR FOR ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR BASED ON RUTHENIUM OXO-COMPLEX, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho).

18. RAYMUNDO-PEREIRA, P. A., MARCOLINO JUNIOR, L. H., CAETANO, F. R., BERGAMINI, M. F., TEIXEIRA, M. F. S.
Desenvolvimento de um EPCM com Oxo-complexo Polipiridil Dinuclear de Rutênio para Determinação de Polifenóis Totais em Amostras Reais, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho).

19. TEIXEIRA, S. R., PEREIRA, P. A. R., BOCCHI, N.
Desenvolvimento de um Sensor para Íons Lítio Baseado na Nanoestrutura Espinélio $\text{Li}_{1,05}\text{Al}_{10,02}\text{Mn}_{1,98}\text{O}_{3,98}\text{F}_{0,02}$, 2009. (Simpósio,Apresentação de Trabalho).

20. TEIXEIRA, M. F. S., PEREIRA, P. A. R., BOCCHI, N.
Desenvolvimento de um Sensor para Íons Lítio Baseado na Nanoestrutura Espinélio $\text{Li}_{1,05}\text{Al}_{10,02}\text{Mn}_{1,98}\text{O}_{3,98}\text{F}_{0,02}$, 2009. (Simpósio,Apresentação de Trabalho).

21. Freitas, B. H., PEREIRA, P. A. R., BOCCHI, N., TEIXEIRA, M. F. S.
Estudo da Resposta Potenciométrica do Óxido $\text{Li}_{1,05}\text{Al}_{10,02}\text{Mn}_{1,98}\text{O}_4$ na Otimização de um Sensor seletivo para Íons Lítio, 2008. (Congresso,Apresentação de Trabalho).

22. PEREIRA, P. A. R., Freitas, B. H., BOCCHI, N., TEIXEIRA, M. F. S.
Estudo do Desempenho Potenciométrico do Óxido Nanoestruturado $\text{Li}_{1,05}\text{Al}_{10,02}\text{Mn}_{1,98}\text{O}_{3,98}\text{F}_{0,02}$ como Sensor para Íons Lítio, 2008. (Congresso,Apresentação de Trabalho).

23. PEREIRA, P. A. R., BRITO, I. A. O., Martin, C. S., Lanfredi, S., Nobre M. A. L.
Análise do Efeito da distribuição de Cátions Zn^{2+} na estrutura do Espinélio Inverso $\text{Zn}_7\text{Sb}_2\text{O}_{12}$ Sobre o Parâmetro de Rede, 2007. (Congresso,Apresentação de Trabalho).

24. PEREIRA, P. A. R., Nobre M. A. L., Lanfredi, S.
Caracterização Estrutural do Niobato de Potássio e Estrôncio Dopado com Ferro da Família Tetragonal Tungstênio Bronze, 2007. (Congresso,Apresentação de Trabalho).

25. PEREIRA, P. A. R., LIMA, A. R. F., Martin, C. S., Lanfredi, S., Nobre M. A. L.
Preparação de Partículas Nanométricas Amorfas de $\text{Zn}_7\text{Sb}_2\text{O}_{12}$, 2007. (Congresso,Apresentação de Trabalho).

26. PEREIRA, P. A. R., Lanfredi, S., Nobre M. A. L.
Análise Distribuição de Tamanho de Poros em Pós Nanométricos do Óxido Tipo Espinélio Inverso $\text{Zn}_7\text{Sb}_2\text{O}_{12}$ Dopado com Metais de Transição Mn^{2+} , Co^{2+} e Cr^{3+} Obtido Por Síntese Química, 2006. (Congresso,Apresentação de Trabalho).

27. ALVES, W., PEREIRA, P. A. R., Nobre M. A. L., Lanfredi, S.
Efeito da Pressão de Compactação e Temperatura de Sinterização Sobre a Densificação de Cerâmicas de $\text{KSr}_2\text{Nb}_5\text{O}_{15}$ Preparadas Via Moagem de Alta Eficiência, 2006. (Congresso,Apresentação de Trabalho).

28. PEREIRA, P. A. R., Lanfredi, S., Nobre M. A. L.
Efeitos da Temperatura de Preparação de Pós-cerâmicos de Solução Sólida $\text{Zn}_5\text{CoCrSb}_2\text{O}_{12}$: Metodologia de Análise Baseada em Medidas de Adsorção-desorção de Nitrogênio, 2005.

“Nunca considere seu estudo como uma obrigação, mas sim como a oportunidade indescritível de aprender sobre a influência libertadora da beleza no domínio do espírito, para seu prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual pertencerá seu trabalho.”

Albert Einstein

RESUMO

Superfícies híbridas nanoestruturadas Pt/Au com os depósitos de Au de 20, 50 e 100 nm de espessura foram obtidas pelo processo fotolitográfico. O molde utilizado foi um arranjo de microeletrodos interdigitados. As superfícies híbridas nanoestruturadas Pt/Au contendo 20, 50 e 100 nm de Au desenvolvidas foram caracterizadas por microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica, voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. Então, aplicadas como sensores para detecção eletroquímica dos biomarcadores ácido ascórbico, ácido úrico, dopamina, hidroquinona e nitrito. Numa segunda etapa, as nanoestruturas de ouro foram recobertas com monocamada auto-organizada (self-assembled monolayers – SAM) de alcanotiol (cistamina, ácido mercaptoacético e 11-mercaptopundecanóico) visando a preparação da superfície para imobilização de biomoléculas, incluindo enzimas e anticorpos. A superfície híbrida bimetalica bifuncional nanoestruturada Pt/Au-SAM foi obtida realizando-se varreduras cíclicas em solução contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 em intervalos de varreduras de potenciais específicos para cada SAM, através deste procedimento foi possível remover a SAM somente da superfície da platina e mantendo sobre as nanoestruturas de ouro. A enzima glicose oxidase (*Aspergillus niger*) foi imobilizada por ligação covalente com auxílio de EDC/NHS e o ferroceno foi utilizado como mediador de elétrons. A caracterização eletroquímica foi feita em solução aquosa contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico supra puro e em solução contendo $5,0 \text{ mmol}$ da sonda redox ferrocianeto e ferricianeto de potássio utilizando-se a técnica de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. O peróxido de hidrogênio formado como produto da reação da catálise enzimática foi determinado sobre a superfície da platina em solução contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PBS. A constante cinética aparente de Michaelis-Menten (K_M^{app}) e a constante catalítica K_{cat} foram calculadas e comparadas com outros transdutores relatados na literatura. A terceira aplicação foi a utilização desta superfície híbrida como um imunossensor eletroquímico para detecção de cortisol salivar. O anticorpo Anti-cortisol foi imobilizado com auxílio de EDC/NHS a SAM. Esse dispositivo foi imerso em soluções contendo $3,1 \times 10^{-15}$ – $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cortisol. A relação sinal-concentração foi obtida através da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica observando-se a variação de transferência de carga com relação à variação de concentração de cortisol adsorvido ao dispositivo Pt/Au/SAM/Anticorpo-cortisol. Os limites de detecção obtidos foram 0,08, 207, 0,3, 11,1, 11,3, $0,2 \times 10^{-6}$ e $9,3 \times 10^{-13} \text{ mol L}^{-1}$ para glicose, ácido ascórbico, dopamina, hidroquinona, nitrito e ácido úrico, respectivamente.

Palavras-chave: Superfície híbrida nanoestruturada, sensores, biossensores, imunossensores, biomarcadores, ácido úrico, ácido ascórbico, dopamina, hidroquinona, glicose, cortisol.

ABSTRACT

Nanostructured hybrid surfaces Pt/Au containing 20, 50 and 100 nm of Au was obtained by the photolithographic process. The template used was an interdigitated microelectrodes array. The nanostructured hybrid surfaces Pt/Au containing 20, 50 and 100 nm of Au was characterized by optical microscopy, scanning electron microscopy, atomic force microscopy, cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. Then, applied as sensors for electrochemical detection of biomarkers ascorbic acid, uric acid, dopamine, hydroquinone and nitrite. In a second step, the gold nanostructures were coated with self-assembled monolayer (self-assembled monolayers - SAM) of alkanethiol (cystamine, mercaptoacetic acid and 11-mercaptopundecanoic acid) aiming at preparing the surface for biomolecule immobilization, including enzymes and antibodies. The bifunctional nanostructured hybrid surface Pt/Au-SAM was obtained by performing cyclic scans solution containing $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ at specific potential scans intervals for each SAM through this procedure was only possible to remove the SAM the platinum surface and holding on the gold nanostructures. The enzyme glucose oxidase (*Aspergillus niger*) was immobilized with EDC/NHS and ferrocene was used as an electron mediator. The electrochemical characterization was performed in an aqueous solution containing 0.1 mol L^{-1} of sulfuric acid and in a solution containing 5.0 mmol of potassium ferrocyanide and ferricyanide redox probe using cyclic voltammetry technique and electrochemical impedance spectroscopy. The hydrogen peroxide formed as a product of the enzyme-catalyzed reaction was measured on the surface of platinum solution containing 0.1 mol L^{-1} PBS. The apparent Michaelis-Menten kinetic constant (K_M^{app}) and the catalytic constant k_{cat} were calculated and compared with other transducers reported in the literature. The third application was the use of this hybrid surface and an electrochemical immunosensor for detecting salivary cortisol. Anti-cortisol antibody was immobilized at the SAM (mercaptoacetic acid) with EDC/NHS. This device was dipped in solutions containing 3.1×10^{-15} - $1.5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ of cortisol. The signal-concentration relationship was obtained by electrochemical impedance spectroscopy technique of observing the variation in load transfer with respect to variation of cortisol concentration device adsorbed to Pt/Au/SAM/antibody-cortisol. The detection limit obtained were 0.08, 207, 0.3, 11.1, 11.3, $0.2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ for glucose, ascorbic acid, dopamine, hydroquinone, nitrite, uric acid, respectively.

Keywords: Nanostructured hybrid surface, sensors, biosensors, immunosensors, biomarkers, uric acid, ascorbic acid, dopamine, hydroquinone, glucose, cortisol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Representação esquemática da eletrodeposição de nanoestruturas de ouro sobre eletrodo de platina modificado com template (matriz unidirecional).....	30
Figura 1.2 – Representação esquemática dos processos fotolitográficos em função da via escolhida: (a) etching e (b) lift-off. O efeito do fotorresiste positivo (+) ou negativo (–) também é ilustrado.	33
Figura 3.1 – Representação esquemática de uma célula eletroquímica utilizada nas medidas voltamétricas. ER – eletrodo de referência (Ag/AgCl); ET – eletrodo de trabalho (platina); EA – eletrodo auxiliar (Pt).	39
Figura 4.1 – Esquema geral do processo de fabricação da superfície híbrida bimetalúca baseada no arranjo de microeletrodos interdigitados nanoestruturados de platina/ouro. As setas indicam a sequência das etapas de fabricação.	42
Figura 4.2 – Representação esquemática da máscara utilizada para gravação do padrão.....	43
Figura 4.3 – Representação do modelo de circuito equivalente utilizado para análise dos dados obtidos com os gráficos de plano complexo obtidos com a EIE.....	45
Figura 4.4 – Fórmulas estruturais dos alcanotóis ácido mercaptoacético (MAA), 11-mercaptoundecanóico (11-MUA) e cistamina (CYS) utilizados para obtenção da monocamada auto-organizada.	46
Figura 4.5 – Representação esquemática de preparação da superfície híbrida nanoestruturada Pt/Au.....	47
Figura 5.1 – Imagens de microscopia ótica da SHN-Pt/Au. As imagens (A), (B) e (C) foram obtidas em diferentes regiões de superfícies contendo 20, 50 e 100 nm de espessura de ouro, respectivamente.	49
Figura 5.2 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura da SHN-Pt/Au. As imagens (A), (B) e (C) foram obtidas em três superfícies distintas contendo 20, 50 e 100 nm de espessura de ouro, respectivamente.	50
Figura 5.3 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura da SHN-Pt/Au. As imagens foram obtidas em três superfícies contendo 20, 50 e 100 nm de espessura de ouro, e com ampliações de 2.000, 3.000 e 5.000 vezes, respectivamente.....	51
Figura 5.4 – Imagens de microscopia de força atômica modo operacional não contato, das SHN-Pt/Au com espessuras de 20 (A) e (D), 50 (B) e (E), 100 (C) e (F) nm de ouro.....	52
Figura 5.5 – Imagens topográficas da SHN-Pt/Au com 20 nm de espessura de ouro.....	53
Figura 5.6 – Imagens topográficas da SHN-Pt/Au com 50 nm de espessura de ouro.....	54
Figura 5.7 – Imagens topográficas da SHN-Pt/Au com 100 nm de espessura de ouro.....	55

Figura 5.8 – Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de platina em solução contendo 0,1 mol L ⁻¹ de ácido sulfúrico com velocidade de varredura de 1000 mV s ⁻¹ , 500 mV s ⁻¹ , 250 mV s ⁻¹ e 100 mV s ⁻¹	57
Figura 5.9 – Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo convencional de ouro policristalino em solução contendo 0,1 mol L ⁻¹ de H ₂ SO ₄ com velocidade de varredura de 1000 mV s ⁻¹ , 500 mV s ⁻¹ , 250 mV s ⁻¹ e 100 mV s ⁻¹	59
Figura 5.10 – Voltamogramas cíclicos obtidos em solução contendo 0,1 mol L ⁻¹ de H ₂ SO ₄ para os eletrodos de Pt (a) e Au (b) convencionais e para a SHN-Pt/Au-100nm (c). Velocidade de varredura de 1000 mV s ⁻¹	61
Figura 5.11 – Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução contendo 0,1 mol L ⁻¹ de KCl e 5,0 mmol L ⁻¹ da sonda redox [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ /[Fe(CN) ₆] ³⁻ para a superfície de platina e ouro puros e para a SHN-Pt/Au-50 nm, em potencial de circuito aberto. Faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz e onda senoidal de 10 mV.....	62
Figura 5.12 – Voltamogramas cíclicos obtidos em solução contendo 0,1 mol L ⁻¹ de H ₂ SO ₄ para superfície de Pt e para as três SHN-Pt/Au com espessura de 20, 50 e 100 nm de Au. Velocidade de varredura de 1000 mV s ⁻¹	64
Figura 5.13 – Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução contendo 0,1 mol L ⁻¹ de KCl e 5,0 mmol L ⁻¹ da sonda redox [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ /[Fe(CN) ₆] ³⁻ para a SHN-Pt/Au contendo 20, 50 e 100 nm de ouro, em potencial de circuito aberto. Faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz e onda senoidal de 10 mV.	66
Figura 5.14 – Voltamogramas cíclicos obtidos em solução contendo 5,0 mmol L ⁻¹ da sonda redox [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} em 0,1 mol L ⁻¹ de KCl a uma velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ para os eletrodos convencionais de Pt (A) e Au (B). Etapa de dessorção seletiva (DS) da monocamada auto organizada em (C) e (D) em solução contendo 0,1 mol L ⁻¹ de H ₂ SO ₄ após 100 ciclos a 1000 mV s ⁻¹ , respectivamente. Cada voltamograma cíclico corresponde a um intervalo de varredura de potenciais utilizados na DS em solução contendo 0,1 mol L ⁻¹ de H ₂ SO ₄	68
Figura 5.15 – Voltamogramas cíclicos obtidos em solução contendo 5,0 mmol L ⁻¹ da sonda redox [Fe(CN) ₆] ^{4-/3-} em 0,1 mol L ⁻¹ de KCl a uma velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ para SHN-Pt/Au (a), Pt/Au/SAM (b) e Pt/Au-SAM _{dessorção seletiva} (c).	70
Figura 5.16 – Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução contendo 0,1 mol L ⁻¹ de KCl e 5,0 mmol L ⁻¹ da sonda redox [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ /[Fe(CN) ₆] ³⁻ para a SHN-Pt/Au (a), Pt/Au/SAM (b) e Pt/Au-SAM _{dessorção seletiva} (c) em potencial de circuito aberto. Faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz e onda senoidal de 10 mV.....	71
Figura 5.17 – Representação esquemática para preparação da superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM _{dessorção seletiva} . As setas indicam a sequência das etapas de preparação.	73

Figura 5.18 – Voltamogramas cíclicos obtidos em solução contendo 5,0 mmol L ⁻¹ da sonda redox [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} em 0,1 mol L ⁻¹ de KCl a uma velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	75
Figura 5.19 – Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução contendo 0,1 mol L ⁻¹ de KCl e 5,0 mmol L ⁻¹ da sonda redox [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ /[Fe(CN) ₆] ³⁻ para a superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM _{DS} -Fe-GOx (A) em potencial de circuito aberto. Faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz, onda senoidal de 10 mV. (B) <i>Inset</i> da Figura 5.19 (A).....	76
Figura 5.20 – Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ na ausência e na presença de 1,25–14,8 µmol L ⁻¹ de glicose para a SHB-Pt/Au-SAM _{DS} -Fe-GOx (SAM: Cistamina (A), ácidos mercaptoacético (B) e 11-mercaptoundecanóico (C))......	77
Figura 5.21 – Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ na presença de 2,50 µmol L ⁻¹ de glicose para a SHB-Pt/Au-SAM _{DS} -Fe-GOx (SAM: ácido mercaptoacético) contendo 20 (a), 50 (b) e 100 (c) nm de espessura de Au.....	80
Figura 5.22 – Relação do potencial de pico anódico e corrente de pico anódico com a espessura das nanoestruturas de ouro na SHB-Pt/Au-SAM _{DS} -Fe-GOx. Dados extraídos da Figura 5.21.....	81
Figura 5.23 – Relação da tangente das curvas analítica (<i>slope</i>) obtidas com 20, 50 e 100 nm de espessura de Au da SHB-Pt/Au-SAM _{DS} -Fe-GOx.	82
Figura 5.24 – Voltamogramas cíclicos para a superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM-Fe-GOx (SAM: ácido mercaptoacético) obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ na presença de 1,25–14,8 µmol L ⁻¹ de glicose.....	83
Figura 5.25 – Curva analítica obtida para a superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM-Fe-GOx.	84
Figura 5.26 – Voltamogramas de pulso diferencial para a superfície híbrida nanoestruturada Pt/Au obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ na presença de 8.17–100 µmol L ⁻¹ de ácido ascórbico (A); 0.27–1.73 µmol L ⁻¹ de dopamina (B); 14.5–678 µmol L ⁻¹ de hidroquinona (C); 49.9–247 µmol L ⁻¹ de nitrito (D); 0,4 – 0.98 µmol L ⁻¹ de ácido úrico (E).	88
Figura 5.27 – Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ contendo 5,0 mmol L ⁻¹ das sondas redox para o imunossensor Pt/Au/SAM/Anticortisol na ausência e na presença de 1,0 x 10 ⁻¹² – 1,0 x 10 ⁻³ g mL ⁻¹ (3.1 x 10 ⁻¹⁵ – 2.7 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹) de cortisol (A). Respetivos <i>fitting</i> em (B).	92
Figura 5.28 – Curva analítica obtida com o imunossensor Pt/Au/SAM/Anti-cortisol.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Parâmetros obtidos a partir dos espectros de plano complexo (Figura 5.11) para a superfície de platina e ouro puros e para a SHN-Pt/Au-50 nm.	63
Tabela II – Parâmetros obtidos a partir dos espectros de plano complexo (Figura 5.13) para as SHN-Pt/Au contendo 20, 50 e 100 nm de espessura de ouro.	67
Tabela III – Parâmetros obtidos a partir dos espectros de plano complexo (Figura 5.16) para a SHN-Pt/Au, Pt/Au/SAM e Pt/Au-SAM _{dessorção seletiva} contendo 50 nm de espessura de Au...	72
Tabela IV – Intervalo de varredura de potenciais para obtenção da SHN-Pt/Au-SAM _{dessorção seletiva}	74
Tabela V – Comparação entre o biossensor proposto com outros transdutores recentemente publicados.	85
Tabela VI – Valores de K_M^{app} para diferentes transdutores contendo glicose oxidase.	86
Tabela VII – Características analíticas para detecção dos biomarcadores ácido ascórbico, ácido úrico, dopamina, hidroquinona e nitrito.	91

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	Síntese assistida por moldes	29
1.2	Fotolitografia	31
1.3	Superfícies Híbridas Bimetálicas Nanoestruturadas	33
1.4	Biomarcadores	34
1.4.1	Biomarcadores de Câncer	36
2	OBJETIVOS	38
3	INSTRUMENTAÇÃO BÁSICA	38
3.1	Balança Analítica	38
3.2	Medidas Voltamétricas	38
3.3	Medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	40
3.4	Medidas com Microscopia de Força Atômica	40
3.5	Medidas com Microscopia Óptica	40
3.6	Microscopia Eletrônica de Varredura	40
4	SEÇÃO EXPERIMENTAL	40
4.1	Reagentes e Soluções	40
4.2	Fabricação da Superfície Híbrida Bimetálica Nanoestruturada Pt/Au	41
4.3	Caracterização Morfológica	43
4.4	Pré-tratamento da Superfície dos Eletrodos Convencionais de Platina	43
4.5	Pré-tratamento da Superfície dos Eletrodos Convencionais de Ouro	44
4.6	Caracterização Eletroquímica da Superfície Híbrida Nanoestruturada Pt/Au	45
4.7	Preparação das Monocamadas Auto-Organizadas de Alcanotóis	46
4.8	Preparação da Superfície Híbrida Bifuncional Nanoestruturada Pt/Au-SAM _{dessorção seletiva}	46
4.8.1	Imobilização da Enzima Glicose Oxidase	47
4.9	Preparação do Imunossensor Eletroquímico Pt/Au/SAM/Anti-cortisol	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	Caracterização Morfológica	48

5.1.1	Caracterização Morfológica da SHN-Pt/Au por Microscopia Ótica	48
5.1.2	Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	50
5.1.3	Caracterização por Microscopia de Força Atômica	52
5.2	Caracterização Eletroquímica.....	56
5.2.1	Caracterização Eletroquímica do Eletrodo Convencional de Platina.....	56
5.2.2	Caracterização Eletroquímica do Eletrodo Convencional de Ouro.....	58
5.2.3	Caracterização Eletroquímica da SHN-Pt/Au	60
5.3	Superfície Híbrida Bifuncional Pt/Au-SAM-GOx	67
5.3.1	Preparação e Caracterização da Superfície Híbrida Bifuncional Pt/Au-SAM-GOx	67
5.3.2	Imobilização da Biomolécula.....	74
5.3.3	Efeito da Monocamada Auto-organizada.....	77
5.3.4	Efeito da Espessura da Nanoestrutura de Ouro Sobre a Determinação de Glicose.....	79
5.3.5	Superfície Híbrida Bifuncional Pt/Au-SAM-Fe-GOx para Detecção de Glicose	82
5.3.6	Constante Cinética Aparente de Michaelis-Menten (K_m^{app}) e Constante Catalítica K_{cat}	86
5.4	Avaliação da SHN-Pt/Au para Detecção Eletroquímica de Ácido Ascórbico, Dopamina, Hidroquinona e Nitrito	87
5.5	Superfície Híbrida Nanoestruturada Pt/Au/SAM/Anticortisol para Detecção de Cortisol ...	91
6	CONCLUSÕES.....	94
7	PERSPECTIVAS	94
8	REFERÊNCIAS.....	95

1 INTRODUÇÃO

Com o exponencial crescimento nos últimos anos da ciência em nanoescala, alguns termos surgiram para designar essa área do conhecimento: o termo nanociência vem sendo utilizado para descrever a preparação e o estudo do comportamento de materiais em escala nanométrica, enquanto que o termo nanotecnologia se refere ao desenvolvimento e aproveitamento desses materiais com propriedades diferenciadas ou potencializadas¹. Segundo Peter Day², nanociência e nanotecnologia podem ser definidas como ***“a ciência que manipula a matéria na escala entre 0,1 e 100 nm, utilizando-se dos princípios da física, química e da biotecnologia com o intuito de: i) sintetizar novos materiais que possuam novas propriedades, ii) modificar e manipular superfícies e iii) elaborar microestruturas em duas ou mesmo três dimensões, visando uma determinada aplicação.”***

A imobilização de nanoestruturas químicas na superfície de eletrodos é uma área de pesquisa da eletroquímica que tem apresentado notável avanço na última década. O interesse nesta área é motivado por diversas aplicações, tais como o desenvolvimento de sistemas eletrocatalíticos, revestimentos em semicondutores como foto-sensibilizador e na montagem de sensores químicos. A modificação do eletrodo com nanoestruturas químicas pode trazer melhoria na seletividade de reação, aceleração de transferência de carga, permeação seletiva de analitos e estabilidade do sistema catalítico^{3; 4; 5; 6}. Dentre os diversos tipos de nanoestruturas, as nanoestruturas metálicas têm recebido particular atenção.

A nanotecnologia tem se revelado como uma nova fronteira do conhecimento científico, congregando técnicas, conhecimentos e conceitos fundamentais da química, física, ciências dos materiais e bioquímica, entre outras. A concepção e o estudo de arquiteturas supramoleculares, ou seja, nano e microestruturas com forma, tamanho e composição superficial conhecida e controlada, tem sido objeto de grande interesse e tem sido um dos principais propulsores dos avanços verificados na área da nanotecnologia. De maneira direta, se pode associar o intenso desenvolvimento da Nanociência e Nanotecnologia ao fato de que as propriedades dos materiais, são fortemente dependentes do tamanho das partículas deste material⁷.

Nanoestruturas são compostos formados por átomos ou moléculas que apresentam um tamanho bastante reduzido, entre 0,1 e 100 nm, e intermediário entre o átomo e a sua fase macroscópica⁸. Como consequência de seu tamanho finito, novas propriedades eletrônicas, ópticas, de transporte, fotoquímicas, magnéticas, eletroquímicas e catalíticas são esperadas.

Assim sendo, as propriedades físicas e químicas de um nanomaterial diferem drasticamente daquelas do mesmo material enquanto sólido estendido (bulk), possibilitando potencial aplicação em vários campos tecnológicos^{9; 10; 11; 12}. Como exemplo de nanomateriais pode-se citar nanotubos, nanofios, nanopartículas de semicondutores e metais, dentre outros.

O estudo de nanoestruturas não é trivial, tanto do ponto de vista experimental quanto do teórico, pois o tamanho extremamente reduzido dificulta sua caracterização através das técnicas convencionais. Além disso, é importante a obtenção de amostras com distribuição de tamanho estreita, ou seja, amostras ideais^{11; 13}. Estudos mostram que as nanoestruturas em sistemas ideais são capazes de formar arranjos uni, bi e tridimensionais. Estas estruturas aglomeradas possuem propriedades físicas e químicas diferentes das nanoestruturas isoladas e do equivalente macroscópico^{13; 14; 15}. Tais propriedades podem ser amplamente exploradas na busca de sensores eletroquímicos com maior sensibilidade e seletividade para determinadas espécies de interesse.

Nanoestruturas apresentam alta área superficial e, portanto, alta energia superficial. Durante a síntese as partículas tendem a se aglomerar e crescer para que, assim, ocorra diminuição na energia total do sistema. Para evitar o crescimento descontrolado das partículas e produzir nanopartículas não-aglomeradas, normalmente se utilizam dois mecanismos básicos de estabilização: (i) repulsão por cargas elétricas e (ii) adição de um material estabilizante. No primeiro caso as partículas se repelem por apresentarem a superfície eletricamente carregada e no segundo caso as partículas não se agregam por possuírem, na sua superfície, um agente protetor conhecido como passivante. O passivante impede a aglomeração das partículas fazendo uso do efeito estérico. Dentre os materiais usados como passivantes pode-se citar surfactantes, moléculas orgânicas com grupos polares e polímeros^{13; 14; 15; 16}. Nanopartículas metálicas passivadas por diferentes moléculas orgânicas têm sido bastante estudadas nos últimos anos, no que diz respeito a métodos de síntese, influência da camada passivadora nas propriedades, e interações entre nanopartículas para formar supercristais^{17; 18; 19; 20; 21}. A obtenção de amostras nanoestruturadas próximas a um sistema modelo é extremamente difícil e, sendo assim, o estudo para a obtenção de novos materiais nanoparticulados é de extrema importância.

No campo da eletroquímica, arranjos nanoestruturados têm sido estudados como superfícies catalíticas para células a combustível e o conceito de nanoeletrodo vem sendo introduzido nos últimos anos²². A redução de um eletrodo para a escala nanométrica melhora

consideravelmente o transporte de massa devido à contribuição da difusão radial e à diminuição da razão sinal/ruído por apresentar baixa resistência interna. Desta forma, o desempenho dos nanoeletrodos (eletrodos construídos com nanoestruturas) está sendo satisfatoriamente aplicado em procedimentos eletroanalíticos^{23; 24; 25}. Neste contexto, são apresentados na literatura diversos trabalhos que relatam o uso de nanoestruturas metálicas na modificação de eletrodos a base de carbono^{26; 27; 28}. Entretanto, o conceito de nanoestruturas adotado nestes trabalhos difere significativamente do conceito citado anteriormente. De acordo com os autores, a forma de obtenção das nanoestruturas metálicas é feita pela simples eletrodeposição de metais a partir de sais em solução, não existindo assim a preocupação de prevenir a aglomeração das nanoestruturas formadas, já que as mesmas não se encontram envoltas por moléculas de proteção. Desta forma, não se pode garantir as propriedades de tal material em função do tamanho das partículas, pois este parâmetro não é controlado. Além disso, apesar das vantagens descritas nestes trabalhos, observa-se que o comportamento eletroquímico dos eletrodos descritos é muito similar ao comportamento de um eletrodo constituído pelo material na sua forma convencional (sólido *bulk*) o que não caracteriza a presença de um nanomaterial como modificador dos sensores propostos.

A escolha de nanoestruturas metálicas dos elementos supracitados vem de encontro com a tendência observada na literatura no uso de eletrodos metálicos como sensores eletroquímicos. Nos últimos anos eletrodos construídos com diferentes substratos metálicos têm sido utilizados para a determinação de diversos compostos orgânicos, principalmente carboidratos, alcoóis e aminoácidos. De acordo com relatos da literatura, os materiais mais utilizados para este fim são platina^{29; 30}, ouro^{31; 32; 33}, níquel^{34; 35; 36} e cobre^{37; 38}.

1.1 Síntese assistida por moldes

Outro aspecto que tem chamado bastante atenção está relacionado com as propriedades e aplicabilidades de materiais que apresentam nanoestruturas (2 a 100 nm) e macroestruturas regulares geradas através da utilização de sínteses assistidas por moldes. Esta síntese foi relatada pela primeira vez por Dickey³⁹ em 1949 e recebeu esta denominação porque os espaços vazios (poros, espaçamento intralamelar e cavidades) são empregados como molde e determinam a morfologia, o tamanho e a orientação do material sintetizado em seu interior. A Figura 1.1 representa esquematicamente o processo de síntese via *template* de nanoestruturas de ouro em uma matriz unidirecional. Os cátions de ouro (Au^{3+}) estão

representados pelos círculos amarelos e as nanoestruturas formadas no interior dos espaços vazios da matriz estão representadas pelas cavidades na superfície de um eletrodo de platina.

Figura 1.1 – Representação esquemática da eletrodeposição de nanoestruturas de ouro sobre eletrodo de platina modificado com template (matriz unidirecional).

Fonte: Autoria própria.

O método *template* consiste em reações do tipo “hospedeiro-hóspede” onde o “convidado” é sintetizado em um “hospedeiro” com tamanho e forma de poros controlados, possibilitando a organização e estabilização de materiais em micro e nanoescala, não provocando modificações substanciais na estrutura do “hospedeiro”. A estratégia para a utilização desse método envolve uma seleção criteriosa do hospedeiro e/ou uma escolha conveniente do material a ser sintetizado no seu interior. Entre as diversas características interessantes associadas a essa técnica, a principal é a aplicação de uma gama muito grande de materiais utilizados como matriz hospedeira com estruturas unidimensional (filamentos: grafite, zeólitas, matrizes Nuclepore), bidirecional (lamelas: grafite, filmes inorgânicos, camadas de óxidos, haletos, calcogenetos, fosfatos de metais tetravalentes) ou tridimensional (vidros porosos, zeólitas e matrizes de origem polimérica)⁴⁰. Muitos exemplos podem ser encontrados nos trabalhos de Martin e colaboradores, esses autores sintetizaram metais⁴¹, semicondutores⁴², carbono⁴³ e outros materiais através de membranas porosas de alumina, carbonato e polímeros condutores e não condutores. Esse processo envolve a síntese do material desejado dentro dos poros da membrana pois apresentam poros cilíndricos de diâmetros uniformes, sendo assim, uma nanoestrutura de formato cilíndrico ou esférico do material desejado pode ser obtido em cada poro.

Do ponto de vista eletroquímico, a ideia de se eletrodepositar materiais fazendo uso de moldes não é nova. Em 1970, Possin apresentou trabalhos envolvendo a eletrodeposição de

fios de Sn, In e Zn utilizando moldes de mica⁴⁴. Entretanto, Martin foi o pioneiro a usar as membranas porosas para eletrodepositar nanofios de polímeros condutores, tais como polipirrol e polianilina⁴⁵. Ele reconheceu que as membranas porosas poderiam ser utilizadas para a eletrodeposição de diversos compostos ao revestir uma das faces com uma camada de ouro e, então, fazer uso desse sistema como um eletrodo para o crescimento do material desejado dentro do poro. O diâmetro dos nanotubos resultantes pode ser controlado de acordo com o tamanho dos poros.

Porém poucos trabalhos podem ser encontrados na literatura reportando a construção e desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos utilizando templates para modificação de substratos condutores como platina, ouro, carbono vítreo e pirolítico com nanoestruturas químicas como a eletrodeposição de nanopartículas de ouro para obtenção de superfícies bifuncionais. Seguidamente aos trabalhos de Martin e colaboradores, outros grupos têm utilizado esse método e desenvolvido novos moldes para produzir uma grande variedade de nanoestruturas. O presente trabalho difere-se dos de Martin e dos demais estudos com templates, uma vez que utiliza o conceito do uso dos moldes para gerar, ao invés de nanofios ou nanotubos, arranjos regulares de nanoestruturas metálicas.

Na área dos sensores e biossensores, os moldes têm sido utilizados para a deposição de filmes macroporosos de azul da Prússia aplicados na oxidação de hidrazina⁴⁶ e na construção de biossensores de glicose⁴⁷. Neste último caso, os autores reportaram que o tempo de resposta e a sensibilidade do biossensor construído com o transdutor macroporoso foram mais favoráveis do que os resultados obtidos com o biossensor construído sobre o azul da Prússia convencional (maciço). Na ocasião, a sensibilidade exibida pelo mesmo foi de $34,8 \mu\text{A cm}^{-2} \text{mmol L}^{-1}$, valor oito vezes superior quando comparado ao biossensor maciço.

1.2 Fotolitografia

Dentro do grupo de *templates*, a fotolitografia é uma alternativa interessante para a obtenção de arranjos regulares de nanoestruturas metálicas. Estruturas com dimensões micro/nanométricas podem ser construídas através de métodos “*bottom-up*” (de baixo para cima) e/ou “*top-down*” (de cima para baixo)⁴⁸. Como exemplos do primeiro método, nanopartículas⁴⁹ e filmes ultrafinos⁵⁰ são obtidos a partir do arranjo de átomos e moléculas. Por outro lado, no método *top-down* pode-se utilizar técnicas de fotolitografia^{51; 52; 53} para

fabricar nanotransistores⁵⁴ e biossensores⁵⁵ dentre outros dispositivos. A fotolitografia consiste na transferência de um padrão/desenho de uma máscara para um substrato através da exposição de polímeros sensíveis à luz, denominados fotorresistes. Nos fotorresistes positivos a energia fornecida pela luz promove a degradação das cadeias poliméricas, enquanto que, nos fotorresistes negativos, a luz promove a ligação cruzada das cadeias (*cross-linking*). As etapas dos processos envolvidos na técnica de fotolitografia utilizada neste trabalho⁵³ podem ser descritas como:

- 1) **Aplicação do fotorresiste:** primeiramente procede-se a limpeza e secagem do substrato (vidro ou acetato) para remover gorduras e impurezas, seguido do espalhamento uniforme do fotorresiste através de rotação controlada do substrato (*spin coating*) e tratamento térmico para completa evaporação do solvente e aumentar a adesão do fotorresiste (*pre-bake*);
- 2) **Exposição:** alinhamento do substrato com a máscara/desenho, seguido da exposição do fotorresiste a uma fonte de radiação, e.g., raios X, ultravioleta, feixe de elétrons. Nesta etapa é fornecida a energia necessária para sensibilizar o polímero, a qual depende da espessura e do tipo de fotorresiste utilizado. A energia é tabelada e fornecida pelo fabricante, então, conhecendo-se a potência da fonte é possível determinar o tempo de exposição;
- 3) **Revelação:** consiste na imersão do substrato em uma solução reveladora para remoção das áreas não polimerizadas utilizando o fotorresiste negativo, ou remoção das regiões degradadas do fotorresiste positivo;
- 4) **Obtenção do padrão:** corrosão do filme depositado (*etching*) ou deposição do filme seguido da remoção do fotorresiste através de imersão em acetona (*lift-off*).

A Figura 1.2 apresenta uma representação esquemática das etapas descritas acima dos processos envolvidos na técnica de fotolitografia utilizada neste trabalho⁵³.

Figura 1.2 – Representação esquemática dos processos fotolitográficos em função da via escolhida: (a) etching e (b) lift-off. O efeito do fotorresiste positivo (+) ou negativo (-) também é ilustrado.

Fonte: tese Cléber Aparecido Rocha Dantas.

1.3 Superfícies Híbridas Bimetálicas Nanoestruturadas

Nanoestruturas metálicas estão entre os nanomateriais mais estudados para o desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos, devido às suas propriedades únicas, assim como, grande área de superfície ativa e extraordinária atividade catalítica associado com o tamanho e composição controlados⁵⁶. Além disso, essas nanoestruturas apresentam alta capacidade de transferência de carga, tornando-as adequadas para atingir maior sensibilidade e menor limite de detecção⁵⁷. Superfícies bimetálicas nanoestruturadas tem fascinado pesquisadores devido à suas excelentes propriedades mecânicas, eletrônicas, ópticas e catalíticas proporcionadas pela combinação de dois tipos de metais produzindo estruturas finas com novas características da superfície (superfícies híbridas)⁵⁸. Superfícies híbridas bimetálicas nanoestruturadas tem atraído atenção nos últimos anos por sua importância em eletrocatalise, desde a adição de um segundo metal provoca variações no tamanho de estrutura, forma, morfologia da superfície e nas propriedades físicas e químicas. Devido ao efeito sinérgico ou bifuncional, esta combinação de dois elementos metálicos em uma única nanoestrutura resulta em um material com interessantes propriedades, incluindo

seletividade química e atividade catalítica superior em comparação com as nanoestruturas monometálicas^{56; 57; 58; 59}. A aplicação destes nanomateriais tem ganhado também significativa atenção no desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos para a concepção de novos sistemas de biossensoriamento com melhor desempenho de ensaios bioanalíticos^{60; 61}.

Em particular as nanoestruturas de ouro e platina têm sido amplamente utilizadas para a produção destes biodispositivos^{62; 63}. As nanoestruturas de ouro possuem a capacidade de proporcionar uma superfície biocompatível para a imobilização de biomoléculas, além de elevada área superficial e uma boa condutividade entre a superfície eletródica e a biomolécula^{64; 65; 66}. Enquanto que as nanoestruturas de platina também possuem propriedades semelhantes a nanoestruturas de outros metais nobres e exibem uma excelente propriedade eletrocatalítica para oxidação/redução de H_2O_2 formado como produto na oxidação de substratos por enzimas oxidoreductases^{67; 68}.

Kang *et. al.*⁶⁹, Lang *et. al.*⁷⁰ e Zou *et. al.*⁷¹ reportaram que sistemas binários com nanoestruturas de platina em combinação com outros metais assim como o Au, Pb, Sn, Pd e nanotubos de carbono apresentaram melhores propriedades eletrocatalíticas do que seus homólogos. Devido a estas razões, os sistemas bimetalícos nanoestruturados Pt/Au são interessantes pela combinação de propriedades eletrocatalíticas, capaz de promover simultaneamente um ambiente propício para imobilização de biomoléculas e a determinação de seus produtos. Além disso, os sistemas bimetalícos aumentam a área superficial com melhora do transporte de massa, diminuindo o sobrepotencial para oxidação/redução de H_2O_2 (a fim de evitar os problemas de interferência de outras espécies eletroativas). O interesse no arranjo de microeletrodos interdigitados nanoestruturados é devido à possibilidade de manipular materiais em micro/nanoescala, além disso, o uso de materiais nanoestruturados é uma estratégia promissora para a fabricação de dispositivos eletroquímicos. Assim, a motivação deste trabalho é desenvolver uma nova plataforma híbrida bimetalíca baseada em Pt/Au nanoestruturada para aplicações bioanalíticas.

1.4 Biomarcadores

Um corpo humano saudável tem a capacidade de manter um ambiente interno estável, também conhecido como homeostase. Enquanto os sistemas de órgãos agem para garantir a homeostase através a regulação de vários mecanismos de “*feed-back*” positivo e negativo,

uma incapacidade para manter a homeostase pode resultar em doenças ou até mesmo em morte. Assim, o corpo humano depende de uma série de mecanismos para atingir esse equilíbrio homeostático. O desequilíbrio no corpo humano pode levar à produção de diversos tipos de biomarcadores⁷².

Biomarcador é definido como toda substância ou produto de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado, indique risco à saúde⁷³. A detecção de biomarcadores, tais como ácido úrico, ácido ascórbico, a dopamina e a nicotinamida adenina dinucleótido reduzida (NADH) é capaz de fornecer informações úteis para a prevenção de doenças genéticas e outras doenças de saúde como a hiperuricemia e doenças cardíacas, bem como o seu subsequente tratamento médico⁷².

Sensores químicos e biossensores têm sido amplamente utilizados como alternativas atraentes para os instrumentos analíticos volumosos, caros e complexos usados no sector dos cuidados de saúde⁷⁴. Ao longo das últimas décadas, vários destes dispositivos têm sido desenvolvidos para a detecção de biomarcadores vitais utilizando transdutores ópticos, piezelétrico e eletroquímicos. Destes, os sensores eletroquímicos ganharam um papel dominante em diagnósticos clínicos devido ao seu alto desempenho, portabilidade, simplicidade e baixo custo⁷⁵. O progresso substancial em detecção eletroquímica tem levado ao desenvolvimento de analisadores portáteis comerciais, bem como, ACCU-CHEK (Roche Diagnostics, Inc.), iSTAT (Abbott, Inc.), ou *Lactate Scout* (Sports Resource Group, Inc.), para detecção de metabolitos e eletrólitos⁷⁶. No entanto, a maioria destes sensores depende de amostras de sangue. A natureza invasiva desses sensores apresenta, assim, um grande obstáculo ao paciente e impede a aquisição de informação temporal que é desejado para diversas aplicações biomédicas⁷⁶. Isto é especialmente verdadeiro no caso de pacientes neonatais, idosos e hemofóbicos, para os quais a amostragem de sangue é um desafio⁷⁶. O contínuo monitoramento analítico é de particular importância em diferentes áreas. Por exemplo, um controle do diabetes exige um acompanhamento regular de glicose. Da mesma forma, os atletas necessitam de avaliação contínua do seu nível de condicionamento físico durante o treinamento. Detecção em tempo real de agentes patogênicos em fluidos biológicos pode alertar a pessoa sobre o surgimento de doenças. Monitorar a eficácia de drogas é outro cenário em que medições contínuas são de grande importância. Nos casos acima mencionados, os sensores invasivos têm limitações óbvias, pois a disponibilidade contínua dos meios de amostragem necessária (sangue, urina, soro, e etc) torna-se impraticável⁷⁶.

Dispositivos não invasivos têm recebido grande atenção durante a última década por diversos pesquisadores ^{77; 78}. Estes dispositivos são promissores para o monitoramento contínuo de saúde do indivíduo, rastreamento da atividade do exercício e avaliar o desempenho do soldado na área militar ⁷⁷. Enquanto a maioria dos esforços iniciais sobre os dispositivos biomédicos têm se dedicado à monitoramento contínua dos sinais vitais (tais como frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura da pele) a partir de sinais físicos, sensores químicos não invasivos têm recebido atenção limitada. A introdução de novos dispositivos preencheriam as lacunas atuais em tecnologia de sensores portáteis, como desejado para o monitoramento móvel de saúde e diagnósticos remotos ^{76; 77; 79}.

Devido aos seus inerentes requisitos de miniaturização, baixo consumo de energia, simplicidade, rapidez e baixo custo, os dispositivos eletroquímicos satisfazem as necessidades atuais ⁷⁹. Suor, saliva, urina e lágrimas são quatro fluidos biológicos que contêm vários componentes químicos relevantes fisiologicamente e podem ser facilmente obtidos de forma contínua e não-invasiva para monitorização destes biomarcadores ⁷⁹. Por exemplo, o nível de eletrólitos (pH, sódio, amônio, cálcio) e os metabolitos (glicose, lactato, ureia) no suor e fluido intersticial da pele podem fornecer informações valiosas a saúde ^{80; 81}. Similarmente, pH salivar, concentrações de lactato e eletrólito podem ser utilizados para identificar disposição para desenvolver cáries dentárias ⁸², estresse físico ⁸³ e quantidade de ingestão de sal ⁸⁴. Os níveis de glicose ⁷⁹, lactato ⁸⁵ ou neurotransmissores ⁷⁹ em lágrimas também possuem importância para a saúde vital. Através dessas correlações, grupos de pesquisa desenvolveram recentemente dispositivos eletroquímicos que podem medir estes e outros biomarcadores de uma maneira amigável e completamente não-invasivo ⁷⁹.

1.4.1 Biomarcadores de Câncer

Os biomarcadores tumorais são indicadores do estado fisiológico e de alterações que ocorrem durante o processo neoplásico. A expressão destes marcadores pode refletir diversos processos em andamento nas células tumorais, tais como hiperproliferação, alteração de padrões de expressão gênica, hiperplasia, genotoxicidade, inflamação e alterações enzimáticas relacionadas com o desenvolvimento tumoral, entre outros. Um biomarcador tumoral ideal possui relação direta com o processo maligno, correlaciona-se com a massa tumoral, permite a caracterização do tipo de tumor, a localização, o estado de desenvolvimento do tumor, bem como fornece uma avaliação prognóstica do tumor em questão ⁸⁶. Biomarcadores podem ser

enzimas, anticorpos, receptores de membrana, microRNAs e até mesmo mutações genéticas no DNA.

Pesquisadores têm concentrado seus esforços na busca por biomarcadores ideais para cada tipo tumoral. Um biomarcador ideal deve ser acessível por métodos não-invasivos e específico à condição de interesse, representando uma indicação confiável de manifestação da doença antes que a fase sintomática se inicie. Além disso, deve ser sensível a mudanças patológicas, como progressão da doença e resposta ao tratamento. E, não menos importante, deve ser também um alvo molecular específico para o tratamento, ou seja, um alvo terapêutico. A proteína HER2, por exemplo, é um biomarcador específico ao tipo de tumor e também um alvo terapêutico, pois a inibição dos receptores HER2 da membrana celular tumoral, utilizando a droga Trastuzumab, leva à regressão do tumor. Apesar disso, nem todo biomarcador é um alvo terapêutico, como é o caso do PSA (antígeno prostático específico) que, apesar de indicar câncer de próstata, não está diretamente associado ao tratamento e a doença ⁸⁷.

A busca por biomarcadores tem como alvo principal avaliar e mensurar processos biológicos normais e patológicos, bem como respostas farmacológicas a determinados tratamentos. Infelizmente, a avaliação prévia com biomarcadores com relação à eficácia e resposta à quimio e radioterapia não constitui, ainda, abordagem rotineira da clínica oncológica. Como o câncer resulta de alterações genéticas e epigenéticas, análises do perfil de metilação, combinadas com diagnóstico patológico, seriam úteis para prever o comportamento desses tumores. Assim, a avaliação de alterações epigenéticas, tais como metilação de regiões promotoras do DNA, seria ferramenta de diagnóstico, prognóstico e prevenção do câncer.

O desenvolvimento e aprimoramento de métodos eficazes, acessíveis, rápidos e precisos de detecção do câncer e de diagnóstico clínico são grandes gargalos atuais ⁸⁸. Neste contexto, biossensores vêm se transformando em ferramenta de diagnóstico e detecção do câncer. Sua utilização na detecção precoce do câncer e no acompanhamento do tratamento, particularmente para os casos em que tipicamente a doença é diagnosticada em estágios avançados, resulta em melhorias na qualidade de vida do paciente e em geral aumenta as taxas de sobrevida ⁸⁸.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho está relacionado com o desenvolvimento, caracterização e aplicação de uma superfície híbrida nanoestruturada Pt/Au para a detecção eletroquímica dos biomarcadores ácido ascórbico, ácido úrico, dopamina, hidroquinona e nitrito. Além disso, a mesma superfície, modificada seletivamente sobre as nanoestruturas de ouro com monocamadas auto-organizadas de alcanotóis, será utilizada para a imobilização da biomolécula glicose oxidase e detecção de seus produtos de reação (biossensor). Este dispositivo será avaliado como um biossensor amperométrico e voltamétrico baseado na geração de H_2O_2 da atividade enzimática detectado sobre a superfície de platina. E em uma terceira arquitetura, o dispositivo será avaliado para detecção eletroquímica de cortisol salivar.

3 INSTRUMENTAÇÃO BÁSICA

3.1 Balança Analítica

Todas as pesagens foram realizadas utilizando-se uma balança analítica Mettler Toledo, modelo AL 204 com precisão de $\pm 0,1\text{mg}$.

3.2 Medidas Voltamétricas

As medidas voltamétricas foram realizadas em uma célula eletroquímica de 25 mL contendo três eletrodos (Figura 3.1), sendo um eletrodo de trabalho (eletrodo de platina), um eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3 M) como referência e um eletrodo auxiliar de platina conectados a um Potenciostato/Galvanostato PGSTAT30/Autolab[®] (Eco Chemie) acoplado a um microcomputador e gerenciado pelo software GPES 4.9.007. Os resultados obtidos foram tratados utilizando o programa Origin da Microcal Inc. 7.0[®].

Figura 3.1 – Representação esquemática de uma célula eletroquímica utilizada nas medidas voltamétricas. ER – eletrodo de referência (Ag/AgCl); ET – eletrodo de trabalho (platina); EA – eletrodo auxiliar (Pt).

Fonte: Autoria própria.

Eletrodo de referência

O eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3 M) foi construído embutindo-se um fio de prata com um filme de cloreto de prata, em um tubo de vidro preenchido por uma solução de KCl 3 M contendo cristais de AgNO_3 .

Eletrodo auxiliar

O eletrodo auxiliar foi uma placa de platina com $1,0 \text{ cm}^2$ de área geométrica, soldada a um fio de platina e embutidos em um tubo de vidro.

Eletrodo de trabalho

Os eletrodos consistem de um eletrodo de platina e outro de ouro, ambos com $0,071 \text{ cm}^2$ de área, embutidos em politetrafluoretileno. As superfícies híbridas nanoestruturadas são descritas no item 4.2.

3.3 Medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Os experimentos de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) foram realizados com os mesmos materiais das medidas voltamétricas e em um Potenciostato/Galvanostato PGSTAT30/Autolab[®] acoplado a um microcomputador e controlado pelo software FRA. Os espectros de plano complexo foram analisados com o *software* livre *Electrochemistry-ZView2*. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente sob atmosfera de nitrogênio.

3.4 Medidas com Microscopia de Força Atômica

As medidas de microscopia de força atômica foram realizadas em um microscópio Nanosurf EasyScan 2, com modo de operação de contato e não contato. Os resultados foram tratados no software Nanosurf EasyScan 2.

3.5 Medidas com Microscopia Óptica

As medidas de microscopia óptica foram realizadas em um microscópio HIROX KH-7700 com lente OL-700II.

3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

As medidas de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas em um microscópio Leo – modelo 440 da Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP).

4 SEÇÃO EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes empregados foram de alto grau de pureza analítica e foram utilizados sem prévia purificação. Para o preparo de soluções orgânicas foram utilizados solventes previamente secos e mantidos com a presença de peneiras moleculares. Todas as

soluções aquosas foram preparadas com água purificada no sistema Nanopure com resistividade de 18 MΩ cm (Barnsted Nanopure System).

Ácido 11-mercaptoundecanóico, ácido mercaptoacético e cistamina, glicose oxidase (*Aspergillus niger*), glicose, dopamina, nitrito de sódio, hidroquinona, cortisol, anticorpo policlonal anti-cortisol, hidrocloreto de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), ferroceno, fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. O ácido sulfúrico supra puro 98% foi adquirido da empresa Tedia. O peróxido de hidrogênio, etanol e acetona foram adquiridos da empresa Synth. As lâminas de vidro bk7 foram adquiridas da empresa perfecta. O detergente neutro Extran e o HMDS foram adquiridos da empresa Merck. O fotoresiste AZ 4210 foi adquirido da empresa microchemicals GmbH.

A caracterização voltamétrica da superfície híbrida nanoestruturada e dos eletrodos bem como as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizadas em solução contendo 5,0 mmol de ferrocianeto de potássio (Mallinckrodt) e ferricianeto de potássio (J.T. Baker) em KCl 0,1 mol L⁻¹ (Sigma-Aldrich®).

4.2 Fabricação da Superfície Híbrida Bimetálica Nanoestruturada Pt/Au

A fabricação da superfície híbrida bifuncional nanoestrutura Pt/Au baseada no arranjo de microeletrodos interdigitados foi realizada no Laboratório de Microfabricação (LMF) do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano). Juntamente com outros três Laboratórios Nacionais: de Luz Síncrotron (LNLS), de Biociências (LNBio), de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) compõe o Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), localizado em Campinas/SP. Através da aprovação de projetos específicos foi possível utilizar toda a infraestrutura disponível do LMF, de modo que, o doutorando esteve envolvido em todas as etapas da fabricação dos dispositivos apresentados neste trabalho.

Microeletrodos interdigitados (MI) nanoestruturados de platina/ouro (Pt/Au) foram fabricados pelos processos fotolitográfico e *lift-off*⁸⁹ sobre lâminas de vidro BK7. As lâminas de vidro com dimensões de 6,0x6,0 cm de largura e comprimento foram limpas com detergente neutro Extran® para remoção de impurezas, subsequentemente, enxaguadas com água destilada em abundância. Em seguida, as lâminas foram imersas em uma solução piranha (mistura de H₂SO₄ e H₂O₂ na proporção de 3:1) para remoção de matéria orgânica restante da

lavagem e hidroxilar a superfície adicionando grupos hidroxila tornando-a hidrofílica. As lâminas devidamente limpas foram recobertas com uma camada de 5 nm de cromo (Cr) e uma camada de 100 nm de platina (Pt). A primeira etapa consiste em depositar uma camada de HMDS e do fotorresiste positivo AZ4210 sobre lâminas de vidro BK7 recobertos com Pt utilizando um *Spin coater* com velocidade de rotação de 3000 rpm por 30 s, seguido de tratamento térmico a 90 °C por 5 min. Posteriormente, as lâminas foram alinhadas com a máscara contendo os padrões interdigitados e expostas à luz UV por 40 s na fotoalinhadora. Então, o substrato foi imerso em uma solução de revelação (K400) por 15 segundos para remoção do polímero degradado pela luz UV. Após a obtenção do padrão interdigitado no filme de fotorresiste, metalizou-se 20, 50 e 100 nm de ouro. A remoção do ouro e do fotorresiste excedente foi realizada pelo processo de *lift-off* que consiste na imersão do substrato em acetona obtendo então a superfície híbrida bimetalítica baseada no arranjo de microeletrodos interdigitados nanoestruturados de platina/ouro. A Figura 4.1 apresenta um esquema geral resumizando a fabricação do dispositivo.

Figura 4.1 – Esquema geral do processo de fabricação da superfície híbrida bimetalítica baseada no arranjo de microeletrodos interdigitados nanoestruturados de platina/ouro. As setas indicam a sequência das etapas de fabricação.

Fonte: Autoria própria.

As máscaras utilizadas nos processos fotolitográficos foram projetadas com auxílio de um software do tipo CAD (do inglês, Computer-Aided Design) e, então, reproduzidas em fotolitos. A etapa da fotoplotagem foi realizando usando um fotoploter (Cymbolic Sciences/CSI Fire 9670). As máscaras foram projetadas com linhas de 10 μm e espaçamento entre linhas de 10 μm , como mostrado na Figura 4.2.

Figura 4.2 – Representação esquemática da máscara utilizada para gravação do padrão.

Fonte: Autoria própria.

4.3 Caracterização Morfológica

Os eletrodos híbridos bimetálicos nanoestruturados de Pt/Au foram caracterizados morfolologicamente por microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica.

4.4 Pré-tratamento da Superfície dos Eletrodos Convencionais de Platina

O pré-tratamento da superfície do eletrodo de platina convencional foi realizado segundo metodologia desenvolvida e consolidada em nosso grupo de pesquisa⁹⁰. O procedimento é dividido em duas etapas, a saber: primeiramente, polimento mecânico e posterior polimento eletroquímico.

O polimento mecânico foi realizado em lixas d'água com granulometria de 600, 1200, 2000 e 4000, seguida de um polimento em suspensão de alumina (1:5 alumina/água)

utilizando uma politriz Panambra Struers modelo DPU-10 a 400 rpm com feltro Buehler®. O polimento seguia até que as superfícies apresentassem um aspecto espelhado. A cada troca de granulometria, seja da lixa d'água ou de alumina (1,0; 0,3 e 0,05 μm), todo o conjunto foi lavado com água destilada e os eletrodos sonicados em água purificada por cinco minutos para remoção das partículas residuais.

A etapa de polimento eletroquímico foi realizada empregando-se a voltametria cíclica em um intervalo de varredura de potenciais de -0,25 a 1,25 V vs. Ag/AgCl, imerso em uma solução contendo 0,1 mol L⁻¹ de H₂SO₄ variando-se o número de ciclos com a velocidade de varredura de potenciais do seguinte modo: 100, 50, 25 e 10 ciclos a 1000, 500, 250 e 100 mV s⁻¹, respectivamente. As soluções foram desaeradas borbulhando-se nitrogênio puro por 30 minutos. As respostas eletroquímicas obtidas para as superfícies de platina são muito bem conhecidas e foram utilizadas como critério para o perfeito funcionamento dos eletrodos e como padrão de comparação com as superfícies híbridas nanoestruturadas Pt/Au.

4.5 Pré-tratamento da Superfície dos Eletrodos Convencionais de Ouro

De maneira similar a metodologia adotada no item 3.5, o pré-tratamento da superfície do eletrodo de platina convencional foi realizado segundo metodologia desenvolvida e consolidada em nosso grupo de pesquisa⁹⁰. O procedimento é dividido em três etapas, a saber: primeiramente, polimento mecânico; secundariamente, oxidação química e posterior polimento eletroquímico.

A primeira etapa de polimento mecânica foi idêntica à descrita no item 3.5 e será omitida neste item para que o texto não fique repetitivo. A oxidação química de possíveis contaminantes adsorvidos foi realizada por imersão dos eletrodos em uma solução “piranha”, mistura de H₂SO₄ e H₂O₂ ambos concentrados na proporção de 3:1, respectivamente, durante 5 minutos. Seguido da lavagem dos eletrodos em água destilada abundante.

O polimento eletroquímico realizado sobre os eletrodos convencionais de Au foi semelhante à Pt contudo o intervalo de varredura de potenciais variou de 0 a 1.7 V (vs. Ag/AgCl) sob as mesmas condições do polimento eletroquímico da Pt. As respostas eletroquímicas obtidas para as superfícies de ouro foram utilizadas como critério para o perfeito funcionamento dos eletrodos e como padrão de comparação com as superfícies híbrida nanoestruturada Pt/Au.

4.6 Caracterização Eletroquímica da Superfície Híbrida Nanoestruturada Pt/Au

Os eletrodos foram submetidos a varreduras cíclicas de potenciais (100 ciclos a 1000 mV s^{-1} , 50 ciclos a 500 mV s^{-1} , 25 ciclos a 250 mV s^{-1} e 10 ciclos a 100 mV s^{-1}) em solução contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 em um intervalo de varredura de potenciais de $-0,25$ a $1,25 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl. A análise dos resultados obtidos foi realizada associando a área recoberta com Au com a diminuição dos picos de adsorção/dessorção da monocamada de hidrogênio. Para efeitos de comparação um eletrodo de Pt não modificado foi submetido aos mesmos procedimentos sendo utilizado como referência.

Anteriormente a cada medida de EIE os eletrodos foram submetidos a varreduras cíclicas de potenciais na mesma solução em um intervalo de varredura de potenciais de $-0,1$ a $0,60 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl, a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . As medidas de EIE foram realizadas em solução contendo $5,0 \text{ mmol}$ de ferrocianeto/ferricianeto de potássio em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em circuito aberto. Aplicou-se uma onda senoidal com 10 mV de amplitude no potencial de circuito aberto em uma faixa de frequência de 100 kHz a $0,1 \text{ Hz}$. O circuito modelo utilizado nesse estudo foi o circuito de Randles $R_S(\text{CPE}[R_{tc}Z_W])$ como apresentado na Figura 4.3 abaixo.

Figura 4.3 – Representação do modelo de circuito equivalente utilizado para análise dos dados obtidos com os gráficos de plano complexo obtidos com a EIE.

Fonte: Autoria própria.

onde R_S é a resistência da solução, R_{tc} é a resistência de transferência de carga, Z_W é a impedância de Warburg e CPE é o elemento de fase constante (representa a capacitância da dupla camada).

4.7 Preparação das Monocamadas Auto-Organizadas de Alcanotíois

A adsorção dos alcanotíois nos substratos condutores previamente limpos foi realizada segundo uma metodologia previamente utilizada em nosso grupo de pesquisa⁹⁰. Os eletrodos convencionais de Pt, Au e os eletrodos bimetálicos híbridos de Pt/Au foram imersos em uma solução etanólica contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ dos respectivos alcanotíois por um período de 20 horas. Após o período de imersão, os eletrodos foram novamente lavados com etanol para remoção de moléculas fracamente adsorvidas e com água purificada. A Figura 4.4 apresenta a fórmula estrutural dos alcanotíois utilizados nesta etapa: ácido mercaptoacético (MAA), ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA) e cistamina (CYS). Todos os eletrodos modificados e não modificados foram caracterizados por voltametria cíclica e por EIE.

Figura 4.4 – Fórmulas estruturais dos alcanotíois ácido mercaptoacético (MAA), 11-mercaptoundecanóico (11-MUA) e cistamina (CYS) utilizados para obtenção da monocamada auto-organizada.

Ácido 11-mercaptoundecanóico

Ácido mercaptoacético

Cistamina

4.8 Preparação da Superfície Híbrida Bifuncional Nanoestruturada Pt/Au-SAM_{dessorção seletiva}

A área de trabalho da superfície híbrida nanoestruturada Pt/Au (SHN-Pt/Au) foi pré-definida com uma fita adesiva para galvanoplastia (3M[®]) perfurada no diâmetro adequado e fixada sobre a superfície. O contato elétrico foi realizado na extremidade posterior sobre a

camada de Pt do próprio eletrodo. A Figura 4.5 mostra o esquema de preparação da SHN-Pt/Au-SAM-GOx e as etapas são descritas detalhadamente na sequência.

Figura 4.5 – Representação esquemática de preparação da superfície híbrida nanoestruturada Pt/Au.

Fonte: Autoria própria.

A superfície híbrida bifuncional (SHB-Pt/Au-SAM) foi preparada desejando-se manter a monocamada auto-organizada apenas sobre a superfície nanoestruturada de Au. Para isso, após a imersão em solução contendo os alcanotiois os eletrodos foram submetidos a varreduras cíclicas de potenciais em solução contendo H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Nesta etapa comparou-se os eletrodos convencionais de Au e Pt com a SHN-Pt/Au por meio da caracterização por voltametria cíclica e EIE.

4.8.1 Imobilização da Enzima Glicose Oxidase

A enzima glicose oxidase foi imobilizada pelo método de ligação covalente⁹¹ através da imersão da superfície bifuncional em uma solução contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de EDC e NHS por 30 minutos. Subsequentemente, gotejou-se $25 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução contendo $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$ da enzima glicose oxidase. Por fim, $20 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ferroceno foi adicionado para atuar como mediador de elétrons. Todas as etapas de preparação da SHB-Pt/Au-SAM-GOx foram caracterizadas por voltametria cíclica e EIE.

4.9 Preparação do Imunossensor Eletroquímico Pt/Au/SAM/Anti-cortisol

Em outra aplicação, a imobilização de uma monocamada auto organizada (SAM) foi realizada através da imersão da superfície híbrida em solução contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido mercaptoacético (ver Figura 4.4) por um período de 20 horas. A biomolécula foi imobilizada sobre a SHN-Pt/Au/SAM gotejando-se $25 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução do anticorpo anti-cortisol. Em seguida registrou-se o diagrama de Nyquist em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ das sondas redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio. Então, $25 \text{ }\mu\text{L}$ das soluções estoque contendo $1,0 \times 10^{-12} - 1,0 \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$ de cortisol foram dispensadas sobre a SHN-Pt/Au/SAM/anticortisol para a imobilização do alvo (cortisol) no anticorpo durante 20 min, subsequentemente, registrou-se o diagrama de Nyquist na mesma solução e sob as mesmas condições.

O limite de detecção foi calculado de acordo com a equação $\text{LOD} = y_B + 3S_B$, com os valores de $y_B (= a)$ e $S_B (= S_{y/x})$ previamente calculado, onde a é o intercepto e $S_{y/x}$ é o desvio padrão dos valores de y em x da regressão linear (mínimos quadrados). A sensibilidade foi calculada pela inclinação (*slope*) da regressão linear (mínimos quadrados) utilizando a equação $b = \sum[(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})] / \sum(x_i - \bar{x})^2$; ^{92; 93}.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização Morfológica

A caracterização morfológica foi realizada por microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica.

5.1.1 Caracterização Morfológica da SHN-Pt/Au por Microscopia Ótica

Inicialmente, as superfícies híbridas nanoestruturadas Pt/Au preparadas com alturas de 20, 50 e 100 nm de ouro foram caracterizadas por microscopia ótica. As imagens obtidas estão apresentadas na Figura 5.1 e possuem ampliação de 140 vezes. As imagens apresentadas na Figura 5.1 em (A), (B) e (C) correspondem às SHN-Pt/Au com alturas de 20, 50 e 100 nm de ouro, respectivamente.

Figura 5.1 – Imagens de microscopia ótica da SHN-Pt/Au. As imagens (A), (B) e (C) foram obtidas em diferentes regiões de superfícies contendo 20, 50 e 100 nm de espessura de ouro, respectivamente.

Fonte: Autoria própria.

As imagens obtidas apresentam superfície regular e homogênea para as superfícies contendo 20, 50 e 100 nm, respectivamente. Os pontos escuros são poeiras do ambiente. É possível observar claramente a regularidade das linhas nanoestruturadas de ouro bem como a forma retangular do contorno das mesmas. Devido às restrições técnicas do microscópio não foi possível registrar uma imagem panorâmica das superfícies híbridas nanoestruturadas Pt/Au, então fez-se necessário a caracterização das mesmas por microscopia eletrônica de varredura.

5.1.2 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura

As SHN-Pt/Au foram caracterizadas por MEV. As imagens apresentadas na Figura 5.2 em (A), (B) e (C) correspondem às superfícies com alturas de 20, 50 e 100 nm de ouro, respectivamente. Estas imagens mostram a morfologia das superfícies híbridas bimetálicas nanoestruturadas Pt/Au com defeitos não significativos. Os pontos claros e escuros observados nas imagens são atribuídos às sujeiras e poeiras contidas no ambiente que aderiram nas superfícies durante o preparo das superfícies para microscopia.

Figura 5.2 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura da SHN-Pt/Au. As imagens (A), (B) e (C) foram obtidas em três superfícies distintas contendo 20, 50 e 100 nm de espessura de ouro, respectivamente.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 5.3 apresenta um conjunto com nove imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície híbrida. As imagens foram obtidas em três superfícies distintas contendo 20, 50 e 100 nm de ouro, e com ampliações de 2.000, 3.000 e 5.000 vezes, respectivamente. Comparando-se as micrografias das SHN-Pt/Au, nota-se que os arranjos de microeletrodos interdigitados nanoestruturados de ouro exibem morfologia homogênea apresentando tamanho e distância entre linhas regulares com defeitos insignificantes. Além disso, é possível observar a eficiência do processo fotolitográfico como template para a obtenção do arranjo interdigitado nanoestruturado.

Figura 5.3 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura da SHN-Pt/Au. As imagens foram obtidas em três superfícies contendo 20, 50 e 100 nm de espessura de ouro, e com ampliações de 2.000, 3.000 e 5.000 vezes, respectivamente.

Fonte: Autoria própria.

Analisando-se o conjunto de imagens apresentadas nas Figuras 5.2 e 5.3, é possível concluir que o processo de fabricação por fotolitografia foi eficiente, obtendo nanoestruturas de ouro ordenadas sobre a superfície de platina e principalmente aumentando a reprodutibilidade destas superfícies nanoestruturadas. Este template se comporta de uma maneira semelhante a um sistema hóspede-hospedeiro. As imagens de MEV obtidas não são adequadas para calcular a altura média das superfícies híbridas bimetálicas nanoestruturadas de Pt/Au-20, Pt/Au-50 e Pt/Au-100 nm, então, as mesmas foram caracterizadas por microscopia de força atômica.

5.1.3 Caracterização por Microscopia de Força Atômica

A técnica microscopia de força atômica foi utilizada para avaliar a topografia das superfícies híbridas a fim de se verificar a distribuição e morfologia das estruturas formadas⁹⁴. A Figura 5.4 apresenta as imagens de AFM das SHN-Pt/Au.

As imagens apresentadas na Figura 5.4 em (A), (B) e (C) correspondem às SHN-Pt/Au com alturas de 20, 50 e 100 nm de ouro, respectivamente. O primeiro conjunto contendo três imagens (A), (B) e (C) estão em escala individual, entretanto o segundo conjunto de imagens (D), (E) e (F) estão em uma mesma escala para fins comparativos. Ambos os conjuntos de imagens possuem área de 55 μm^2 .

Figura 5.4 – Imagens de microscopia de força atômica modo operacional não contato, das SHN-Pt/Au com espessuras de 20 (A) e (D), 50 (B) e (E), 100 (C) e (F) nm de ouro.

Fonte: Autoria própria.

Similarmente às micrografias eletrônicas de varredura, as imagens de microscopia de força atômica apresentaram morfologia homogênea e regular independentemente da altura das nanoestruturas de ouro (20, 50 e 100 nm), além disso, apresentaram tamanho e distância entre linhas regulares com defeitos insignificantes, indicando mais uma vez a eficiência da técnica fotolitográfica como modulador de forma (template) orientando a morfologia e altura das nanoestruturas de ouro. Assim, atingindo um dos principais objetivos este trabalho: garantir a reprodutibilidade e repetibilidade da superfície híbrida nanoestruturada desenvolvida.

Imagens topográficas foram obtidas através de *cross-section* de regiões distintas das superfícies híbridas nanoestruturadas de Pt/Au. As imagens topográficas obtidas estão apresentadas nas Figuras 5.5, 5.6 e 5.7, respectivamente, bem como, as respectivas alturas, distância e largura das linhas nanoestruturadas de ouro.

Figura 5.5 – Imagens topográficas da SHN-Pt/Au com 20 nm de espessura de ouro.

Fonte: Autoria própria.

Figura 5.6 – Imagens topográficas da SHN-Pt/Au com 50 nm de espessura de ouro.

Fonte: Autoria própria.

Figura 5.7 – Imagens topográficas da SHN-Pt/Au com 100 nm de espessura de ouro.

Fonte: Autoria própria.

As alturas médias apresentadas pelas Figuras 5.5, 5.6 e 5.7 foram de 19,23 nm com desvio padrão de 0,76 nm, 51,38 nm com desvio padrão de 0,65 nm e 105,26 nm com desvio padrão de 0,65 nm, respectivamente. Além disso, apresentaram largura média de linhas nanoestruturadas de 9,92 µm com desvio padrão de 0,33 µm e distância média entre linhas de 10,42 µm com desvio padrão de 0,17 µm. A média e desvio padrão foram calculados de

acordo com as equações $X_m = \sum x_i / n$ e $RSD = 100 \times (S / X_m)$, respectivamente⁹². Portanto, as superfícies híbridas bimetálicas com as nanoestruturas de ouro é uma superfície micro/nanoestruturada proporcionando uma área eletroativa superior à apresentada pelos eletrodos convencionais bidimensionais. Além do aumento da área eletroativa, o tipo de nanoestrutura de ouro obtida sobre a platina é importante para o desempenho das superfícies resultantes.

5.2 Caracterização Eletroquímica

A caracterização eletroquímica dos eletrodos convencionais de platina e de ouro e as superfícies híbridas nanoestruturadas de Pt/Au foi feita em solução contendo 0,1 mol L⁻¹ de H₂SO₄ utilizando voltametria cíclica para verificar-se a formação dos óxidos de platina e de ouro. Em seguida, caracterizadas em solução contendo 5,0 mM de ferrocianeto e ferricianeto de potássio em 0,1 mol L⁻¹ de cloreto de potássio utilizando voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica.

5.2.1 Caracterização Eletroquímica do Eletrodo Convencional de Platina

Inicialmente realizou-se a caracterização da superfície do eletrodo de platina puro em uma solução contendo 0,1 mol L⁻¹ de ácido sulfúrico, a fim de se verificar a eficiência do procedimento de limpeza descrito na seção 3.4 e conhecer os processos redox envolvidos. A Figura 5.8 apresenta os voltamogramas cíclicos para o eletrodo de platina obtido à velocidade de varredura de potenciais de 1000 mV s⁻¹ após 100 ciclos, 500 mV s⁻¹ após 50 ciclos, 250 mV s⁻¹ após 25 ciclos e 100 mV s⁻¹ após 10 ciclos, em solução 0,1 mol L⁻¹ de H₂SO₄.

A Figura 5.8 apresenta a resposta eletroquímica do eletrodo de platina em solução de H₂SO₄ a 0,1 mol L⁻¹, demonstrando a influência da velocidade de varredura de potenciais aplicada durante o processo de polimento eletroquímico. Observa-se um decréscimo nas correntes de pico de acordo com o decréscimo da velocidade de varredura.

Figura 5.8 – Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de platina em solução contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico com velocidade de varredura de 1000 mV s^{-1} , 500 mV s^{-1} , 250 mV s^{-1} e 100 mV s^{-1} .

Fonte: Autoria própria.

O eletrodo de platina apresenta dois pares redox, no intervalo de potenciais entre -0,23 e 0,05 V, correspondente aos processos de adsorção e dessorção de hidrogênio sobre o eletrodo de platina devido à redução do próton em solução e à oxidação da monocamada de H_{ads} formada⁹⁵ como apresentado nas equações (1) e (2).

Este processo é reversível, pois as cargas envolvidas nos processos são idênticas e não foram observadas variações de carga com a variação da velocidade de varredura de potenciais⁹⁶. Estes processos de adsorção e dessorção de hidrogênio formam uma monocamada sobre os átomos de platina na superfície do eletrodo na proporção 1:1, onde cada átomo de platina acomoda um hidrogênio adsorvido. No intervalo de potenciais

compreendido entre 0,10 e 0,50 V vs. Ag/AgCl não ocorrem processos faradaicos, apenas processos de carga de dupla camada elétrica, onde as magnitudes de corrente se aproximam de zero. O intervalo de varredura de potenciais entre 0,50 e 1,30 V vs. Ag/AgCl apresenta um pico de oxidação relativo à formação de óxidos de platina sobre a superfície do eletrodo, caracterizado pelo aumento significativo de corrente neste intervalo e descrito pela equação (3).

Na varredura catódica observa-se a redução dos óxidos de platina em potenciais próximos a 0,43 V vs. Ag/AgCl e pode ser representado pela equação (4).

As intensidades de corrente de pico anódico e catódico referentes a adsorção/dessorção da monocamada de hidrogênio serão utilizados como indicação da área superficial da platina recoberta com as nanoestruturas de ouro.

5.2.2 Caracterização Eletroquímica do Eletrodo Convencional de Ouro

De maneira similar a caracterização eletroquímica dos eletrodos convencionais de platina, secundariamente realizou-se a caracterização da superfície do eletrodo de ouro em uma solução contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico, a fim de se verificar a eficiência do procedimento de limpeza descrito na seção 3.4 e conhecer os processos redox envolvidos. A Figura 5.9 apresenta os voltamogramas cíclicos para o eletrodo de ouro obtido à velocidade de varredura de potenciais de 1000, 500, 250 e 100 mV s^{-1} após 100, 50, 25 e 10 ciclos, respectivamente, em solução contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 . De acordo com Angerstein-Kozłowska *et. al.*⁹⁷ o voltamograma cíclico obtido apresenta a formação de óxido de ouro no intervalo de varredura de potenciais entre 1.00 e 1.45 V e a redução do óxido de ouro formado no potencial de pico catódico (EPC) de 0.80 V vs. Ag/AgCl.

Figura 5.9 – Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo convencional de ouro policristalino em solução contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 com velocidade de varredura de 1000 mV s^{-1} , 500 mV s^{-1} , 250 mV s^{-1} e 100 mV s^{-1} .

Fonte: Autoria própria.

O mecanismo de formação de óxido na superfície de ouro ocorre a partir da substituição de ânions especificamente adsorvidos, por moléculas de água e sua consequente oxidação com transferência de um elétron⁹⁸:

simultaneamente ocorre uma rotação da camada mais superficial do metal contendo a hidroxila adsorvida, este processo foi denominado *replacement-turnover* por Angerstein-Kozłowska e colaboradores⁹⁷ e pode ser sumarizado como:

A última etapa consiste na formação do óxido de ouro com transferência eletrônica e re-adsorção de moléculas de água na superfície oxidada.

No processo inverso ocorre novamente a rotação da camada mais superficial do metal e a redução do óxido de ouro, todavia ambos os processos são rápidos a temperatura ambiente e em baixas velocidades de varreduras. Assim, apenas um pico de redução em 0.80 V é observado, demonstrando que os resultados obtidos na Figura 5.9 estão de acordo com os dados da literatura.

5.2.3 Caracterização Eletroquímica da SHN-Pt/Au

A Figura 5.10 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos convencionais de platina e ouro, e para a superfície híbrida nanoestruturada de Pt/Au-100nm em solução contendo H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} . A magnitude de corrente foi normalizada pela área geométrica de cada superfície (Pt e Au = 0,032 e bimetalica Pt/Au = 0,283 cm^2) para fins comparativos.

Figura 5.10 – Voltamogramas cíclicos obtidos em solução contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 para os eletrodos de Pt (a) e Au (b) convencionais e para a SHN-Pt/Au-100nm (c). Velocidade de varredura de 1000 mV s^{-1} .

Fonte: Autoria própria.

Os voltamogramas cíclicos obtidos em (a), (b) e (c) apresentam o perfil característico para os eletrodos convencionais de Pt, Au e para a SHN-Pt/Au, respectivamente. O voltamograma obtido em (c) apresenta dois pares redox referentes à formação de uma monocamada de H_2 no intervalo de potenciais entre $-0,23$ e $0,20 \text{ V}$ e um par redox no intervalo de potenciais entre $0,20$ e $0,90 \text{ V}$ referentes à oxidação e à redução do óxido de platina, característicos da superfície de Pt e previamente discutidos. Comparando-se os voltamogramas em (a) e (c) pode ser observado o surgimento de um pico anódico em aproximadamente $1,15 \text{ V}$ e um pico catódico em $0,85 \text{ V}$ de baixa magnitude de corrente, atribuídos à oxidação e redução do óxido de ouro, respectivamente, como pode ser observado comparativamente no voltamograma em (b). Isso pode ser facilmente explicado pelo intervalo de varredura de potenciais limitado a $1,30 \text{ V}$. Este potencial não é suficientemente positivo para a formação eficiente do óxido de ouro, porém acima deste intervalo de varredura de potencial as camadas de platina e de ouro desprendem-se do substrato expondo o cromo (utilizado como camada aderente) e o próprio vidro.

A diminuição da magnitude de corrente dos picos referentes à adsorção/dessorção da monocamada de hidrogênio, bem como, dos picos referentes à oxidação/redução do óxido de platina e o surgimento dos picos em 1,15 e 0,85 V são fortes indícios da formação da superfície híbrida nanoestruturada Pt/Au. Este comportamento é evidenciado na caracterização por EIE.

A espectroscopia de impedância eletroquímica foi utilizada para auxiliar na caracterização do template sobre o eletrodo de platina, bem como em todas as etapas até a obtenção da superfície híbrida bifuncional Pt/Au-50 nm. A Figura 5.11 apresenta os gráficos de Nyquist para as superfícies de platina e ouro puros e para a SHN-Pt/Au obtidos em solução contendo 5 mmol de ferrocianeto/ferricianeto de potássio em 0,1 mol L⁻¹ de KCl utilizando potencial de circuito aberto.

Figura 5.11 – Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução contendo 0,1 mol L⁻¹ de KCl e 5,0 mmol L⁻¹ da sonda redox [Fe(CN)₆]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻ para a superfície de platina e ouro puros e para a SHN-Pt/Au-50 nm, em potencial de circuito aberto. Faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz e onda senoidal de 10 mV.

Fonte: Autoria própria.

A simulação dos resultados, aplicando-se um circuito de Randles modificado $R_s(CPE[R_{tc}Z_W])$, com o *software free Electrochemistry-ZView2* forneceu os parâmetros listados na Tabela I. R_s consiste na resistência da solução, o elemento de fase constante (CPE) representa um capacitor não ideal, enquanto R_{tc} é a resistência de transferência de carga e Z_W a impedância de Warburg.

A aplicação de ondas senoidais de baixa amplitude possibilitou uma boa separação de regiões de frequência onde a oxi-redução da sonda redox $[Fe(CN)_6]^{4-}/[Fe(CN)_6]^{3-}$ ocorre por controle cinético daquela onde a reação eletródica ocorre sob controle de transporte de massa. Nessas condições a constante de velocidade de transferência eletrônica heterogênea aparente (k_{app}) da reação pode ser determinada pela equação 9⁹⁹:

$$K_{app} = \frac{R T}{F^2 R_{tc} C A} \quad (9)$$

onde F é a constante de Faraday ($96\,485,3365\text{ C mol}^{-1}$), C é a concentração de $[Fe(CN)_6]^{4-}/[Fe(CN)_6]^{3-}$ em solução ($5,0\text{ mmol L}^{-1}$), R é a constante física dos gases ($8,3145\text{ J K mol}$), T é a temperatura em Kelvin (298 K), A é a área do eletrodo ($0,283\text{ cm}^2$) e R_{tc} é a resistência de transferência de carga obtida com a simulação dos resultados da Figura 5.11. Os valores de K_{app} obtidos estão listados na Tabela I.

Tabela I – Parâmetros obtidos a partir dos espectros de plano complexo (Figura 5.11) para a superfície de platina e ouro puros e para a SHN-Pt/Au-50 nm.

Superfícies	R_s (Ω)	CPE (μF)	R_{tc} (Ω)	W	K_{app} ($\mu\text{cm s}^{-1}$)
Au	39,68	0,28	214,1	0,5090	2,99
Pt	38,98	7,50	140,1	0,4763	2,89
Pt/Au	39,91	4,58	105,9	0,4739	3,97

O valor de resistência de transferência de carga referente à superfície híbrida nanoestruturada Pt/Au apresentou uma diminuição de aproximadamente 25 e 50% quando comparado as superfícies de Pt e Au puros, respectivamente, evidenciando o efeito da superfície híbrida na velocidade de transferência eletrônica. Consequentemente, a constante de velocidade de transferência eletrônica heterogênea aparente (k_{app}) apresentou um maior valor quando comparado a superfície de platina e ouro puros na mesma proporção (25 e 50%), confirmando a eficiência da SHN-Pt/Au na velocidade de transferência eletrônica. Esta característica da superfície híbrida nanoestruturada Pt/Au torna-se interessante para aplicação deste dispositivo em sensores e biossensores eletroquímicos.

A Figura 5.12 apresenta os voltamogramas cíclicos para a SHN-Pt/Au obtidos em solução contendo H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} após 100 ciclos a 1000 mV s^{-1} , em um intervalo de varredura de potenciais entre -0,23 e 1,25 V vs. Ag/AgCl.

Figura 5.12 – Voltamogramas cíclicos obtidos em solução contendo 0,1 mol L^{-1} de H_2SO_4 para superfície de Pt e para as três SHN-Pt/Au com espessura de 20, 50 e 100 nm de Au. Velocidade de varredura de 1000 mV s^{-1} .

Fonte: Autoria própria.

O estudo do comportamento voltamétrico das SHN-Pt/Au contendo 20, 50 e 100 nm demonstraram o surgimento de um pico de redução em aproximadamente 0,85 V, referente à redução dos óxidos de ouro. O pico anódico referente a formação dos óxidos de ouro em aproximadamente 1,15 V não foi evidente devido a pequena quantidade de ouro e principalmente devido ao intervalo de varredura de potenciais (até 1,25 V) não foi suficiente para completa oxidação dos óxidos de ouro nestas condições. Além disso, os picos referentes à oxidação e redução do óxido de platina diminuíram nos voltamogramas referentes à SHN-Pt/Au contendo 20, 50 e 100 nm de ouro, devido à diminuição de sítios ativos de platina expostos. O mesmo comportamento é observado para os picos de adsorção e dessorção de hidrogênio, devido a menor área eletroativa de platina disponível. Entretanto não há diferença significativa para se relacionar a magnitude de corrente de pico com a espessura das nanoestruturas de ouro formadas (20, 50 e 100 nm), então estas superfícies híbridas foram caracterizadas por EIE.

O efeito da espessura das nanoestruturas de ouro na cinética de transferência eletrônica fica mais evidente ao se observar os espectros de plano complexo da Figura 5.13. A resistência para transferência de carga exibida pela SHN-Pt/Au está intrinsecamente relacionado com a altura das nanoestruturas de ouro (20, 50 e 100 nm). Os diagramas de Nyquist apresentaram boa definição, assim, permitindo a simulação dos resultados aplicando-se um circuito de Randles modificado $R_s(CPE[R_{tc}Z_W])$, com o *software free Electrochemistry-ZView2*, fornecendo os parâmetros listados na Tabela II. Lembrando que R_s consiste na resistência da solução, o elemento de fase constante (CPE) representa um capacitor não ideal, enquanto R_{tc} é a resistência de transferência de carga e Z_W a impedância de Warburg.

Figura 5.13 – Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ da sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ para a SHN-Pt/Au contendo 20, 50 e 100 nm de ouro, em potencial de circuito aberto. Faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz e onda senoidal de 10 mV.

Fonte: Autoria própria.

Os valores de resistência de transferência de carga variaram de acordo com o aumento da altura das nanoestruturas de ouro (20 – 100 nm) da SHN-Pt/Au, consequentemente, os valores da constante de velocidade de transferência eletrônica heterogênea aparente (K_{app}) variaram de acordo com a variação da altura das nanoestruturas de ouro, indicando o efeito das nanoestruturas de ouro no aumento da velocidade de transferência eletrônica na superfície híbrida. Com estes resultados interessantes não foi possível selecionar uma superfície ideal entre 20, 50 e 100 nm de ouro, então, as mesmas superfícies serão avaliadas com relação à determinação de glicose posteriormente.

Tabela II – Parâmetros obtidos a partir dos espectros de plano complexo (Figura 5.13) para as SHN-Pt/Au contendo 20, 50 e 100 nm de espessura de ouro.

Superfícies	R_s (Ω)	CPE (μF)	R_{tc} (Ω)	W	K_{app} ($\mu cm s^{-1}$)
Pt/Au-20 nm	50,75	6,52	98,35	0,53	0,649
Pt/Au-50 nm	66,79	5,37	105,92	0,47	2,631
Pt/Au-100 nm	70,09	4,58	77,32	0,48	3,975

5.3 Superfície Híbrida Bifuncional Pt/Au-SAM-GOx

5.3.1 Preparação e Caracterização da Superfície Híbrida Bifuncional Pt/Au-SAM-GOx

Após a caracterização morfológica e eletroquímica da SHB-Pt/Au foi realizado o procedimento de imobilização de uma monocamada auto-montada (SAM) através da imersão das superfícies híbridas bimetálicas em solução contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido 11-mercaptopundecanóico por um período de 20 horas. Paralelamente, o mesmo procedimento de imobilização foi realizado em um eletrodo convencional de platina e também em um eletrodo convencional de ouro, a fim de se obter um intervalo de varredura de potenciais suficiente para remover a SAM somente da área de platina, mantendo-se sobre a área de ouro da superfície híbrida, assim, criando um ambiente amigável para imobilização da biomolécula.

Primeiramente, a Figura 5.14 (A) e (B) apresentam os voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo convencional de platina e de ouro, respectivamente, em solução contendo $5,0 \text{ mmol}$ de ferrocianeto/ferricianeto de potássio em $KCl 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e a Figura 5.14 (C) e (D) apresentam os voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo convencional de platina e de ouro, respectivamente, em solução contendo $H_2SO_4 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 5.14 – Voltamogramas cíclicos obtidos em solução contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ da sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} para os eletrodos convencionais de Pt (A) e Au (B). Etapa de dessorção seletiva (DS) da monocamada auto organizada em (C) e (D) em solução contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 após 100 ciclos a 1000 mV s^{-1} , respectivamente. Cada voltamograma cíclico corresponde a um intervalo de varredura de potenciais utilizados na DS em solução contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 .

Fonte: Autoria própria.

Os voltamogramas cíclicos obtidos na Figura 5.14 apresentam o comportamento característico e bem conhecido na literatura para substratos condutores metálicos (platina e ouro) nas condições descritas. Em (A) e (B) os voltamogramas em **preto** representam as superfícies limpas e puras de Pt e Au, respectivamente. O pico de oxidação e redução em aproximadamente em 0,27 e 0,20 V vs. Ag/AgCl é atribuído à transferência eletrônica entre as superfícies metálicas (Pt e Au) e o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$. Os voltamogramas apresentados em **vermelho** apresentam ausência dos picos de oxidação e redução referentes à transferência eletrônica entre as superfícies metálicas (Pt e Au) e o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ indicando a formação da monocamada sobre a Pt e Au. Este comportamento é característico e bem

conhecido na literatura⁹⁰, os alcanotíóis com cadeia carbônica extensa dificultam ou bloqueiam a transferência eletrônica na superfície dos substratos condutores.

Após a imobilização da SAM, as superfícies metálicas (Pt e Au) foram submetidas a varreduras cíclicas de potenciais em solução contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 , variando-se o intervalo de potenciais compreendido entre -0,23 e 0,9-1,2 V a fim de obter o intervalo ideal para remoção da monocamada apenas da superfície da platina, entretanto permanecendo sobre a superfície de ouro. Quando utilizado o intervalo de varredura de potenciais entre -0,25 e 1,1 V em H_2SO_4 (Figura 5.14 (C) e (D)) observou-se que a superfície de platina apresentou o mesmo perfil voltamétrico da superfície de platina pura antes da imobilização da SAM em solução contendo a sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ (voltamogramas em **preto** e **ciano** da Figura 5.14 (A)), entretanto quando a superfície de ouro foi submetida ao mesmo procedimento observou-se que o perfil voltamétrico da superfície de ouro continuou apresentando ausência dos picos de oxidação e redução da sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em solução (Figura 5.14 (B)) indicando que o intervalo de varredura de potenciais entre -0,23 e 1,1 V realizado em H_2SO_4 é suficiente para remover a monocamada auto-montada da platina porém o mesmo intervalo de potenciais não é suficiente para remover a SAM da superfície de ouro. Este comportamento pode ser facilmente explicado através da discussão apresentada nos itens 5.2.1 e 5.2.2, o intervalo de varredura de potenciais compreendido entre -0,23 e 1,1 V é suficiente apenas para formação dos óxidos de platina, entretanto não é suficiente para a formação dos óxidos de ouro. Ao ocorrer a oxidação e redução dos óxidos de platina entre -0,23 e 1,1 V ocorre também a formação da monocamada de hidrogênio sobre a platina, consequentemente a SAM é removida. Enquanto que a formação dos óxidos de ouro ocorre somente em potenciais superiores a 1,1 V.

A Figura 5.15 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para a SHB-Pt/Au após o procedimento de limpeza eletroquímica obtidos em solução contendo 5,0 mmol de ferrocianeto/ferricianeto de potássio em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl.

Figura 5.15 – Voltamogramas cíclicos obtidos em solução contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ da sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} para SHN-Pt/Au (a), Pt/Au/SAM (b) e Pt/Au-SAM_{dessorção seletiva} (c).

Fonte: Autoria própria.

O voltamograma em (a) representa a SHN-Pt/Au, o pico de oxidação e redução em aproximadamente em 0,303 e 0,152 V vs. Ag/AgCl é atribuído a transferência eletrônica entre a superfície híbrida nanoestruturada Pt/Au e o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$. O voltamograma apresentado em (b) apresenta ausência dos picos de oxidação e redução referentes à transferência eletrônica entre superfície híbrida nanoestruturada Pt/Au e o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ indicando a formação da monocamada sobre a toda a superfície. Após o procedimento de dessorção seletiva realizado em H_2SO_4 entre -0,25 e 1,1 V, a superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM apresentou o voltamograma em (c) com o ressurgimento dos picos de oxidação e redução em 0,313 e 0,152 V, respectivamente, porém os picos apresentam magnitudes de corrente de pico anódico e catódico inferiores a SHN-Pt/Au antes da imobilização da SAM, indicando que o procedimento de dessorção seletiva expõe a superfície de Pt e a SAM permanece imobilizada sobre as nanoestruturas de ouro. Estes resultados corroboram e podem ser confirmados com os resultados obtidos na espectroscopia de impedância eletroquímica.

A Figura 5.16 apresenta os gráficos de Nyquist obtidos em solução contendo 5,0 mmol de ferrocianeto/ferricianeto de potássio em 0,1 mol L⁻¹ de KCl utilizando potencial de circuito aberto para a SHN-Pt/Au antes e após o procedimento de limpeza eletroquímica.

Figura 5.16 – Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução contendo 0,1 mol L⁻¹ de KCl e 5,0 mmol L⁻¹ da sonda redox [Fe(CN)₆]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻ para a SHN-Pt/Au (a), Pt/Au/SAM (b) e Pt/Au-SAM_{dessorção seletiva} (c) em potencial de circuito aberto. Faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz e onda senoidal de 10 mV.

Fonte: Autoria própria.

Analisando-se as Figuras 5.15 e 5.16 ficou evidente a eficiência do procedimento de limpeza eletroquímica realizado em H₂SO₄, removendo a SAM adsorvida da superfície de platina. Os diagramas de Nyquist apresentaram boa definição, assim, permitindo a simulação dos resultados aplicando-se um circuito de Randles modificado $R_s(CPE[R_{tc}Z_w])$, com o *software free Electrochemistry-ZView2*, fornecendo os parâmetros listados na Tabela III. Ao comparar as R_{tc} listadas na Tabela III obtidas para as superfícies híbridas nanoestruturadas Pt/Au é possível observar que a R_{tc} aumenta drasticamente com a imobilização da SAM de 53 para 1.879 Ω e após o procedimento de polimento eletroquímico realizado em H₂SO₄ diminuí consideravelmente para 606 Ω configurando a superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM. Estes resultados estão de acordo com os resultados da Figura 5.16. Considerando que a R_{tc}

para a superfície híbrida nanoestruturada Pt/Au 100% imobilizada com a SAM foi de 1.879 através de uma relação simples pode-se estimar que há uma relação de 65% de área para a Pt e de 35% para o Au.

Tabela III – Parâmetros obtidos a partir dos espectros de plano complexo (Figura 5.16) para a SHN-Pt/Au, Pt/Au/SAM e Pt/Au-SAM_{dessorção seletiva} contendo 50 nm de espessura de Au.

Superfícies	R_s (Ω)	CPE (μF)	R_{tc} (Ω)	W	K_{app} ($\mu cm s^{-1}$)
Pt/Au	45,26	0,161	53,51	0,500	3,52
Pt/Au/SAM	66,79	2,683	1879	0,173	0,10
Pt/Au-SAM_{DS}	72,26	1,614	606,9	0,273	0,31

Então, estes resultados são atribuídos a superfície de platina disponível na superfície híbrida nanoestruturada Pt/Au comprovando a eficácia do procedimento de dessorção seletiva para remoção da SAM adsorvidas somente à superfície de Pt, constituindo assim a SHB-Pt/Au. A Figura 5.17 apresenta uma representação esquemática resumindo a obtenção da SHB-Pt/Au.

Figura 5.17 – Representação esquemática para preparação da superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM_{dessorção seletiva}. As setas indicam a sequência das etapas de preparação.

Fonte: Autoria própria.

O mesmo procedimento foi realizado para os alcanotióis cistamina e ácido mercaptoacético. Os intervalos de varreduras de potenciais obtidos para dessorção de cada SAM sobre a superfície de Pt estão listados na Tabela IV. O potencial final no intervalo de varredura está intrinsicamente relacionado com o comprimento da cadeia carbônica do alcanotiol utilizado para formação da monocamada auto-montada, ou seja, quanto maior o comprimento da cadeia carbônica maior será o potencial final requerido para dessorção da SAM somente da superfície da Pt.

Tabela IV – Intervalo de varredura de potenciais para obtenção da SHN-Pt/Au-SAM_{dessorção seletiva}

SAM	Intervalo de Varredura de Potenciais
Ácido 11-mercaptoundecanóico	-0,23 a 1,1 V
Ácido mercaptoacético	-0,23 a 0,8 V
Cistamina	-0,23 a 0,7 V

5.3.2 Imobilização da Biomolécula

Após a caracterização da SHB-Pt/Au-SAM a biomolécula foi imobilizada pelo método de ligação covalente com auxílio de EDC/NHS sobre a SHB-Pt/Au-SAM por meio da adição de 25 μL da enzima glicose oxidase (*Aspergillus niger*) e 20 μL do mediador de elétrons ferroceno. Todas as etapas foram caracterizadas por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica.

A Figura 5.18 apresenta os voltamogramas cíclicos para todas as etapas de construção da superfície híbrida bifuncional Pt/Au-Fe-GOx obtidos em solução contendo 5,0 mmol de ferrocianeto/ferricianeto de potássio em 0,1 mol L⁻¹ de KCl utilizando potencial de circuito aberto.

Figura 5.18 – Voltamogramas cíclicos obtidos em solução contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ da sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Fonte: Autoria própria.

Os voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 5.18 referentes à superfície híbrida nanoestruturada Pt/Au, Pt/Au/SAM antes e após o procedimento de dessorção seletiva foram discutidos no item 5.3 e serão omitidos aqui para que o texto não se torne repetitivo. Os voltamogramas cíclicos representados em ciano e pink são referentes à adição de ferroceno e à imobilização de GOx, respectivamente. Nota-se que não há diferenças significativas nos potenciais de pico de oxidação e redução bem como nas magnitudes de correntes de pico anódico e catódico com a adição de ferroceno, pois os potenciais de oxidação e redução do par $\text{Fe}^{\text{II/III}}$ do ferroceno apresentam valores próximos aos potenciais de oxidação e redução da sonda redox em solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. O voltamograma cíclico referente a adição da biomolécula apresentou uma diminuição significativa das magnitudes de corrente de pico anódico e catódico indicando a imobilização da glicose oxidase na superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM-Fe. Essa diminuição significativa nas magnitudes de corrente pode ser atribuída à camada protéica da enzima dificultando o tunelamento dos elétrons na superfície. A superfície de Pt não apresenta um ambiente biocompatível para imobilização enzimática então a mesma terá sua estrutura tridimensional deformada sobre a Pt entretanto permanecendo sobre a monocamada auto-montada imobilizada sobre as nanoestruturas de

ouro. O mesmo comportamento foi evidenciado na espectroscopia de impedância eletroquímica.

A Figura 5.19 apresenta os gráficos de Nyquist obtidos em solução contendo 5,0 mmol de ferrocianeto/ferricianeto de potássio em 0,1 mol L⁻¹ de KCl utilizando potencial de circuito aberto para a superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM-Fe-GOx.

Figura 5.19 – Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução contendo 0,1 mol L⁻¹ de KCl e 5,0 mmol L⁻¹ da sonda redox [Fe(CN)₆]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻ para a superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM_{DS}-Fe-GOx (A) em potencial de circuito aberto. Faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz, onda senoidal de 10 mV. (B) *Inset* da Figura 5.19 (A).

Fonte: Autoria própria.

Os espectros de plano complexo da Figura 5.19 apresentam um aumento significativo da resistência de transferência de carga e da capacitância para a superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM_{DS}-Fe-GOx indicando a imobilização da enzima glicose oxidase sobre a monocamada auto-montada. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos na caracterização voltamétrica e significam que a biomolécula foi adequadamente imobilizada na superfície.

5.3.3 Efeito da Monocamada Auto-organizada

O efeito da monocamada auto-organizada na superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM_{DS}-Fe-GOx foi estudado em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ na ausência e na presença de 1,25–14,7 μmol L⁻¹ de glicose em solução a fim de se investigar a SAM com melhores resultados para determinação de glicose utilizando o biodispositivo. A Figura 5.20 (A), (B) e (C) apresenta os voltamogramas cíclicos para a superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM_{DS}-Fe-GOx (SAM: Cistamina, ácido mercaptoacético e ácido 11-mercaptoundecanóico), respectivamente, obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ na ausência e na presença de glicose.

Figura 5.20 – Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ na ausência e na presença de 1,25–14,8 μmol L⁻¹ de glicose para a SHB-Pt/Au-SAM_{DS}-Fe-GOx (SAM: Cistamina (A), ácidos mercaptoacético (B) e 11-mercaptoundecanóico (C)).

Fonte: Autoria própria.

Os voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 5.20 (B) e (C) apresentaram aumento da magnitude de corrente de pico de acordo com o aumento da concentração de glicose em solução para as superfícies híbridas bifuncionais nanoestruturadas Pt/Au-SAM-Fe-GOx (SAM: ácido mercaptoacético e ácido 11-mercaptoundecanóico), respectivamente. Indicando que para essas superfícies híbridas há linearidade entre os sinais analíticos e diferentes concentrações de glicose em solução enquanto que o mesmo comportamento não foi evidenciado para a Figura 5.21 (A) quando utilizado a cistamina para a formação da monocamada auto organizada.

No detalhe (*Inset*) das Figuras 5.20 (B) e (C) é possível observar uma relação linear entre a corrente de pico catódica e a variação de concentração de glicose em solução. Quando utilizado o ácido mercaptoacético para a formação da monocamada auto-organizada obte-se uma relação linear melhor, quando comparado ao ácido 11-mercaptoundecanóico, demonstrando a influência do comprimento da cadeia carbônica dos alcanotióis. O ácido mercaptoacético apresenta apenas dois carbonos em sua cadeia, provavelmente, isso favorece a redução de peróxido de hidrogênio produzida na catálise enzimática da glicose oxidase. Enquanto que um maior comprimento de cadeia (onze carbonos) dificulta a permeação do H_2O_2 até a superfície de Pt. O ácido 11-mercaptoundecanóico e o ácido mercaptoacético podem ser utilizados para a formação da monocamada auto-organizada (SAM) porém optou-se por utilizar o ácido mercaptoacético para a sequência dos estudos.

5.3.4 Efeito da Espessura da Nanoestrutura de Ouro Sobre a Determinação de Glicose

O efeito da altura ou da espessura das nanoestruturas da superfície híbrida bifuncional Pt/Au contendo 20, 50 e 100 nm de ouro (linhas do arranjo interdigitado) foi estudado em relação a determinação de glicose em solução. A Figura 5.21 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ na presença de 2,50 μmol L⁻¹ para a superfície híbrida bifuncional Pt/Au contendo 20, 50 e 100 nm de ouro.

Figura 5.21 – Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $2,50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de glicose para a SHB-Pt/Au-SAM_{DS}-Fe-GOx (SAM: ácido mercaptoacético) contendo 20 (a), 50 (b) e 100 (c) nm de espessura de Au.

Fonte: Autoria própria.

Os voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 5.22 apresentaram diferenças não significativas entre os potenciais de pico anódico e na magnitude de corrente de pico anódico com a altura da superfície híbrida bifuncional Pt/Au contendo 20, 50 e 100 nm de ouro. As relações de potencial de pico e corrente de pico anódico com a altura das nanoestruturas de ouro da superfície híbrida são apresentados na Figura 5.22. Os dados para as relações apresentadas na Figura 5.22 foram extraídos dos voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 5.21.

Figura 5.22 – Relação do potencial de pico anódico e corrente de pico anódico com a espessura das nanoestruturas de ouro na SHB-Pt/Au-SAM_{DS}-Fe-GOx. Dados extraídos da Figura 5.21.

Fonte: Autoria própria.

As relações de potencial e corrente de pico anódico com a altura das nanoestruturas de ouro da superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM-Fe-GOx apresentaram diferenças não significativas. O potencial de pico anódico variou apenas 3,0 mV, enquanto que a corrente de pico anódica variou 7,0 μA com o aumento de 20 a 100 nm de ouro. Então optou-se por construir curvas analíticas para cada superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM-Fe-GOx contendo 20, 50 e 100 nm de ouro e relacionar a tangente (*slope*) com a altura das nanoestruturas de ouro no biodispositivo. As curvas analíticas foram obtidas em uma faixa de concentração entre 0 e 14,74 $\mu mol L^{-1}$ de glicose em solução tampão fosfato 0,1 $mol L^{-1}$. Os sinais analíticos foram amostrados em 0,18 V.

A Figura 5.23 apresenta a relação obtida entre a sensibilidade das curvas analíticas e a espessura das nanoestruturas de ouro (20, 50 e 100 nm) obtidas para cada superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM-Fe-GOx.

Figura 5.23 – Relação da tangente das curvas analítica (*slope*) obtidas com 20, 50 e 100 nm de espessura de Au da SHB-Pt/Au-SAM_{DS}-Fe-GOx.

Fonte: Autoria própria.

A tangente da curva analítica obtida para SHB-Pt/Au-SAM-Fe-GOx aumentou de 0,10 para 0,23 proporcionalmente 2,5 vezes de acordo com o aumento da espessura das nanoestruturas de ouro entre 20 e 50 nm. Indicando que de acordo com o aumento da espessura há um aumento de enzima imobilizada na superfície, consequentemente, aumentando a sensibilidade representada pela tangente. Entretanto quando a espessura das nanoestruturas dobrou de 50 para 100 nm a sensibilidade (tangente) da curva analítica diminuiu de 0,23 para 0,19, representando uma diminuição de 20%. Sugerindo que o aumento da quantidade da enzima imobilizada na superfície impede a difusão do H₂O₂ até a superfície de platina e/ou a difusão da glicose até o sítio ativo da enzima. Então, optou-se por utilizar a superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM-Fe-GOx com 50 nm de ouro de espessura.

5.3.5 Superfície Híbrida Bifuncional Pt/Au-SAM-Fe-GOx para Detecção de Glicose

A Figura 5.24 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ na ausência e na presença de 1,25–14,7 μmol L⁻¹ de glicose para a superfície híbrida bifuncional nanoestruturada Pt/Au-SAM-Fe-GOx. O aumento da concentração de

glicose em solução a corrente de pico catódica ($E_{PC} = 0,168 \text{ V}$) produziu um aumento significativo na magnitude de corrente de pico catódica.

Figura 5.24 – Voltamogramas cíclicos para a superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM-Fe-GOx (SAM: ácido mercaptoacético) obtidos em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $1,25\text{--}14,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de glicose.

Fonte: Autoria própria.

Nestes biossensores a reação biocatalítica envolve a redução do grupo flavina (FAD) na enzima por reação com a glicose para dar a forma reduzida da enzima (FADH_2), seguido pela reoxidação da flavina pelo oxigênio molecular para regenerar a forma oxidada da GOx(FAD) . Detecção de peróxido têm a vantagem de ser mais simples, especialmente quando dispositivos miniaturizados são utilizados. Tais medidas são normalmente realizadas em um eletrodo de platina a um potencial anódico de aproximadamente $+700 \text{ mV}$ (vs Ag/AgCl)¹⁰⁰ e potencial de redução de H_2O_2 é de aproximadamente -500 mV (vs Ag/AgCl)¹⁰¹. Estas sobretensões elevadas oxidariam o ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU) no sangue humano, resultando numa interferência na detecção do analito¹⁰⁰. Assim, propõe-se o uso de Fc como mediador para a diminuição da sobretensão para a redução de H_2O_2 . Os processos ocorrem de acordo com a seguinte reação:

onde Fc and Fc^+ representam as formas reduzida e oxidada, respectivamente. $\text{GOx}(\text{FAD})$ e $\text{GOx}(\text{FADH}_2)$ são as formas oxidada e reduzida, respectivamente, da GOx. Isto pode ser facilmente confirmada por estudos reportados na literatura, por exemplo, ^{102; 103; 104}.

Na obtenção da curva analítica foram realizados sucessivos voltamogramas cíclicos para a superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM-Fe-GOx, em solução tampão fosfato a 0.1 mol L^{-1} a uma velocidade de varredura de potenciais de 50 mV s^{-1} para sucessivas adições de $25 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução estoque de glicose a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. A Figura 5.24 apresenta os voltamogramas obtidos para diferentes concentrações de glicose.

Figura 5.25 – Curva analítica obtida para a superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM-Fe-GOx.

Fonte: Autoria própria.

Os valores de corrente de pico catódica produziram uma relação linear com a concentração de glicose. A curva analítica (Figura 5.25) foi linear no intervalo de concentração estudado de glicose entre 1,25 e 14,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ representada pela equação ($I \text{ (A)} = -8,1 \times 10^{-8} \pm 2,5 \times 10^{-8} + 0,19 \pm 2,8 \times 10^{-3} [\text{glicose}] \text{ (mol L}^{-1})$) com um coeficiente de correlação linear (r) de 0.999. O limite de detecção obtido foi de $1,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Os excelentes resultados no desempenho eletroanalítico destaca a atividade electrocatalítica do dispositivo híbrido nanoestruturado na electro-oxidação de H_2O_2 indicando que este biossensor pode ser uma excelente alternativa para a detecção de glicose.

O desempenho da superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM-Fe-GOx desenvolvida foi comparado com outros transdutores para determinação de glicose recentemente publicados baseados na utilização de diferentes superfícies e diferentes técnicas de detecção (Tabela V), confirmando a eficiência da SHB-Pt/Au-SAM-Fe-GOx e sua sensibilidade para detecção de glicose. A Tabela V mostra que a superfície bifuncional exibe uma performance analítica superior quando comparada a outros sensores reportados na literatura.

Tabela V – Comparação entre o biossensor proposto com outros transdutores recentemente publicados.

Técnica	Transdutores	Sensibilidade	LOD (μM)	Referências
Amperometria	NPAuPt/NTC/líquido iônico/GC	$3,47 \mu\text{A M}^{-1}$	10	¹⁰⁵
Amperometria	Quitosana/NPNiFe ₂ O ₄ /GC	$0,04 \text{ A M}^{-1}$	100	¹⁰⁶
Amperometria	Ferroceno-carbonol-beta-ciclodextrina/MWCNT/GC	-	2,2	¹⁰⁷
Amperometria	líquido iônico/Au	-	3,5	¹⁰⁸
Voltametria	NPAu/GOx/GC	-	1,6	¹⁰⁹
Amperometria	(PVS/PAMAMAu) ₃ @CoHCF-GOx	$33,6 \text{ nA}$ $\text{mmol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	17	¹¹⁰
Potenciometria	NPAg/Ag	-	10	¹¹¹
Voltametria	Pt/Au-SAM-Fe-GOx	$0,18 \text{ A M}^{-1}$	0,12	Este trabalho

5.3.6 Constante Cinética Aparente de Michaelis-Menten (K_M^{app}) e Constante Catalítica K_{cat}

A relação entre o substrato e a enzima, explicada em 1913 por Michaelis e Menten¹¹², postula que a enzima e o substrato estão em equilíbrio com seu complexo, o qual, em seguida, dissocia-se para formar o produto e enzima. Um valor estimado da taxa de dissociação do intermediário enzima-substrato, sem mudança do substrato em produto é fornecido pela constante cinética aparente de Michaelis-Menten (K_M^{app}). A constante cinética aparente de Michaelis-Menten fornece informações importantes sobre a atividade catalítica e afinidade entre enzima e substrato. O valor de K_M^{app} pode ser obtida por análise de regressão linear, utilizando a equação de Lineweaver-Burk^{113; 114; 115}: $I_{ss}^{-1} = I_{max}^{-1} + K_M^{app} I_{max}^{-1} [\text{glicose}]^{-1}$. Onde I_{ss} é a corrente de estado estacionário obtida para o produto enzimático e I_{max} é a corrente máxima sob condição de saturação do substrato (glicose). A equação de Lineweaver-Burk para a superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM-Fe-GOx foi de $I_{ss}^{-1} = 7,9 \times 10^4 + 2,7 [\text{glicose}]^{-1}$ (coeficiente de correlação de 0,991). Assim, a K_M^{app} pode ser simplesmente obtida multiplicando-se a inclinação do gráfico ($1/I_{ss}$ versus $1/[\text{glicose}]$) por I_{max} . Os valores de I_{max} e K_M^{app} obtidos foram $3,7 \times 10^{-6}$ A e $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectivamente. A Tabela VI apresenta os valores de K_M^{app} relatados na literatura para diferentes transdutores utilizando glicose como substrato.

Tabela VI – Valores de K_M^{app} para diferentes transdutores contendo glicose oxidase.

Biossensor	K_M^{app} (M)	Referência
AChE-AuNPs-SiSG/GCE	450×10^{-6}	64
(GOD/GNp/MWCNTs) ₉ Pt	$14,9 \times 10^{-3}$	66
GOx/Au-PtNPs/CNTs/CS/GCE	$10,73 \times 10^{-3}$	69
CS-GA-GOx/Nafion/PtPd-MWCNTs/GCE	$3,3 \times 10^{-3}$	60
GS-CS-PtPd/ChOx	$0,11 \times 10^{-3}$	116
Pt/Au-SAM-Fe-GOx	$1,0 \times 10^{-5}$	Este trabalho

O valor de K_M^{app} obtido indica uma elevada afinidade do substrato (glicose) com o sítio ativo de GOx imobilizada na superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM-Fe-GOx. Isso sugere que a enzima imobilizada no transdutor Pt/Au-SAM-Fe-GOx, apresenta elevada atividade catalítica com elevada afinidade para a glicose, devido a um aumento da taxa de transferência eletrônica.

Além de K_M^{app} e I_{max} , uma outra constante cinética importante é a constante catalítica k_{cat} , definida como número máximo de mols de substrato que podem ser convertidos em produto por mol de enzima em uma unidade de tempo. Em 1925 Briggs e Haldane¹¹⁷ propuseram a existência de um estado estacionário, em que a concentração do complexo enzima-substrato permanece constante ao longo do tempo e a velocidade de formação desse complexo é aproximadamente igual a velocidade da sua dissociação. De acordo com Lineweaver–Burk¹¹⁴, em condições de estado estacionário, a k_{cat} pode ser calculada a partir da equação $I_{max} = k_{cat} [E]$, onde I_{max} é a corrente máxima sob condição de saturação do substrato (glicose) obtida quando a concentração de enzima ($[E]$) existe completamente na forma do complexo enzima-substrato. Os valores de I_{max} e k_{cat} obtidos foram $3,7 \times 10^{-6}$ A e 28.3 s^{-1} , respectivamente. Bright e Gibson¹¹⁸ e Gibson *et. al.*¹¹⁹ reportaram que a k_{cat} para a transformação do complexo glicose-enzima_{oxi} para o complexo lactona-enzimared foi de 1000 e 1150 s^{-1} , respectivamente. O valor de k_{cat} obtido para superfície híbrida bifuncional Pt/Au-SAM-Fe-GOx é duas vezes maior com relação aos encontrados na literatura, isso indica a eficiência da SHB-Pt/Au-SAM-Fe-GOx na determinação de glicose.

5.4 Avaliação da SHN-Pt/Au para Detecção Eletroquímica de Ácido Ascórbico, Dopamina, Hidroquinona e Nitrito

A superfície híbrida nanoestruturada Pt/Au (sem modificação) foi avaliada com relação a detecção eletroquímica de ácido ascórbico, dopamina, hidroquinona e nitrito com a finalidade de verificar a potencialidade da SHN-Pt/Au na utilização como sensor eletroquímico.

A Figura 5.26 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de ácido ascórbico em (A), dopamina em (B), hidroquinona em (C) e nitrito em (D) para a superfície híbrida nanoestruturada Pt/Au. Na obtenção da curva analítica foram realizados sucessivos voltamogramas de pulso diferencial

para a SHN-Pt/Au, em solução tampão fosfato a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a uma velocidade de varredura de potenciais de 10 mV s^{-1} para sucessivas adições dos analitos em solução a partir de uma solução estoque. A Figura 5.26 apresenta os voltamogramas obtidos para diferentes concentrações dos analitos e no detalhe de cada gráfico é apresentada a curva analítica obtida. É claramente observado um aumento significativo na magnitude de corrente de pico catódica em função do aumento da concentração dos analitos em solução.

Figura 5.26 – Voltamogramas de pulso diferencial para a superfície híbrida nanoestruturada Pt/Au obtidos em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $8,17\text{--}100 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico (A); $0,27\text{--}1,73 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina (B); $14,5\text{--}678 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de hidroquinona (C); $49,9\text{--}247 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de nitrito (D); $0,4\text{--}0,98 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido úrico (E).

Fonte: Autoria própria.

A Tabela VII lista as características analíticas obtidas como equação da reta, intervalo linear, sensibilidade, limite de detecção e correlação linear. Os resultados indicam a potencialidade da SHN-Pt/Au na utilização como sensores eletroquímicos, entretanto há a desvantagem com relação aos potenciais de pico de oxidação são próximos, implicando em

uma baixa seletividade. Devido a estas características foi explorado somente a potencialidade da SHN-Pt/Au, consequentemente, a aplicação em amostras contendo estes analitos não foram avaliadas.

Tabela VII – Características analíticas para detecção dos biomarcadores ácido ascórbico, ácido úrico, dopamina, hidroquinona e nitrito.

Analito	Equação da reta	Sensitividade	LOD	r
Ácido ascórbico	$I(A) = -2,3 \times 10^{-7} + 0,0045 C_{AA} \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$	$0,0045 \text{ A mol}^{-1} \text{ L}$	$207 \mu\text{M}$	0,998
Dopamina	$I(A) = -1,2 \times 10^{-7} + 0,70 C_D \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$	$0,70 \text{ A mol}^{-1} \text{ L}$	$0,38 \mu\text{M}$	0,999
Hidroquinona	$I(A) = 9,9 \times 10^{-8} + 0,017 C_H \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$	$0,017 \text{ A mol}^{-1} \text{ L}$	$11,1 \mu\text{M}$	0,999
Nitrito	$I(A) = 1,8 \times 10^{-8} + 3,4 \times 10^{-3} C_N \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$	$3,3 \times 10^{-3} \text{ A mol}^{-1} \text{ L}$	$11,31 \mu\text{M}$	0,999
Ácido úrico	$I(A) = 9,0 \times 10^{-6} + 3,9 C_{AU} \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$	$3,9 \text{ A mol}^{-1} \text{ L}$	$0,22 \mu\text{M}$	0,999

5.5 Superfície Híbrida Nanoestruturada Pt/Au/SAM/Anticortisol para Detecção de Cortisol

A Figura 5.27 apresenta os diagramas de Nyquist obtidos em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ das sondas redox na ausência e na presença de $1,0 \times 10^{-12} - 1,0 \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$ ($3,1 \times 10^{-15} - 2,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) de cortisol para a SHN-Pt/Au/SAM/anticortisol-cortisol. O aumento da concentração de cortisol imobilizado na superfície híbrida nanoestruturada Pt/Au/SAM/Anticortisol produziu um aumento significativo na resistência de transferência de carga dos diagramas de Nyquist sugerindo que o cortisol foi eficientemente adsorvido no transdutor.

Figura 5.27 – Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ das sondas redox para o imunossensor Pt/Au/SAM/Anticortisol na ausência e na presença de $1,0 \times 10^{-12} - 1,0 \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$ ($3,1 \times 10^{-15} - 2,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) de cortisol (A). Respectivos *fitting* em (B).

Fonte: Autoria própria.

A simulação dos resultados, aplicando-se um circuito de Randles modificado $R_s(CPE[R_{tc}Z_w])$, com o *software-free Electrochemistry-ZView2* forneceu os parâmetros: R_s consiste na resistência da solução, o elemento de fase constante (CPE) representa um capacitor não ideal, enquanto R_{tc} é a resistência de transferência de carga e Z_w a impedância de Warburg. Na obtenção da curva analítica foram utilizados os valores de R_{tc} e a curva analítica foi obtida através da relação $\Delta R_{tc} = R_{tc\text{-cortisol}}$ (das concentrações de cortisol) $- R_{tc\text{-anticorpo}}$ (do anticorpo). A Figura 5.28 apresenta a curva analítica obtida entre $1,0 \times 10^{-12}$ e $1,0 \times 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$ ($3,1 \times 10^{-15}$ e $2,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) de cortisol.

Figura 5.28 – Curva analítica obtida com o imunossensor Pt/Au/SAM/Anti-cortisol.

Fonte: Autoria própria.

Os valores de resistência de transferência de carga produziram uma relação linear de acordo com o aumento concentração de cortisol na superfície do dispositivo. A curva analítica (Figura 5.28) foi linear no intervalo de concentração de cortisol entre $1,0 \times 10^{-12}$ e $1,0 \times 10^{-8}$ mg L^{-1} representada pela equação ($\Delta R_{tc} = 0,702 \pm 0,04 + 0,052 \pm 0,004 C_{\text{cortisol}} (\text{mg L}^{-1})$) com um coeficiente de correlação linear (r) de 0,997. O limite de detecção obtido foi de $3,8 \times 10^{-12}$ mg mL^{-1} ($1,0 \times 10^{-14}$ mol L^{-1}). Este imunossensor eletroquímico para detecção de cortisol destaca-se pelo excelente desempenho analítico (baixo limite de detecção), por ser uma arquitetura livre de marcadores e a detecção do antígeno foi realizada de maneira direta. As vantagens dessa arquitetura com relação as plataformas comumente utilizadas na literatura são: i) fácil preparação; ii) menor tempo de preparação; iii) baixo consumo de reagentes; iv) especificidade proporcionada pela interação antígeno-anticorpo; v) detecção direta do cortisol dispensando anticorpos secundários marcados com enzimas oxidases (peroxidases, glicose oxidase, tirosinase, etc).

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados evidenciaram a viabilidade da técnica fotolitografia como template na síntese de nanoestruturas de ouro para obtenção de superfícies híbridas bifuncionais nanoestruturadas Pt/Au contendo 20, 50 e 100 nm de ouro. As imagens de AFM, MEV e microscopia ótica mostraram que o template orientou regularmente a formação das nanoestruturas de ouro sobre a platina. Monocamadas auto-organizadas foram formadas sobre as superfícies bimetalicas e um procedimento inédito para dessorção seletiva das SAM's somente sobre a superfície da platina (permanecendo sobre o ouro) foi proposto. As superfícies híbridas bifuncionais nanoestruturas Pt/Au-SAM-GOx com mediador de elétrons ferroceno foram avaliadas com relação a determinação de glicose em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, obtendo-se linearidade na faixa de concentração entre 1,25-14,7 µmol L⁻¹. A constante cinética aparente de Michaelis-Menten obtida foi de 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ e a constante catalítica foi 28.349 s⁻¹. Esta superfície híbrida foi avaliada com relação à detecção eletroquímica de diferentes concentrações de biomarcadores ácido úrico, ácido ascórbico, dopamina, hidroquinona e nitrito. As superfícies híbridas nanoestruturas Pt/Au/SAM/Anti-cortisol foram avaliadas com relação a detecção de cortisol adsorvido na superfície em uma solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ contendo 5.0 mmol L⁻¹ das sondas redox ferrocianeto e ferricianeto de potássio.

7 PERSPECTIVAS

Desenvolver e caracterizar dispositivos flexíveis, compostos por nanoestruturas de ouro obtidas via fotolitografia sobre a superfície de platina. Estas superfícies flexíveis nanoestruturadas podem ser avaliadas quanto à atividade eletrocatalítica do dispositivo flexível nanoestruturado em relação à detecção de biomarcadores, assim como, ácido úrico, ácido ascórbico, dopamina e NADH. Além disso, os dispositivos flexíveis podem ser utilizados como biossensores enzimáticos para a detecção de lactato e/ou colesterol em transpiração aplicando-se diretamente sobre a pele (sensores vestíveis “wearable”) durante a realização de atividade física, assim dispensando os métodos invasivos, enquanto que detecção de glicose e cortisol pode ser realizada feita em saliva, dispensando métodos invasivos.

8 REFERÊNCIAS

- ¹ ISLAM, N.; MIYAZAKI, K. Nanotechnology innovation system: Understanding hidden dynamics of nanoscience fusion trajectories. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 76, n. 1, p. 128-140, 2009.
- ² DAY, P. Room at the bottom. **Chemistry in Britain**, v. 32, n. 7, p. 29-31, 1996.
- ³ BLOMQUIST, M.; LINDFORS, T.; VAHASALO, L.; PIVRIKAS, A.; IVASKA, A. Electropolymerization and characterization of poly(N-methylaniline) and poly(N-butylaniline) in mixtures of aqueous and organic solvents. **Synthetic Metals**, v. 156, n. 7-8, p. 549-557, 2006.
- ⁴ HURRELL, H. C.; ABRUNA, H. D. Redox conduction in electropolymerized films of transition-metal complexes of Os, Ru, Fe, and Co. **Inorganic Chemistry**, v. 29, n. 4, p. 736-741, 1990.
- ⁵ RANDRIAMAHAZAKA, H.; NOEL, V.; GUILLEREZ, S.; CHEVROT, C. Interpenetrating organic conducting polymer composites based on polyaniline and poly(3,4-ethylenedioxythiophene) from sequential electropolymerization. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 585, n. 2, p. 157-166, 2005.
- ⁶ TREVIN, S.; BEDIOUI, F.; VILLEGAS, M. G. G.; BIEDCHARRETON, C. Electropolymerized nickel macrocyclic complex-based films: Design and electrocatalytic application. **Journal of Materials Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 923-928, 1997.
- ⁷ ZARBIN, A. J. G. (Nano) materials chemistry. **Quimica Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469-1479, 2007.
- ⁸ OWENS, F. J. Ferromagnetic resonance of magnetic field oriented Fe₃O₄ nanoparticles in frozen ferrofluids. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 64, n. 11, p. 2289-2292, 2003.
- ⁹ ALIVISATOS, A. P.; HARRIS, A. L.; LEVINOS, N. J.; STEIGERWALD, M. L.; BRUS, L. E. Electronic states of semiconductor clusters - homogeneous and inhomogeneous broadening of the Optical-Spectrum. **Journal of Chemical Physics**, v. 89, n. 7, p. 4001-4011, 1988.
- ¹⁰ BRUS, L. Electronic wave-functions in semiconductor clusters - experiment and theory. **Journal of Physical Chemistry**, v. 90, n. 12, p. 2555-2560, 1986.
- ¹¹ BRUST, M.; KIELY, C. J. Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 202, n. 2-3, p. 175-186, 2002.

- ¹² WANG, Y.; HERRON, N. Chemical effects on the optical-properties of semiconductor particles. **Journal of Physical Chemistry**, v. 91, n. 19, p. 5005-5008, 1987.
- ¹³ ZANCHET, D.; HALL, B. D.; UGARTE, D. Structure population in thiol-passivated gold nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 47, p. 11013-11018, 2000.
- ¹⁴ ZANCHET, D.; MORENO, M. S.; UGARTE, D. Anomalous packing in thin nanoparticle supercrystals. **Physical Review Letters**, v. 82, n. 26, p. 5277-5280, 1999.
- ¹⁵ ZANCHET, D.; TOLENTINO, H.; ALVES, M. C. M.; ALVES, O. L.; UGARTE, D. Inter-atomic distance contraction in thiol-passivated gold nanoparticles. **Chemical Physics Letters**, v. 323, n. 1-2, p. 167-172, 2000.
- ¹⁶ COUTO, G. G.; KLEIN, J. J.; SCHREINER, W. H.; MOSCA, D. H.; DE OLIVEIRA, A. J. A.; ZARBIN, A. J. G. Nickel nanoparticles obtained by a modified polyol process: Synthesis, characterization, and magnetic properties. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 311, n. 2, p. 461-468, 2007.
- ¹⁷ BRUST, M.; WALKER, M.; BETHELL, D.; SCHIFFRIN, D. J.; WHYMAN, R. Synthesis of thiol-derivatized gold nanoparticles in a 2-phase liquid-liquid system. **Journal of the Chemical Society-Chemical Communications**, n. 7, p. 801-802, 1994.
- ¹⁸ HOU, Y.; KONDOH, H.; OHTA, T.; GAO, S. Size-controlled synthesis of nickel nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 241, n. 1-2, p. 218-222, 2005.
- ¹⁹ OLIVEIRA, M. M.; UGARTE, D.; ZANCHET, D.; ZARBIN, A. J. G. Influence of synthetic parameters on the size, structure, and stability of dodecanethiol-stabilized silver nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 292, n. 2, p. 429-435, 2005.
- ²⁰ TARTAJ, P.; MORALES, M. D.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; GONZALEZ-CARRENO, T.; SERNA, C. J. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D-Applied Physics**, v. 36, n. 13, p. R182-R197, 2003.
- ²¹ WU, S. H.; CHEN, D. H. Synthesis and characterization of nickel nanoparticles by hydrazine reduction in ethylene glycol. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 259, n. 2, p. 282-286, 2003.
- ²² BARON, R.; CAMPBELL, F. W.; STREETER, I.; XIAO, L.; COMPTON, R. G. Facile method for the construction of random nanoparticle arrays on a carbon support for the development of well-defined catalytic surfaces. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 3, n. 5, p. 556-565, 2008.

- ²³ BATCHELOR-MCAULEY, C.; WILDGOOSE, G. G. The influence of substrate effects when investigating new nanoparticle modified electrodes exemplified by the electroanalytical determination of aspirin on NiO nanoparticles supported on graphite. **Electrochemistry Communications**, v. 10, n. 8, p. 1129-1131, 2008.
- ²⁴ MASHHADIZADEH, M. H.; ESKANDARI, K.; FOROUMADI, A.; SHAFIEE, A. Copper(II) modified carbon paste electrodes based on self-assembled mercapto compounds-gold-nanoparticle. **Talanta**, v. 76, n. 3, p. 497-502, 2008.
- ²⁵ WANG, S. F.; XU, Q.; LIU, G. D. Differential pulse voltammetric determination of uric acid on carbon-coated iron nanoparticle modified glassy carbon electrodes. **Electroanalysis**, v. 20, n. 10, p. 1116-1120, 2008.
- ²⁶ BATCHELOR-MCAULEY, C.; WILDGOOSE, G. G.; COMPTON, R. G.; SHAO, L. D.; GREEN, M. L. H. Copper oxide nanoparticle impurities are responsible for the electroanalytical detection of glucose seen using multiwalled carbon nanotubes. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 132, n. 1, p. 356-360, 2008.
- ²⁷ COMPTON, R. G.; WILDGOOSE, G. G.; REES, N. V.; STREETER, I.; BARON, R. Design, fabrication, characterisation and application of nanoelectrode arrays. **Chemical Physics Letters**, v. 459, n. 1-6, p. 1-17, 2008.
- ²⁸ XIAO, L.; WILDGOOSE, G. G.; COMPTON, R. G. Sensitive electrochemical detection of arsenic (III) using gold nanoparticle modified carbon nanotubes via anodic stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 620, n. 1-2, p. 44-49, 2008.
- ²⁹ EL-YAZBI, F. A.; HAMMUD, H. H.; SONJI, N. M.; SONJI, G. M. Spectra and polarographic determination of eprosartan. Kinetic studies of the oxidation of eprosartan using a platinum electrode. **Pharmazie**, v. 63, n. 6, p. 420-427, 2008.
- ³⁰ LI, S.; WANG, Y. Y.; ZHAO, Z. X.; QIN, X.; WANG, X. S.; WANG, H. C.; YU, M.; MIAO, Z. Y.; WU, B. Y.; CHEN, Q. Amperometric ethanol biosensor based on layer-by-layer deposition of alcohol oxidase on the platinum electrode. **Sensor Letters**, v. 6, n. 2, p. 347-351, 2008.
- ³¹ LU, X. X.; BAI, H. P.; RUAN, Q.; YANG, M. H.; YANG, G. M.; TAN, L.; YANG, Y. H. Direct determination of pesticides in vegetable samples using gold nanoelectrode ensembles. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 88, n. 11, p. 813-824, 2008.
- ³² LUCZAK, T. Electrocatalytic application of an overoxidized dopamine film prepared on a gold electrode surface to selective epinephrine sensing. **Electroanalysis**, v. 20, n. 12, p. 1317-1322, 2008.

- ³³ NOROUZI, P.; GANJALI, M. R.; MEIBODI, A. S. E. A novel adsorptive square wave voltammetric method for pico molar monitoring of lorazepam at gold ultra microelectrode in a flow injection system by application of fast Fourier transform analysis. **Analytical Letters**, v. 41, n. 7, p. 1208-1224, 2008.
- ³⁴ CHENG, X.; ZHANG, S.; ZHANG, H. Y.; WANG, Q. J.; HE, P. G.; FANG, Y. Z. Determination of carbohydrates by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a nano-nickel oxide modified carbon paste electrode. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 830-835, 2008.
- ³⁵ HAJJIZADEH, M.; JABBARI, A.; HELI, H.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; HAGHGOO, S. Electrocatalytic oxidation of some anti-inflammatory drugs on a nickel hydroxide-modified nickel electrode. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 4, p. 1766-1774, 2007.
- ³⁶ SUE, J. W.; HUNG, C. J.; CHEN, W. C.; ZEN, J. M. Amperometric determination of sugars at activated barrel plating nickel electrodes. **Electroanalysis**, v. 20, n. 15, p. 1647-1654, 2008.
- ³⁷ MANEA, F.; RADOVAN, C.; POP, A.; BURTICA, G.; VLAICU, I.; MORARIU, M.; SCHOONMAN, J. Simultaneous voltammetric detection of organics from wastewater on a copper oxide-copper electrode. **Environmental Engineering and Management Journal**, v. 6, n. 5, p. 413-417, 2007.
- ³⁸ PIECH, R.; KUBIAK, W. W. Determination of trace selenium on hanging copper amalgam drop electrode. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 2, p. 584-589, 2007.
- ³⁹ DICKEY, F. H. The preparation of specific adsorbents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 35, n. 5, p. 227-229, 1949.
- ⁴⁰ MAIA, D. J.; DE PAOLI, M. A.; ALVES, O. L.; ZARBIN, A. J. G.; DAS NEVES, S. Conductive polymer synthesis in solid host matrices. **Quimica Nova**, v. 23, n. 2, p. 204-215, 2000.
- ⁴¹ BRUMLIK, C. J.; MARTIN, C. R. Template synthesis of metal microtubules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, n. 8, p. 3174-3175, 1991.
- ⁴² LAKSHMI, B. B.; DORHOUT, P. K.; MARTIN, C. R. Sol-gel template synthesis of semiconductor nanostructures. **Chemistry of Materials**, v. 9, n. 3, p. 857-862, 1997.
- ⁴³ PARTHASARATHY, R. V.; PHANI, K. L. N.; MARTIN, C. L. R. Template synthesis of graphitic nanotubules. **Advanced Materials**, v. 7, n. 11, p. 896-897, 1995.

⁴⁴ POSSIN, G. E. A method for forming very small diameter wires. **Review of Scientific Instruments**, v. 41, n. 5, p. 772-774, 1970.

⁴⁵ MARTIN, C. R. Template synthesis of electronically conductive polymer Nanostructures. **Accounts of Chemical Research**, v. 28, n. 2, p. 61-68, 1995.

⁴⁶ ORELLANA, M.; BALLESTEROS, L.; DEL RIO, R.; GREZ, P.; SCHREBLER, R.; CORDOVA, R. Electrosynthesis, characterization and electrocatalytic properties of Prussian Blue (PB) nanoparticles disposed on a template. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 13, n. 8, p. 1303-1308, 2009.

⁴⁷ QIU, J. D.; PENG, H. Z.; LIANG, R. P.; XIONG, M. Preparation of three-dimensional ordered macroporous Prussian blue film electrode for glucose biosensor application. **Electroanalysis**, v. 19, n. 11, p. 1201-1206, 2007.

⁴⁸ MIJATOVIC, D.; EIJKEL, J. C. T.; VAN DEN BERG, A. Technologies for nanofluidic systems: top-down vs. bottom-up - a review. **Lab on a Chip**, v. 5, n. 5, p. 492-500, 2005.

⁴⁹ MIN, M.; KIM, C.; YANG, Y. I.; YI, J.; LEE, H. Top-down shaping of metal nanoparticles in solution: partially etched Au@Pt nanoparticles with unique morphology. **Chemical Communications**, v. 47, n. 28, p. 8079-8081, 2011.

⁵⁰ ARIGA, K.; HILL, J. P.; JI, Q. M. Layer-by-layer assembly as a versatile bottom-up nanofabrication technique for exploratory research and realistic application. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 9, n. 19, p. 2319-2340, 2007.

⁵¹ DUFFY, D. C.; MCDONALD, J. C.; SCHUELLER, O. J. A.; WHITESIDES, G. M. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 23, p. 4974-4984, 1998.

⁵² LOCKHART, D. J.; DONG, H. L.; BYRNE, M. C.; FOLLETTIE, M. T.; GALLO, M. V.; CHEE, M. S.; MITTMANN, M.; WANG, C. W.; KOBAYASHI, M.; HORTON, H.; BROWN, E. L. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. **Nature Biotechnology**, v. 14, n. 13, p. 1675-1680, 1996.

⁵³ MARTIN, J. I.; NOGUES, J.; LIU, K.; VICENT, J. L.; SCHULLER, I. K. Ordered magnetic nanostructures: fabrication and properties. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 256, n. 1-3, p. 449-501, 2003.

⁵⁴ HAMED, M.; TVINSTEDT, K.; KARLSSON, R. H.; ASBERG, P.; INGANAS, O. Bridging dimensions in organic electronics: Assembly of electroactive polymer nanodevices from fluids. **Nano Letters**, v. 9, n. 2, p. 631-635, 2009.

- ⁵⁵ CHEN, Y.; WANG, X. H.; HONG, M.; ERRAMILI, S.; MOHANTY, P. Surface-modified silicon nano-channel for urea sensing. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 133, n. 2, p. 593-598, 2008.
- ⁵⁶ TOKONAMI, S.; YAMAMOTO, Y.; SHIIGI, H.; NAGAOKA, T. Synthesis and bioanalytical applications of specific-shaped metallic nanostructures: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 716, p. 76-91, 2012.
- ⁵⁷ PEREZ-LOPEZ, B.; MERKOCI, A. Nanomaterials based biosensors for food analysis applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 11, p. 625-639, 2011.
- ⁵⁸ UPADHYAY, S.; RAO, G. R.; SHARMA, M. K.; BHATTACHARYA, B. K.; RAO, V. K.; VIJAYARAGHAVAN, R. Immobilization of acetylcholinesterase-choline oxidase on a gold-platinum bimetallic nanoparticles modified glassy carbon electrode for the sensitive detection of organophosphate pesticides, carbamates and nerve agents. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 25, n. 4, p. 832-838, 2009.
- ⁵⁹ CAMPBELL, F. W.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 1, p. 241-259, 2010.
- ⁶⁰ CHEN, K. J.; LEE, C. F.; RICK, J.; WANG, S. H.; LIU, C. C.; HWANG, B. J. Fabrication and application of amperometric glucose biosensor based on a novel PtPd bimetallic nanoparticle decorated multi-walled carbon nanotube catalyst. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 33, n. 1, p. 75-81, 2012.
- ⁶¹ REN, X. L.; MENG, X. M.; TANG, F. Q. Preparation of Ag-Au nanoparticle and its application to glucose biosensor. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 110, n. 2, p. 358-363, 2005.
- ⁶² PUMERA, M.; SANCHEZ, S.; ICHINOSE, I.; TANG, J. Electrochemical nanobiosensors. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 123, n. 2, p. 1195-1205, 2007.
- ⁶³ WANG, J. Nanomaterial-based electrochemical biosensors. **Analyst**, v. 130, n. 4, p. 421-426, 2005.
- ⁶⁴ DU, D.; CHEN, S.; CAI, J.; ZHANG, A. Immobilization of acetylcholinesterase on gold nanoparticles embedded in sol-gel film for amperometric detection of organophosphorous insecticide. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 23, n. 1, p. 130-134, 2007.
- ⁶⁵ MANSO, J.; MENA, M. L.; YANEZ-SEDENO, P.; PINGARRON, J. M. Bienzyme amperometric biosensor using gold nanoparticle-modified electrodes for the determination of inulin in foods. **Analytical Biochemistry**, v. 375, n. 2, p. 345-353, 2008.

- ⁶⁶ WU, B. Y.; HOU, S. H.; YIN, F.; ZHAO, Z. X.; WANG, Y. Y.; WANG, X. S.; CHEN, Q. Amperometric glucose biosensor based on multilayer films via layer-by-layer self-assembly of multi-wall carbon nanotubes, gold nanoparticles and glucose oxidase on the Pt electrode. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 22, n. 12, p. 2854-2860, 2007.
- ⁶⁷ EVANS, S. A. G.; ELLIOTT, J. M.; ANDREWS, L. M.; BARTLETT, P. N.; DOYLE, P. J.; DENUAULT, G. Detection of hydrogen peroxide at mesoporous platinum microelectrodes. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 6, p. 1322-1326, 2002.
- ⁶⁸ HRAPOVIC, S.; LIU, Y. L.; MALE, K. B.; LUONG, J. H. T. Electrochemical biosensing platforms using platinum nanoparticles and carbon nanotubes. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 4, p. 1083-1088, 2004.
- ⁶⁹ KANG, X. H.; MAI, Z. B.; ZOU, X. Y.; CAI, P. X.; MO, J. Y. A novel glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in chitosan on a glassy carbon electrode modified with gold-platinum alloy nanoparticles/multiwall carbon nanotubes. **Analytical Biochemistry**, v. 369, n. 1, p. 71-79, 2007.
- ⁷⁰ LANG, H. G.; MALDONADO, S.; STEVENSON, K. J.; CHANDLER, B. D. Synthesis and characterization of dendrimer templated supported bimetallic Pt-Au nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 40, p. 12949-12956, 2004.
- ⁷¹ ZOU, Y. J.; XIANG, C. L.; SUN, L. X.; XU, F. Glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles onto carbon nanotubes and immobilizing enzyme with chitosan-SiO₂ sol-gel. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 23, n. 7, p. 1010-1016, 2008.
- ⁷² LIM, C. S.; CHUA, C. K.; PUMERA, M. Detection of biomarkers with graphene nanoplatelets and nanoribbons. **Analyst**, v. 139, n. 5, p. 1072-1080, 2014.
- ⁷³ AMORIM, L. C. A. Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 2, p. 13, 2003.
- ⁷⁴ TURNER, A. Biosensors: then and now. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 119-120, 2013.
- ⁷⁵ RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747-1763, 2010.
- ⁷⁶ BANDODKAR, A. J.; WANG, J. Non-invasive wearable electrochemical sensors: a review. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 7, p. 363-371, 2014.
- ⁷⁷ BANDODKAR, A. J.; JIA, W. Z.; WANG, J. Tattoo-based wearable electrochemical devices: A review. **Electroanalysis**, v. 27, n. 3, p. 562-572, 2015.

⁷⁸ WANG, J. Electrochemical glucose biosensors. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 2, p. 814-825, 2008.

⁷⁹ WINDMILLER, J. R.; WANG, J. Wearable electrochemical sensors and biosensors: A review. **Electroanalysis**, v. 25, n. 1, p. 29-46, 2013.

⁸⁰ CHIARUGI, F.; KARATZANIS, I.; ZACHARIOUDAKIS, G.; MERIGGI, P.; RIZZO, F.; STRATAKIS, M.; LOULOUDAKIS, S.; BINIARIS, C.; VALENTINI, M.; DI RIENZO, M.; PARATI, G. Measurement of heart rate and respiratory rate using a textile-based wearable device in heart failure patients. **Computers in Cardiology 2008, Vols 1 and 2**, p. 901-904, 2008.

⁸¹ MERRITT, C. R.; NAGLE, H. T.; GRANT, E. Textile-based capacitive sensors for respiration monitoring. **Ieee Sensors Journal**, v. 9, n. 1-2, p. 71-78, 2009.

⁸² JUNG, S.; JI, T.; VARADAN, V. K. Point-of-care temperature and respiration monitoring sensors for smart fabric applications. **Smart Materials & Structures**, v. 15, n. 6, p. 1872-1876, 2006.

⁸³ MATTMANN, C.; CLEMENS, F.; TROSTER, G. Sensor for measuring strain in textile. **Sensors**, v. 8, n. 6, p. 3719-3732, 2008.

⁸⁴ LORUSSI, F.; ROCCHIA, W.; SCILINGO, E. P.; TOGNETTI, A.; DE ROSSI, D. Wearable, redundant fabric-based sensor arrays for reconstruction of body segment posture. **Ieee Sensors Journal**, v. 4, n. 6, p. 807-818, 2004.

⁸⁵ LORUSSI, F.; SCILINGO, E. P.; TESCONI, M.; TOGNETTI, A.; DE ROSSI, D. Strain sensing fabric for hand posture and gesture monitoring. **IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine**, v. 9, n. 3, p. 372-381, 2005.

⁸⁶ SRINIVAS, P. R.; KRAMER, B. S.; SRIVASTAVA, S. Trends in biomarker research for cancer detection. **Lancet Oncology**, v. 2, n. 11, p. 698-704, 2001.

⁸⁷ ETZIONI, R.; URBAN, N.; RAMSEY, S.; MCINTOSH, M.; SCHWARTZ, S.; REID, B.; RADICH, J.; ANDERSON, G.; HARTWELL, L. The case for early detection. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 4, p. 243-252, 2003.

⁸⁸ BOHUNICKY, B.; MOUSA, S. A. Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. **Nanotechnology Science Applied**, v. 4, p. 1-10, 2010.

⁸⁹ HUANG, H. M.; LIU, C. H.; LEE, V.; LEE, C.; WANG, M. J. Highly sensitive glucose biosensor based on CF₄-plasma-modified interdigital transducer array (IDA) microelectrode. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 149, n. 1, p. 59-66, 2010.

⁹⁰ COELHO, D.; MACHADO, S. A. S. New contribution in the study of phase formation in mixed alkanethiol self-assembled monolayers: a powerful tool for transducers design. **Electrochimica Acta**, v. 142, p. 191-201, 2014.

⁹¹ MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Biosensors based on the enzymatic inhibition process. **Quimica Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.

⁹² DA SILVA, O. B.; MACHADO, S. A. S. Evaluation of the detection and quantification limits in electroanalysis using two popular methods: application in the case study of paraquat determination. **Analytical Methods**, v. 4, n. 8, p. 2348-2354, 2012.

⁹³ VICENTINI, F. C.; RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.; JANEGITZ, B. C.; MACHADO, S. A. S.; FATIBELLO, O. Nanostructured carbon black for simultaneous sensing in biological fluids. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 227, p. 610-618, 2016.

⁹⁴ SOROKINA, K. L.; TOLSTIKHINA, A. L. Atomic force microscopy modified for studying electric properties of thin films and crystals. Review. **Crystallography Reports**, v. 49, n. 3, p. 476-499, 2004.

⁹⁵ ANGERSTEIN-KOZLOWSKA, H.; CONWAY, B. E.; SHARP, W. B. A. Real condition of electrochemically oxidized platinum surfaces: Part 1. Resolution of component processes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 9-36, 1973.

⁹⁶ SANTOS, V. P.; TREMILIOSI, G. The correlation between the atomic surface structure and the reversible adsorption-desorption of hydrogen on single crystal Pt (111), Pt (100) and Pt (110) electrodes. **Quimica Nova**, v. 24, n. 6, p. 856-863, 2001.

⁹⁷ ANGERSTEIN-KOZLOWSKA, H.; CONWAY, B. E.; HAMELIN, A.; STOICOVICIU, L. Elementary steps of electrochemical oxidation of single-crystal planes of Au: Part 1. Chemical basis of processes involving geometry of anions and the electrode surfaces. **Electrochimica Acta**, v. 31, n. 8, p. 1051-1061, 1986.

⁹⁸ BRUCKENSTEIN, S.; SHAY, M. An insitu weighing study of the mechanism for the formation of the adsorbed oxygen monolayer at a gold electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 188, n. 1-2, p. 131-136, 1985.

⁹⁹ SABATANI, E.; RUBINSTEIN, I.; MAOZ, R.; SAGIV, J. Organized self-assembling monolayers on electrodes: Part 1. Octadecyl derivatives on gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 219, n. 1-2, p. 365-371, 1987.

¹⁰⁰ KUNG, C. C.; LIN, P. Y.; BUSE, F. J.; XUE, Y. H.; YU, X.; DAI, L. M.; LIU, C. C. Preparation and characterization of three dimensional graphene foam supported platinum-ruthenium bimetallic nanocatalysts for hydrogen peroxide based electrochemical biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 52, p. 1-7, 2014.

- ¹⁰¹ SAĞLAM, O.; KIZILKAYA, B.; UYSAL, H.; DILGIN, Y. Biosensing of glucose in flow injection analysis system based on glucose oxidase-quantum dot modified pencil graphite electrode. **Talanta**, v. 147, p. 315-321, 2016.
- ¹⁰² YILMAZ, O.; DEMIRKOL, D. O.; GULCEMAL, S.; KILINC, A.; TIMUR, S.; CETINKAYA, B. Chitosan-ferrocene film as a platform for flow injection analysis applications of glucose oxidase and *Gluconobacter oxydans* biosensors. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 100, p. 62-68, 2012.
- ¹⁰³ GHICA, M. E.; BRETT, C. M. A. Development of a carbon film electrode ferrocene-mediated glucose biosensor. **Analytical Letters**, v. 38, n. 6, p. 907-920, 2005.
- ¹⁰⁴ DERVISEVIC, M.; CEVIK, E.; SENEL, M. Development of glucose biosensor based on reconstitution of glucose oxidase onto polymeric redox mediator coated pencil graphite electrodes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 68, p. 69-76, 2015.
- ¹⁰⁵ ZHANG, Y. F.; GUO, G. P.; ZHAO, F. Q.; MO, Z. R.; XIAO, F.; ZENG, B. Z. A novel glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized on AuPt nanoparticle - carbon nanotube - ionic liquid hybrid coated electrode. **Electroanalysis**, v. 22, n. 2, p. 223-228, 2010.
- ¹⁰⁶ LUO, L. Q.; LI, Q. X.; XU, Y. H.; DING, Y. P.; WANG, X.; DENG, D. M.; XU, Y. J. Amperometric glucose biosensor based on NiFe_2O_4 nanoparticles and chitosan. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 145, n. 1, p. 293-298, 2010.
- ¹⁰⁷ ZHENG, L. Z.; LI, J. H.; XU, J. P.; XIONG, L. Y.; ZHENG, D.; LIU, Q.; LIU, W.; LI, Y. D.; YANG, S. M.; XIA, J. Improvement of amperometric glucose biosensor by the immobilization of FcCD inclusive complex and carbon nanotube. **Analyst**, v. 135, n. 6, p. 1339-1344, 2010.
- ¹⁰⁸ LIU, X. Y.; ZENG, X. D.; MAI, N. N.; LIU, Y.; KONG, B.; LI, Y. H.; WEI, W. Z.; LUO, S. L. Amperometric glucose biosensor with remarkable acid stability based on glucose oxidase entrapped in colloidal gold-modified carbon ionic liquid electrode. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 25, n. 12, p. 2675-2679, 2010.
- ¹⁰⁹ WANG, W. Q.; YING, S. H.; ZHANG, Z. H.; HUANG, S. S. Novel glucose biosensor based on a glassy carbon electrode modified with hollow gold nanoparticles and glucose oxidase. **Microchimica Acta**, v. 173, n. 1-2, p. 143-148, 2011.
- ¹¹⁰ CRESPILO, F. N.; GHICA, M. E.; FLORESCU, M.; NART, F. C.; OLIVEIRA, O. N.; BRETT, C. M. A. A strategy for enzyme immobilization on layer-by-layer dendrimer-gold nanoparticle electrocatalytic membrane incorporating redox mediator. **Electrochemistry Communications**, v. 8, n. 10, p. 1665-1670, 2006.

- ¹¹¹ NGEONTAE, W.; JANRUNGROATSAKUL, W.; MANEEWATTANAPINYO, P.; EKGASIT, S.; AEUNGMAITREPIROM, W.; TUNTULANI, T. Novel potentiometric approach in glucose biosensor using silver nanoparticles as redox marker. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 137, n. 1, p. 320-326, 2009.
- ¹¹² JOHNSON, K. A.; GOODY, R. S. The original michaelis constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. **Biochemistry**, v. 50, n. 39, p. 8264-8269, 2011.
- ¹¹³ KAMIN, R. A.; WILSON, G. S. Rotating-ring-disk enzyme electrode for biocatalysis kinetic studies and characterization of the immobilized enzyme layer. **Analytical Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 1198-1205, 1980.
- ¹¹⁴ LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, p. 658-666, 1934.
- ¹¹⁵ SHU, F. R.; WILSON, G. S. Rotating-ring-disk enzyme electrode for surface catalysis studies. **Analytical Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 1679-1686, 1976.
- ¹¹⁶ CAO, S. R.; ZHANG, L.; CHAI, Y. Q.; YUAN, R. Electrochemistry of cholesterol biosensor based on a novel Pt-Pd bimetallic nanoparticle decorated graphene catalyst. **Talanta**, v. 109, p. 167-172, 2013.
- ¹¹⁷ BRIGGS, G. E.; HALDANE, J. B. S. A note on the kinetics of enzyme action. **Biochemical Journal**, v. 19, n. 2, p. 338-339, 1925.
- ¹¹⁸ BRIGHT, H. J.; GIBSON, Q. H. Oxidation of 1-Deuterated glucose by glucose oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 242, n. 5, p. 994-1003, 1967.
- ¹¹⁹ GIBSON, Q. H.; MASSEY, V.; SWOBODA, B. E. P. Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 239, n. 11, p. 3927-3934, 1964.