

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

ROSANA MOSSANHA

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS ELETROQUÍMICOS DE
ELETRODOS MODIFICADOS COM DIFERENTES MONOCAMADAS AUTO-
ORGANIZADAS**

PONTA GROSSA
2011

ROSANA MOSSANHA

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS ELETROQUÍMICOS DE
ELETRODOS MODIFICADOS COM DIFERENTES MONOCAMADAS AUTO-
ORGANIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Química Aplicada da
UEPG como requisito para a obtenção do
título de Mestre em Química Aplicada.

Orientadora: Christiana Andrade Pessoa

PONTA GROSSA
2011

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor Tratamento da Informação BICEN/UEPG

M913p Mossanha, Rosana
Preparação, caracterização e estudos eletroquímicos de eletrodos modificados com diferentes monocamadas auto-organizadas / Rosana Mossanha. Ponta Grossa, 2011.
159f.
Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa .
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Christiana Andrade Pessoa

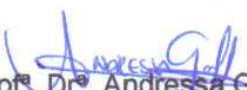
1. Monocamadas auto-organizadas. 2. Eletrodo de ouro. 3. Tióis.
4. Dopamina. I. Pessoa, Christiana Andrade. II. T.

CDD: 631.41

TERMO DE APROVAÇÃO**ROSANA MOSSANHA****"PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS
ELETROQUÍMICOS DE ELETRODOS MODIFICADOS COM
DIFERENTES MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS."**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientadora:


Prof.^a Dr.^a Christiana Andrade Pessoa
UEPG/PR
Prof. Dr. Paulo Rogério Pinto Rodrigues
UNICENTRO/PR
Prof.^a Dr.^a Andressa Galli
PNPD/CAPES/UEPG/PR**Ponta Grossa, 03 de março de 2011.**

“Não deixe de fazer algo que gosta devido à falta de tempo, a única falta que terá,
será desse tempo que infelizmente não voltará mais.”

Mário Quintana

Dedico aos meus pais, meus irmãos e meu esposo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao bondoso Deus, presença constante em minha vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Christiana Andrade Pessoa pelas oportunidades, orientação, incentivo, confiança e pela amizade durante todo decorrer do trabalho.

Aos professores e colegas do Mestrado em Química Aplicada da UEPG.

Aos professores e membros da banca pela presença e correções sugeridas. A Dra. Andressa Galli pela amizade e contribuição com seus conhecimentos e sugestões.

Aos amigos e colegas que foram ou ainda são do Grupo de Desenvolvimento de Eletrodos Modificados - GDEM: Michele, Paulo, Cliciane, Bianca, Tatiane, Cristiane, Fernanda, Cleverson, Rolf, Ricardo, Dhésmon, Fábio por estarem sempre me ajudando e tirando minhas dúvidas no laboratório e pela amizade.

A todos os meus familiares, pela confiança e motivação, em especial minha mãe que sempre me apoiou em todas as minhas decisões.

Ao meu querido esposo, pelo amor, compreensão, paciência e carinho durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

RESUMO

Neste trabalho foram investigados diferentes tipos de modificadores para a formação de monocamadas auto-organizadas sobre a superfície do ouro. As monocamadas utilizadas foram formadas por diferentes arranjos estruturais, tamanho da cadeia carbônica e grupos funcionais. Os tióis utilizados foram: ácido 3-mercaptopropiônico (MPA), ácido tioláctico (TLA), cistamina (CYS) e o ácido 11-mercaptopundecanóico. A eletroatividade dos filmes dos diferentes tióis foi avaliada pela molécula sonda, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Foi possível constatar através da técnica de voltametria cíclica, a formação e a organização dos filmes, monitorando o comportamento do par redox. Os voltamogramas mostraram um decréscimo nas respostas da corrente faradaica com o aumento do tempo de imersão do substrato ouro na solução etanólica dos tióis, sugerindo que o processo de transferência de elétrons ocorre através dos *pinholes* da superfície e por tunelamento. Os eletrodos com as monocamadas de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) e o ácido tioláctico (TLA) obtiveram melhor recobrimento da superfície no tempo de imersão de 3 horas. Enquanto que o ácido 11-mercaptopropiônico (MUA) e a cistamina (CYS) necessitaram de maior tempo de imersão para organização da monocamada, de 24 horas, devido o MUA ser uma molécula de cadeia longa e a CYS devido a quebra da ligação S-S. O tamanho da cadeia do tiol influenciou no empacotamento da superfície, tióis de cadeia curtas tendem a formar monocamadas com uma quantidade de defeitos considerável, levando a um menor recobrimento na superfície eletródica. O MUA que contém um número elevado de carbonos na cadeia apresentou um maior recobrimento da superfície, o que ocasionou perda da resposta voltamétrica. A rugosidade e a área ativa dos diferentes eletrodos, calculadas a partir dos voltamogramas, diminuíram com a formação das monocamadas sobre a superfície do ouro. Com o objetivo de estimar a quantidade de moléculas imobilizadas sobre a superfície, foram calculados os excessos superficiais (Γ) por meio da carga voltamétrica obtida da dessorção redutiva. Os valores obtidos foram de $\Gamma = 1,88 \times 10^{-10}$ para Au-CYS, $5,03 \times 10^{-10}$ para Au-MPA, $1,06 \times 10^{-8}$ para Au-MUA e $1,35 \times 10^{-10}$ mol.cm⁻² para o Au-TLA, demonstrando uma cobertura quase completa dos sítios ativos da superfície. Pela técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica foi possível determinar os parâmetros cinéticos das SAMs, os quais foram consistentes com os obtidos pelos voltamogramas cíclicos. Analisando o desempenho dos sensores para a determinação de dopamina (DA) através da VC, verificou que a SAM formada pelo TLA foi a que apresentou resultados mais satisfatórios quanto a sensibilidade e seletividade em relação a este analito. Estudos em diferentes velocidades de varredura para os eletrodos Au-MPA, Au-TLA e Au-CYS na presença do analito mostraram que a corrente de pico anódica aumenta linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, indicando que o processo de transferência de elétrons é controlado pela difusão das espécies à superfície do eletrodo. A dopamina foi quantificada pela técnica de VC e VOQ, na faixa linear de $1,1$ a $6,6 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ com limites de detecção de $1,42 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $4,77 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, respectivamente. Utilizando-se a técnica de VOQ, o eletrodo Au-TLA foi capaz de distinguir o ácido ascórbico (AA) e DA quando presentes na mesma solução, com uma diferença de potencial de aproximadamente 340 mV.

Palavras-chave: monocamadas auto-organizadas, eletrodo de ouro, tióis, dopamina.

ABSTRACT

In this work were studied investigated different types of modifiers for the formation of self-assembled monolayers on the gold surface. The monolayers used were formed by different structural arrangements, alkyl chains and functional groups. The thiols groups used were: 3-mercaptopropionic acid (MPA), thiolactic acid (TLA), cystamine (CYS) and 11-mercaptoundecanoic acid. The electroactivity of films of different thiols was assessed by the probe molecule, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. It was possible to observe through the cyclic voltammetry technique, the formation and organization of the films, monitoring the behavior of the redox couple. The voltammograms showed a decrease in the faradaic current response with the increase of immersion time of the gold substrate in ethanolic solution of thiols, suggesting that the process of electron transfer occurs through the pinholes of the electrodes surface and tunneling. The monolayers of 3-mercaptopropionic acid (MPA) and thiolactic acid (TLA) had a better coating of the surface in immersion time of 3 hours. While the 11-mercaptopropionic acid (MUA) and cystamine (CYS) needed more time to organize the monolayer, 24 hours, because the MUA is a long chain molecule and CYS because the cleavage of S-S. The size of thiol chain influenced the surface organization, short-chain thiols tend to form monolayers with a considerable amount of defects, leading to a lower coating on the electrode surface. Indeed, the MUA that contains a high number of carbons in the chain showed a higher surface coverage, which caused loss of voltammetric response. The electrode surface roughness and the active area, calculated by the voltammetric data, showed a decrease with the formation of the monolayers on gold surface. Aiming to estimate the amount of molecules immobilized on the surface, it was calculated the superficial excess (Γ) by voltammetric charge obtained from the reductive desorption. The obtained values were of $\Gamma = 1.88 \times 10^{-10}$ for Au-CYS, 5.03×10^{-10} to Au-MPA, 1.06×10^{-8} for Au-MUA and $1.35 \times 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$ for the Au-TLA, demonstrating an almost complete coverage of active sites on the surface. By the electrochemical impedance spectroscopy technique, it was possible to determine the kinetic parameters of the SAMs, which were consistent with those obtained by cyclic voltammetry. Analyzing the performance of sensors for dopamine determination through the VC, it was found that the SAM formed by TLA presented the most satisfactory results regarding the sensitivity and selectivity compared to the analyte DA. Studies at different scan rates for the electrodes, Au-MPA, Au-TLA and Au-CYS in the presence of the analite showed that the anodic peak current linearly increases with the square root of scan rate, indicating that the electron transfer process is controlled by diffusion of species to the electrode surface. Dopamine was quantified by CV and SWV technique, in the linear range from 1.1 to $6.6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ with detection limits of $1.42 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ and $4.77 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectively. Using the technique of VOQ, TLA-Au electrode was able to distinguish between AA and DA, when present in the same solution, with a potential difference of approximately 340 mV.

Keywords: self-assembled monolayers, gold electrode, thiols, dopamine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas de nucleação dos filmes finos.	5
Figura 2 - Organograma das principais aplicações das monocamadas auto-organizadas adaptado da ref. [4].	9
Figura 3 - Estrutura de uma monocamada auto-organizada sobre o substrato ouro, adaptada da ref. [25].	10
Figura 4 - Voltamogramas cíclicos para o eletrodo ouro base e os eletrodos modificados com diferentes SAMs em $5 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5, velocidade de varredura 100 mV s^{-1} . Varredura anódica [55].	12
Figura 5 - Organização da monocamada de 1,4-dt sobre a superfície com a parte (a) e (b) representando respectivamente, a recém preparada SAM 1,4-dt (15 min de imersão) e aquela obtida após longo tempo de imersão (acima de 6 horas) do substrato ouro em solução 1,4-dt [68].	16
Figura 6 - Voltamogramas cíclicos de $8 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ em solução aquosa de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em 100 mV s^{-1} para o eletrodo de ouro (linha pontilhada) e para o eletrodo de ouro modificado após (a) 30, (b) 60, e (c) 900 min de tempo de imersão em uma solução etanólica de 1,4 -dt [68].	17
Figura 7 - Esquema de alguns dos defeitos intrínsecos e extrínsecos encontrados em SAM formadas em substrato de ouro [60].	20
Figura 8 - Esquema da cinética de formação de SAM. As etapas de formação de uma monocamada: (a) a etapa inicial é caracterizada pela rápida adsorção e crescimento da espessura do filme, seguida por um processo mais lento (b) de adsorção e organização, até a formação final (c) da monocamada auto-organizada [51].	22
Figura 9 - Esquema da microscopia de varredura de tunelamento em toda a superfície de um n-alcanotiolato e a representação da organização hexagonal nas monocamadas de alcanotióis formadas sobre o ouro.	23
Figura 10 - Esquema da formação da monocamada sobre o substrato. Definição do ângulo de inclinação (Θ), ângulo de precisão (χ) e espessura da monocamada (d). S é o átomo de enxofre e X é grupo terminal. Os ângulos são medidos entre o eixo Z e a linha que une enxofre ao grupo terminal [53].	24
Figura 11 - Potenciais eletroquímicos para a estabilidade de tióis adsorvidos sobre o eletrodo de ouro. Adaptado da ref [78].	25
Figura 12 - Esquema das principais propriedades das monocamadas auto-organizadas utilizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. Adaptado da ref. 4.	27

Figura 13 - Elementos e componentes de um típico biossensor [79].	29
Figura 14 - Voltamograma cíclico típico de espécies redox em solução e os principais parâmetros obtidos a partir do mesmo.	40
Figura 15 - Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada, onde ΔE_p – amplitude de pulsos, ΔE_s - incremento de varredura de potenciais, f – frequência, 2τ – período. [108].	43
Figura 16 - Voltamograma de VOQ com seus principais parâmetros obtidos a partir do pico resultante, onde I_p – corrente de pico, E_p – potencial de pico e $\Delta E_p/2$ - largura de meia altura da onda de redução e/ou oxidação.	43
Figura 17 – VOQ de diferentes concentrações de EP 0.1, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0×10^{-6} mol L ⁻¹ , utilizando o eletrodo de Au-SAM-TA. Gráfico inserido: relação linear entre I_p e a concentração de EP.	44
Figura 18 - Diagrama de impedância (diagrama de Nyquist)	46
Figura 19 – Diagrama de Nyquist para 5 mmolL ⁻¹ de Fe(CN) ₆ ³⁻ em solução KCl 0,1 mol L ⁻¹ usando Au-SAM em pH 8,0, freqüência de 0,01 a 10 KHz [130].	48
Figura 20 - Estratégia para a imobilização das células vermelhas sanguíneas sobre os carboxilatos terminais das SAM sobre o ouro. Adição de NHS e carbodiimida EDC solúvel em água na sobre a SAM para a formação do éster NHS [131].	49
Figura 21 - Representação esquemática da imersão do substrato para formação da monocamada.	55
Figura 22 – Moléculas utilizadas no estudo da formação das SAMs.	56
Figura 23 - Voltamogramas cíclicos dos diferentes procedimentos de pré-tratamento sobre superfícies de ouro: M – mecânico, Q – químico, EI – eletroquímico e Et – etanol. Eletrólito suporte: H ₂ SO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ , velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹ . Gráfico inserido: área de formação do óxido de ouro, utilizada para o cálculo da carga do processo de adsorção.	61
Figura 24 – Reprodutibilidade da limpeza superficial.	64
Figura 25 - Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro base em solução tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ com [Fe(CN) ₆] ³⁻ 0,05 mol L ⁻¹ em diferentes valores de pH.	65
Figura 26 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro base em solução PBS 0,1 mol L ⁻¹ com [Fe(CN) ₆] ³⁻ 0,05 mol L ⁻¹ em diferentes velocidades de varredura, em pH = 7,0. Gráficos inseridos: Relação entre I_{pa} vs $v^{1/2}$ e relação I_{pa} vs v .	67
Figura 27 - Representação estrutural e mapas eletrostáticos, regiões de carga relativamente mais negativas em vermelho e carga mais positiva em azul: (A) ácido mercaptopropiônico - MPA, (B) ácido tioláctico - TLA, (C) ácido	

mercaptoundecanóico – MUA, (D) cistamina – CYS. Esquema de cores dos átomos (●) enxofre, (●) carbono, (●) hidrogênio, (●) oxigênio e (●) nitrogênio.70

Figura 28 - Representação esquemática da formação da monocamada de ácido mercaptopropiônico, (●) enxofre, (●) carbono, (●) hidrogênio e (●) oxigênio.73

Figura 29 - Voltamogramas cíclicos do MPA em diferentes tempos de imobilização em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ com [Fe(CN)₆]³⁻ 0,05 mol L⁻¹ em pH 7,0. Velocidade de varredura: 100 mV s⁻¹.73

Figura 30 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo Au-MPA no tempo de imersão 3 horas em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ com [Fe(CN)₆]³⁻ 0,05 mol L⁻¹ em diferentes velocidades de varredura, em pH = 7,0; Gráficos inseridos: Relação entre I_{pa} vs v^{1/2} e relação entre I_{pa} vs v.76

Figura 31 - Representação esquemática da formação da monocamada de ácido tioláctico; (●) enxofre, (●) carbono, (●) hidrogênio e (●) oxigênio.77

Figura 32 - Voltamogramas cíclicos do TLA em diferentes tempos de imobilização em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ com [Fe(CN)₆]³⁻ 0,05 mol L⁻¹ pH=7,0. Velocidade de varredura: 100 mV s⁻¹.78

Figura 33 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo Au-TLA no tempo de imersão 3 horas em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ com [Fe(CN)₆]³⁻ 0,05 mol L⁻¹ em diferentes velocidades de varredura, em pH = 7,0; Gráfico inserido: Relação entre I_{pa} e v^{1/2} e relação entre I_{pa} e v.80

Figura 34 - Representação esquemática da formação da monocamada de ácido 11-mercaptoundecanóico; (●) enxofre, (●) carbono, (●) hidrogênio e (●) oxigênio.81

Figura 35 - Voltamogramas cíclicos do MUA em diferentes tempos de imobilização em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ com [Fe(CN)₆]³⁻ 0,05 mol L⁻¹ em pH 7. Velocidade de varredura: 100 mVs⁻¹. Gráfico inserido: Comparação do perfil do eletrodo sem modificação e com MUA.81

Figura 36 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo Au-MUA no tempo de imersão 24 horas em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ com [Fe(CN)₆]³⁻ 0,05 mol L⁻¹ em diferentes velocidades de varredura, em pH = 7,0.82

Figura 37 - Representação esquemática da quebra da molécula de cistamina entre os átomos de enxofre e a interação com a superfície de ouro, na formação da monocamada, (●) enxofre, (●) carbono, (●) hidrogênio e (●) nitrogênio.83

- Figura 38** - Voltamogramas cíclicos da CYS em diferentes tempos de imobilização em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ com [Fe(CN)₆]³⁻ 0,05 mol L⁻¹ em pH = 7,0. Velocidade de varredura: 100 mV s⁻¹.....84
- Figura 39** - Voltamogramas cíclicos do eletrodo Au-CYS no tempo de imersão 24 horas em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ com [Fe(CN)₆]³⁻ 0,05 mol L⁻¹ em diferentes velocidades de varredura, em pH = 7,0; Gráficos inseridos: Relação entre I_{pa} e v^{1/2}. e relação I_{pa} e v.....86
- Figura 40** - Voltamogramas cíclicos do Au, Au-MPA e Au-TLA tempo de imersão 3 horas, e Au-MUA e Au-CYS tempo de imersão 24 horas, em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ com [Fe(CN)₆]³⁻ 0,05 mol L⁻¹ (pH=7,0). Velocidade de varredura 100 mV s⁻¹.87
- Figura 41** - Voltamogramas cíclicos das diferentes modificadores sobre superfícies de eletrodos de ouro. Eletrólito suporte: H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹, velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹.....90
- Figura 42** - Dessorção redutiva das diferentes monocamadas, realizados em solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹ a 50 mV s⁻¹.....92
- Figura 43** - Correlação entre a corrente de pico anódica e o número de ciclos para os diferentes eletrodos. Eletrólito suporte: tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ com [Fe(CN)₆]³⁻ 0,05 mol L⁻¹, em pH = 7,0, velocidade de varredura: 100 mV s⁻¹.95
- Figura 44** - Diagramas de Nyquist de 0,008 mol L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{3-/4-} em PBS 0,1 mol L⁻¹ para o eletrodo de ouro limpo e modificado com a monocamada, E_{ac} = 10 mV, E_{dc} = 200 mV e faixa de frequência de 10 KHz a 100 mHz.....97
- Figura 45** – Representação esquemática da oxidação da dopamina para dopaminaquinona.....102
- Figura 46** - Voltamogramas cíclicos dos diferentes eletrodos na presença de dopamina 0,1 mmol L⁻¹, em solução PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. Velocidade de varredura: 100 mV s⁻¹.....102
- Figura 47** - Processo de oxidação do ácido ascórbico104
- Figura 48** - Voltamogramas cíclicos dos diferentes eletrodos na presença de ácido ascórbico 0,1 mmol L⁻¹, em solução PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. Velocidade de varredura: 100 mVs⁻¹.....105
- Figura 49** - Voltamogramas cíclicos do eletrodo Au-TLA com adições de AA (branco, 1x10⁻², 9 x10⁻², 8 x10⁻², 7 x10⁻², 6 x10⁻², 5 x10⁻², 4 x10⁻², 3 x10⁻², 2 x10⁻² a 1x10⁻³ mol L⁻¹ de AA) em solução Tampão PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. Velocidade de varredura: 100 mV s⁻¹. Gráfico inserido: Relação entre a I_{pa} em função da concentração de DA.....106

Figura 50 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo Au-TLA em solução tampão BR na presença de dopamina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH. Velocidade de varredura 100 mV s^{-1} 108

Figura 51 – Relação entre E_{pa} vs pH e a I_{pa} vs pH, em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo dopamina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ 109

Figura 52 – Voltamogramas cíclicos do eletrodo Au-TLA na presença de DA em diferentes concentrações ($1,07 \times 10^{-7}$, $1,98 \times 10^{-7}$, $2,94 \times 10^{-7}$, $3,88 \times 10^{-7}$, $4,80 \times 10^{-7}$, $5,7 \times 10^{-7}$, $6,6 \times 10^{-7}$, $7,47 \times 10^{-7}$, $8,33 \times 10^{-7}$, $9,17 \times 10^{-7} \text{ mol. L}^{-1}$) em Tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. Velocidade de varredura 100 mV s^{-1} . Gráfico inserido: Relação entre a I_{pa} em função da concentração de DA.110

Figura 53 – Voltamogramas de onda quadrada do eletrodo Au-TLA em diferentes eletrólitos suporte. ($\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $a = 50 \text{ mV}$ e frequência de 100 Hz , $[DA] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)112

Figura 54 - Variação do incremento da varredura de potencial na presença da DA $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($a = 50 \text{ mV}$, $f = 100 \text{ Hz}$), utilizando-se o eletrodo Au-TLA. Gráfico inserido: dependência da corrente de pico com o incremento da varredura de potencial.113

Figura 55 - Variação da amplitude de pulso de potencial na presença de DA $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, $f = 100 \text{ Hz}$), utilizando-se o eletrodo Au-TLA. Gráfico inserido: Dependência da corrente de pico com a amplitude de pulso de potencial.114

Figura 56 - Variação da frequência de aplicação dos pulsos de potencial na presença da $[DA] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$), utilizando-se o eletrodo Au-TLA. Gráfico inserido: Dependência da corrente de pico com a frequência de aplicação dos pulsos de potencial.115

Figura 57 - Voltamogramas de onda quadrada do eletrodo Au-TLA na presença de $[DA] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, $f = 60 \text{ s}^{-1}$ e pH 7,0 com a separação das componentes de corrente direta, reversa e resultante.....116

Figura 58 – Voltamogramas de onda quadrada do eletrodo Au-TLA na presença de DA em diferentes concentrações ($1,07 \times 10^{-7}$, $1,98 \times 10^{-7}$, $2,94 \times 10^{-7}$, $3,88 \times 10^{-7}$, $4,80 \times 10^{-7}$, $5,7 \times 10^{-7}$, $6,6 \times 10^{-7} \text{ mol. L}^{-1}$). Parâmetros utilizados: $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $f = 60 \text{ Hz}$117

Figura 59 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo Au-TLA em solução Tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0, velocidade de varredura 100 mV s^{-1} , na presença de AA e DA.119

Figura 60 – Voltamogramas de onda quadrada da DA (na faixa de $1,0$ a $2,94 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de AA ($1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ - concentração fixa). Parâmetros utilizados: $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $f = 60 \text{ Hz}$120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de sensores e biossensores de eletrodos de ouro.....	33
Tabela 2 - Principais parâmetros e informações obtidos em aplicações das técnicas VC, VOQ, e EIE para a caracterização de SAM.....	38
Tabela 3 - Procedência e pureza dos reagentes utilizados.....	53
Tabela 4 - Carga, área ativa e fator de rugosidade obtido pela área de adsorção do oxigênio pelos diferentes tratamentos de limpeza de superfície.....	63
Tabela 5 - Valores de I_{pa} e E_{pa} em diferentes valores de pH.....	66
Tabela 6 - Parâmetros eletroanalíticos da MPA na presença da molécula sonda....	74
Tabela 7 - Parâmetros eletroanalíticos do TLA na presença da molécula sonda.....	79
Tabela 8 - Parâmetros eletroanalíticos da CYS na presença da molécula sonda.....	85
Tabela 9 - Parâmetros eletroquímicos das diferentes monocamadas.....	88
Tabela 10 - Determinação da área ativa e fator de rugosidade das monocamadas.....	90
Tabela 11 - Valores dos excessos superficiais Γ obtidos a partir da primeira varredura redutiva, do eletrodo de ouro recoberto com as diferentes monocamadas.....	93
Tabela 12 - Porcentagens de perda de resposta voltamétrica após 100 ciclos de varredura para os eletrodos de ouro modificados com SAM na presença de ferricianeto de potássio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$	94
Tabela 13 – Parâmetros da corrente de pico estimados através do desvio padrão relativo obtidos para os eletrodos após cada preparo das diferentes SAMs pela VC em PBS, pH 7,0, na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$.Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1}	96
Tabela 14 - Parâmetros obtidos a partir dos dados de impedância (Diagramas de Nyquist) dos diferentes eletrodos.....	98
Tabela 15 – Estimativa da capacitância e da constante aparente de velocidade dos diferentes eletrodos modificados.....	100
Tabela 16 – Valores de correntes, potenciais e ΔE_p para oxidação da dopamina.....	103
Tabela 17 – Parâmetros analíticos obtidos pela técnica de voltametria cíclica em meio a DA na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	111

Tabela 18 – Parâmetros analíticos obtidos pela técnica de voltametria de onda quadrada em meio a DA na faixa de concentração de $1,07 \times 10^{-7}$ a $6,6 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹	
.....	118

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA – ácido ascórbico

AFM - microscopia de força atômica

AFP - alfa fetoproteína

β -Gal - β -galactosidase

BR – tampão Britton-Robinson

C_d - capacitância da dupla camada elétrica

CA – cronoamperometria

CPE – elemento de fase constante

CYS - cistamina

CYSTE - cisteamina

DA – dopamina

dt - 1,4 – ditiano

DTBA-PBA - ácido ditiobis(4-butilarilamino-*m*-fenilborônico)

DTDPA – 3,3-ditiodipropiônico

Eac – amplitude de potencial

Edc – potencial aplicado

EIE - espectroscopia de impedância eletroquímica, do inglês *electrochemical impedance spectroscopy*

Ep – potencial de pico

EQM – eletrodos quimicamente modificados

ΔG_{ads} – energia livre de adsorção

GOx – glicose oxidase

Hpyt - 5-(4-piridina)-1,3,4-(oxadiazol)-2-tiol

HPR – horse peroxidase

Ip – corrente de pico

Ipa – corrente de pico anódica

Ipc – corrente de pico catódica

K_{app} - constante aparente de velocidade

LB - Langmuir-Blodgett

LbL - camada por camada, do inglês *Layer-by-layer*

MAA - ácido mercaptoacético

MBA - ácido mercaptobenzóico

MBT - ácido mercaptobenzotiol
MCQ - microbalança de cristal de quartzo
MPA - ácido 3-mercaptopropiônico
MPE – mapa de potencial eletrostático
MSA – ácido mercaptosuccínico
MUA - ácido mercaptoundecanóico
Nq - ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfônico
PBS - tampão fosfato salino
R_{ct} - resistência de transferência de carga
RBC – células vermelhas do sangue, do inglês *red blood cells*
R_s - resistência da solução
SAM - monocamada auto-organizada, do inglês *self-assembled monolayer*
SCE - eletrodo de referência calomelano
SPR - ressonância de plasma de superfície, do inglês *surface plasmon resonance*
STM - microscopia de varredura de tunelamento
TLA - ácido tioláctico
TC – ácido tióctico
TDSA - ácido tiodisuccínico
TTF - tetratiofulvaleno
TU – tiouréia
UA – ácido úrico
UV – irradiação ultra-violeta
VC - voltametria cíclica
VOQ – voltametria de onda quadrada
VPD - voltametria de pulso diferencial
Z_{tm} – impedância de transferência de massa
ω - frequência angular
θ - cobertura da superfície
Γ – excesso superficial

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Apresentação.....	1
1.2 Revisão Bibliográfica.....	3
1.2.1 Eletrodos quimicamente modificados a base de filmes finos.....	3
1.2.2 Monocamadas auto-organizadas (SAMs).....	8
1.2.2.1 Preparação das monocamadas auto-organizadas.....	13
1.2.2.2 Defeitos nas SAMs.....	19
1.2.2.3 Formação e remoção da monocamada.....	21
1.2.2.4 Aplicações das SAMs como sensores eletroquímicos.....	26
1.2.2.5 Aplicações das SAMs como sensores para a determinação da Dopamina.....	35
1.3 Métodos de caracterização.....	37
1.3.1 Caracterização pelas Técnicas Eletroquímicas.....	39
1.3.1.1 Voltametria cíclica	39
1.3.1.2 Voltametria de onda quadrada.....	42
1.3.1.3 Espectroscopia de impedância eletroquímica.....	45
1.4 Delimitação do problema	50
2.0 OBJETIVOS.....	52
3.0 PARTE EXPERIMENTAL.....	53
3.1 Reagentes.....	53
3.2 Limpeza da superfície do ouro.....	54
3.3 Formação da SAM na superfície eletródica.....	55
3.4 Estudos Eletroquímicos.....	56
3.4.1 Estudos pela voltametria cíclica.....	56
3.4.2 Estudos pela voltametria de onda quadrada.....	57
3.4.3 Estudos pela espectroscopia de impedância eletroquímica.....	58
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1. Caracterização do eletrodo ouro policristalino sem modificação.....	60
4.2 Diferentes moléculas utilizadas para a modificação do eletrodo de ouro....	68
4.3 Caracterização dos eletrodos de ouro modificados pelas diferentes SAMs pela voltametria cíclica (VC).....	71
4.3.1 Eletrodo de ouro com SAM de ácido 3-mercaptopropiônico (Au-MPA).72	

4.3.2 Eletrodo de ouro com SAM de ácido tioláctico (Au-TLA).....	76
4.3.3 Eletrodo de ouro com SAM de ácido 11-mercaptopundecanóico (Au-MUA).....	80
4.3.4 Eletrodo de ouro com SAM de cistamina (Au-CYS).....	83
4.4 Comportamento dos diferentes eletrodos modificados comparados ao eletrodo de ouro.....	87
4.4.1 Determinação da área eletroquimicamente ativa das monocamadas....	89
4.4.2 Dessorção eletroquímica.....	91
4.4.3 Estudo da estabilidade das diferentes monocamadas	94
4.5 Caracterização pela Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	96
4.6 Caracterização dos eletrodos de ouro modificados na presença do analito.....	101
4.6.1 Detecção da Dopamina.....	101
4.6.2 Detecção do Ácido ascórbico.....	104
4.6.3 Aplicação do eletrodo Au-TLA como possível sensor para dopamina.....	107
4.6.4 Aplicação analítica.....	111
4.6.5 Estudo da detecção de DA na presença de AA.....	118
5.0. CONCLUSÃO.....	122
6.0 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	125
7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação

Muitos estudos de filmes finos têm sido desenvolvidos nos últimos anos, pois estes materiais são extensivamente aplicados em diversos setores da indústria, como na fabricação de microcircuitos eletrônicos, dispositivos fotovoltaicos, sensores, em processos de corrosão, dentre outros [1]. As estruturas nanométricas e o arranjo atômico se destacam, os quais representam economia do material e baixo peso molecular. Esses filmes finos determinam novas propriedades físicas, químicas, óticas e metalúrgicas a superfície do substrato [2].

O desenvolvimento deste trabalho descreve o estudo e uso dos sistemas auto-organizados como elemento base nas modificações de eletrodos de ouro policristalino. Procurou-se investigar as potencialidades da utilização de sistemas automontados, na construção de ferramentas analíticas com características vantajosas em relação às existentes, para a construção de um sensor para determinação de compostos de interesse farmacológico.

Inicialmente encontra-se uma introdução a respeito de monocamadas auto-organizadas de tióis, sua preparação, seu processo de formação, sua remoção e aplicação como sensor. Dentre os métodos mais empregados, a fim de avaliar a eficiência da formação do filme, bem como suas propriedades. Além disso, descreve-se uma breve abordagem das técnicas relatadas na literatura.

No processo de preparação de filmes, procurou-se obter uma superfície livre de defeitos e impurezas, os quais comprometem a aplicação deste material, como posterior sensor. Foram avaliadas diferentes cadeias de tióis para a modificação da superfície, procurando-se obter um sistema organizado, estável e reprodutivo.

Assim neste trabalho, estudou-se a obtenção de filmes finos, pela aplicação de moléculas auto-organizadas (SAM) na superfície de ouro. Foram avaliadas as características dos filmes de SAM na presença de molécula sonda, o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Após estipuladas às melhores condições dos eletrodos, testaram-se os mesmos na presença de dopamina e ácido ascórbico.

1.2 Revisão Bibliográfica

1.2.1 Eletrodos quimicamente modificados a base de filmes finos

A intensa busca por sensores com melhores características, tais como seletividade, sensibilidade e estabilidade, são principalmente devido aos novos desafios impostos por amostras de interesse industrial, clínico e ambiental [3]. Apesar da grande versatilidade e perspectivas apresentadas pelos sensores eletroquímicos, a utilização destes, muitas vezes, é limitada. Devido à passivação gradual da superfície, a dificuldade de discriminar entre compostos alvos que possuam característica redox similares, assim como a sensibilidade de muitos analitos importantes pode ser prejudicada em função da cinética de transferência de elétrons entre estes compostos e os materiais dos eletrodos serem excessivamente lenta.

A área que oferece grande potencial para minimizar os problemas acima descritos, e conseqüentemente aumentar a aplicabilidade e eficiência dos sensores eletroquímicos, é a que compreende os chamados eletrodos quimicamente modificados. A habilidade para controlar e manipular deliberadamente as propriedades das superfícies dos eletrodos proporciona uma variedade de efeitos atrativos, levando as superfícies com características que podem contornar efetivamente muitos dos problemas apresentados pelos sensores eletroquímicos tradicionais [4].

Desde os trabalhos pioneiros na década de 70 [5, 6], o tema eletrodos quimicamente modificados (EQM), tem se revelado como uma interessante área de pesquisa e tem sido objeto de considerável desenvolvimento [7]. Atualmente é, sem dúvida, uma das mais intensas áreas da pesquisa em Química Eletroanalítica [3].

Isto porque, este tipo de eletrodo se apresenta como uma estratégia, na maioria das vezes simples, e eficiente, para o desenvolvimento de procedimentos e técnicas eletroanalíticas em que a sensibilidade e a seletividade são significativamente maiores que as obtidas com o emprego dos eletrodos sólidos convencionais [8].

As modificações incluem adsorção irreversível de certas substâncias que possuem grupos funcionais desejados, ligações covalentes de espécies químicas na superfície do eletrodo e cobertura deste com filmes poliméricos ou filmes de outras substâncias [9]. No processo de ligação covalente, primeiramente a superfície é oxidada para criar grupos, então agentes ligantes, tais como organosilano ou aminas, são fixados na superfície antes da introdução da molécula de interesse. Filmes poliméricos podem ser preparados a partir de polímeros líquidos empregando-se técnicas de recobrimento por imersão (*dip coating*) [10, 11], recobrimento através do espalhamento por rotação (*spin coating*) [11, 12], eletrodeposição [13] ou ligação covalente [14, 15]. Outra classe de EQM são os chamados biossensores, os quais representam um tipo de eletrodo modificado por algum elemento de reconhecimento biológico tais como enzimas, células, anticorpos, dentre outros [16, 17]. Estes podem ser preparados por ligação covalente [18], adsorção [19] ou aprisionamento em gel [20].

Outro método de modificação da superfície de eletrodos é a partir da formação de filmes finos. Os filmes finos nanoestruturados têm sido vastamente explorados em diferentes áreas, as quais englobam compostos orgânicos, poliméricos [21] e biológicos, além dos metálicos [22] e inorgânicos [23]. A montagem destes filmes ultrafinos é essencial para o desenvolvimento de dispositivos moleculares e sensores devido à possibilidade de combinação de diversos materiais. Os métodos mais utilizados para a construção de filmes ultrafinos

de materiais orgânicos e biológicos são as técnicas de Langmuir-Blodgett (LB) [24], camada por camada (*Layer-by-layer*, LbL) [14] e monocamadas auto-organizadas (*self-assembled monolayer*, SAM) [25], conforme mostra a Figura 1.

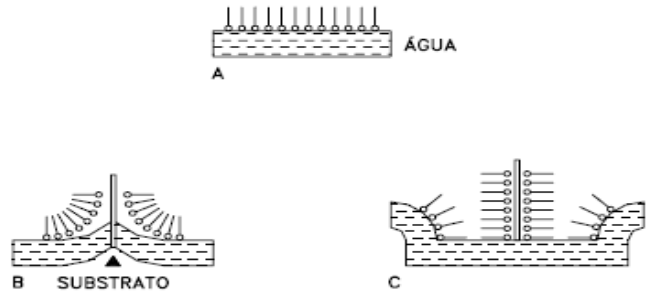
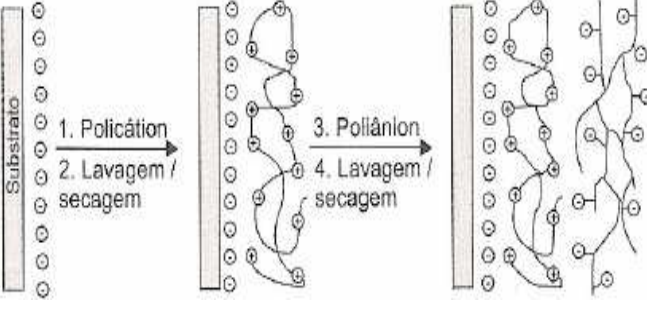
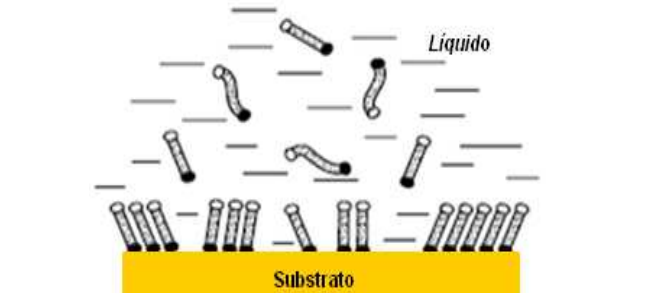
	Filmes de Langmuir-Blodgett Filmes de Langmuir transferido para um substrato sólido.
	Filmes de Layer-by-Layer Filmes de Langmuir de multicamadas nanoestruturais, alternando um policação e poliânion.
	Monocamadas auto-organizáveis Filmes crescidos em um substrato metálico na interface metal/solução

Figura 1 - Formas de nucleação dos filmes finos.

A técnica de Langmuir-Blodgett (LB) [24] tem sido a mais utilizada para construção de sistemas de multicamadas com um controle de espessura na ordem de nanômetros, além de possibilitar o processamento de filmes com orientação e estruturas moleculares bem definidas. Nesta técnica, um filme monomolecular, é

formado sobre uma superfície de uma subfase aquosa, denominado filme de Langmuir, e depois transferido para um substrato sólido, através da imersão e retirada do substrato, da subfase. A repetição desses processos permite a deposição de multicamadas, que podem ser altamente organizadas. Os materiais tradicionais empregados com a técnica LB são os anfifílicos, com partes polares e apolares bem definidas, tais como os ácidos graxos, alcoóis, ésteres e fosfolipídios de cadeias longas [26].

Ressalta-se, porém, que o método LB é sofisticado e, em muitos casos, a transferência das monocamadas podem apresentar dificuldades e serem bastante lentas. Outras limitações se referem à topologia do substrato, ao equipamento necessário, além da exigência de ambientes de trabalho extremamente limpos e isolados, o que eleva o seu custo [27].

Outra técnica, denominada “*Layer-by-layer*” (LbL), vem sendo utilizada para o processamento de filmes finos através da automontagem de multicamadas de polieletrólitos [28]. O aparato experimental exigido é mais simples que para a técnica LB, independe da forma e do tipo de substrato empregado e os equipamentos experimentais são muito mais simples o que torna este método barato e com grande potencial tecnológico. A montagem do filme em sua maioria é baseada na interação eletrostática entre as camadas dos diversos polieletrólitos. A formação de filmes ultrafinos com multicamadas, diferentemente dos processos de quimissorção, não exige a formação de ligações químicas primárias do tipo covalente. Comparativamente à técnica LB, a vantagem refere-se ao solvente comumente utilizado, a água, embora esta característica também limite a gama de polieletrólitos empregados. São características desta técnica através do procedimento manual, o longo período de preparo dispensado e a necessidade do intermédio de um

operador, o que proporciona à técnica aspectos artesanais de baixa eficiência, diminuindo a reprodutibilidade dos filmes [27]. Outras limitações da técnica de automontagem são o menor grau de organização das cadeias e a dificuldade de obtenção de monocamadas mais espessas [29].

Um processo mais comum de modificação consiste na técnica empregando-se SAM (do inglês *self-assembled monolayers*), na qual um hidrocarboneto, com um grupo tiol em uma das extremidades e um grupo amino, carboxílico ou outra espécie na outra extremidade, é adicionado sobre a superfície recém-preparada de um eletrodo de filme metálico [25, 30]. O próprio conjunto de moléculas de hidrocarbonetos forma um arranjo altamente organizado, onde os grupos tióis se ligam à superfície metálica deixando exposto o outro grupo funcional da molécula [31]. O arranjo pode ser funcionalizado através de uma ligação covalente ou por uma simples adsorção da espécie molecular de interesse.

Baseado nestas considerações será apresentado uma revisão bibliográfica com o objetivo de focalizar os principais aspectos relacionados à construção e desenvolvimento de sensores eletroquímicos de ouro utilizando-se a técnica de SAM, suas vantagens e desvantagens, além das perspectivas futuras de aplicação na área tecnológica.

1.2.2 Monocamadas auto-organizadas (SAMs)

A idéia de formar monocamadas auto-organizadas sobre substratos não é nova, sendo conhecida desde a década de 40. Nesta época, a auto-organização de moléculas orgânicas já tinha sido estudada, utilizando-se as interações ácido-base para a adsorção de monocamadas em substratos [32]. Em 1946, Zisman *et al* [33] prepararam uma monocamada de um surfactante sobre uma superfície metálica, utilizando diferentes cadeias alquilas. Em dos seus trabalhos [34], eles relataram os resultados de estudos sobre vários elementos de uma família homóloga de aminas primárias de cadeia alquila normal adsorvida à superfície de platina, o método foi proposto como uma possível abordagem para a análise de filmes importantes nos campos de adsorção seletiva, flotação mineral, inibição de corrosão, e "conservação" de metais. Entretanto, as monocamadas auto-organizadas sobre superfícies metálicas foram extensivamente investigadas somente após os estudos de Nuzzo e Allara [35] que prepararam monocamadas de alcanotiós sobre ouro por adsorção em soluções diluídas de dissulfetos.

O uso de monocamadas auto-organizadas tem crescido intensamente nos últimos 20 anos, e sua aplicação mais freqüente pode ser constatada dentro da Eletroanalítica, principalmente na modificação de superfícies eletródicas para a construção de sensores [36]. As SAMs possuem variadas aplicações, em diferentes áreas da ciência, conforme é exemplificado esquematicamente na Figura 2.

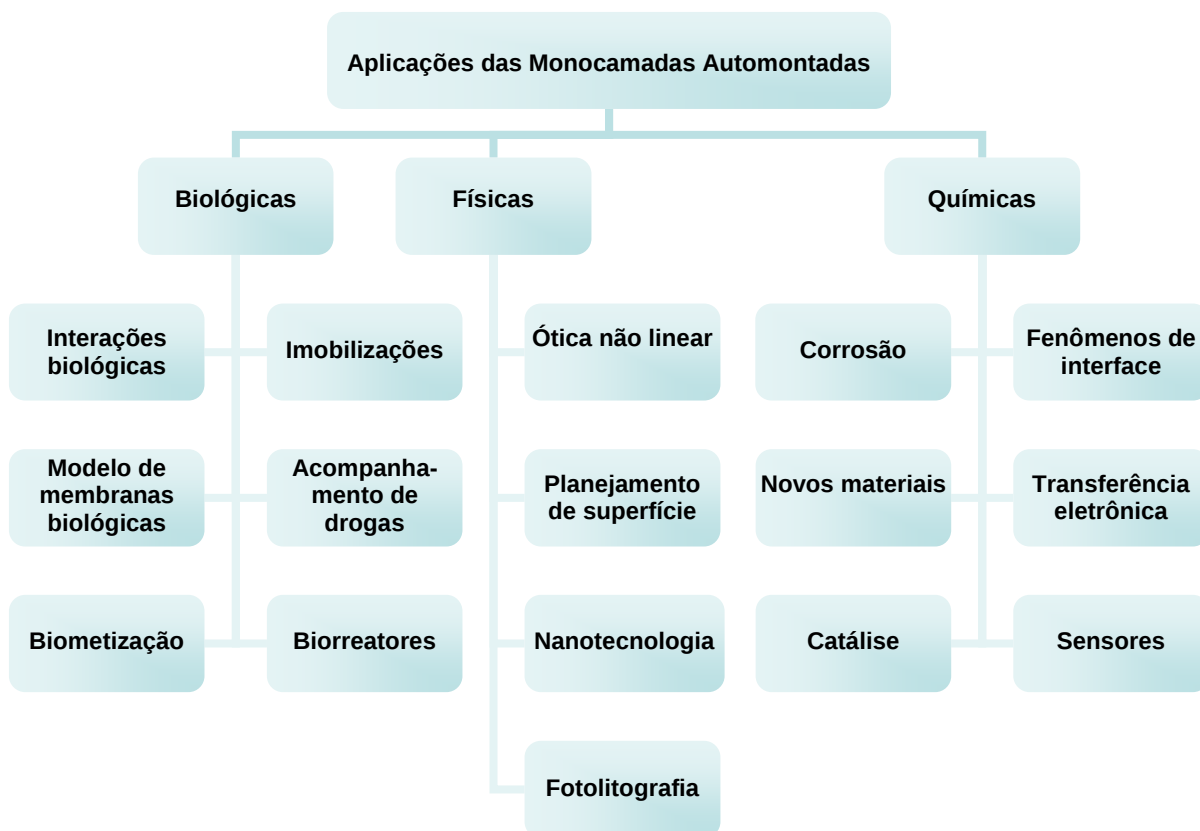


Figura 2 - Organograma das principais aplicações das monocamadas auto-organizadas adaptado da ref. [4].

A modificação pela técnica de SAM emprega camadas moleculares que exibem alta organização e que são formadas espontaneamente como consequência da imersão de uma superfície sólida em uma solução constituídas de moléculas anfóteras [37]. Uma variedade de substratos pode ser utilizada para a formação de SAM de compostos organossulfurosos, como os metais prata [38], platina [39, 40], paládio [41] e cobre [42, 43] os semicondutores e óxidos [44]. Enquanto que a adsorção deste tipo de molécula é devido à afinidade do grupo funcional do adsorvente, que interage fortemente com o substrato, a força motriz para a organização origina-se a partir de interações hidrofóbicas, do tipo Van der Waals entre as cadeias carbônicas ligadas ao grupo cabeça [4].

Várias moléculas ou compostos podem ser adsorvidos em metais para formar monocamadas através de interação física ou química entre o adsorbato e o metal.

Alcanotióis são os adsorbatos mais relatados para a formação de monocamadas sobre metais, principalmente o ouro, devido à estabilidade e à fácil obtenção das monocamadas formadas por meio da ligação Au-SH, conforme demonstra a Figura 3. Compostos alcanotióis com diferentes características são freqüentemente estudados e incluem: *n*-alcanotióis ($\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$) [45]; alcanoditióis ($\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-\text{SH}$) [46], carboxialcanotióis ($\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$) [47]; aminoalcanotióis ($\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$) [48]; tióis aromáticos ($\text{HS}-\text{Ar}$) [49].

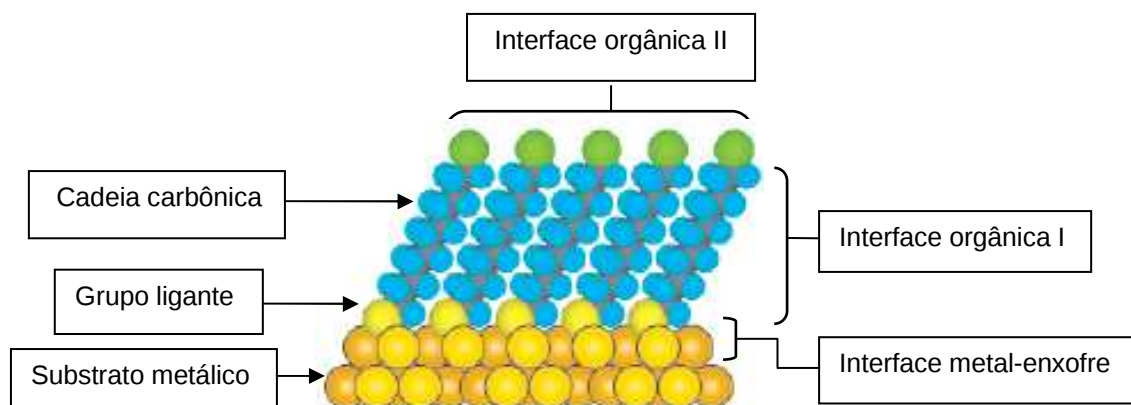


Figura 3- Estrutura de uma monocamada auto-organizada sobre o substrato ouro, adaptada da ref. [25]

Na primeira região (interface metal-enxofre) encontra-se o enxofre, o grupo ligante, que apresenta o sítio de adsorção com a superfície. A segunda região (interface orgânica I) normalmente é uma cadeia orgânica intermediária constituída, nos sistemas mais simples, por uma cadeia alquila, atua como barreira física e altera a condutividade eletrônica. A energia associada às interações intermoleculares entre as cadeias depende tanto da extensão como a densidade do empacotamento destas. Estas interações e a estrutura molecular do adsorbato podem induzir a uma inclinação destas moléculas em relação à superfície e a presença de nanoporos [50] que permitem o acesso à superfície. A terceira região (interface orgânica II) é

constituída de um grupo funcional terminal capaz de interagir com espécies presentes na fase em contato, determinando as propriedades superficiais.

A estabilidade da SAM é uma característica importante que depende da escolha do composto adsorvente. Segundo Cancino [51] normalmente SAM de cadeias curtas são menos estáveis que as de cadeias longas, pois a formação da SAM sobre eletrodos sólidos está diretamente relacionada com a intensidade das interações intermoleculares entre as cadeias laterais.

As variações dos grupos terminais das monocamadas são responsáveis pelo comportamento químico da superfície modificada [52], sendo essencial no projeto de novas interfaces com maior número de propriedades interessantes. Grupos terminais com caráter ácido ou base, como o ácido carboxílico ou grupos amina, são os mais utilizados [47, 48]. Estes grupos são sensíveis ao pH e permitem controlar a densidade de carga de superfície da monocamada de acordo com o pH da solução de imersão [53]. Além disso, essas interfaces carregadas têm sido utilizadas para a imobilização eletrostática de enzimas em biossensores [54] e como modelos de equilíbrio ácido-base em moléculas de suporte sólido. Há outros grupos terminais, tais como os alcanos [45] e benzenos [49] que também são amplamente utilizados em reações para a formação de SAM.

Quando são utilizadas diferentes monocamadas de tióis de variados grupos terminais, deve-se considerar as forças intermoleculares, inclinações de ângulos, torções, interações estéricas, eletrostáticas e forças de Van der Waals. Conseqüentemente, a escolha do tiolato é um passo importante para a construção do sensor. Mendes *et al* [55] verificaram os efeitos das diferentes monocamadas auto-organizadas, tais como cistamina (CYS), cisteamina (CYSTE), ácido 3-mercaptopropiônico (MPA), ácido mercaptobenzóico (MBA), ácido tioláctico (TLA) e

ácido mercaptoundecanóico (MUA), testando a estabilidade e as suas propriedades através do comportamento do par redox, conforme Figura 4.

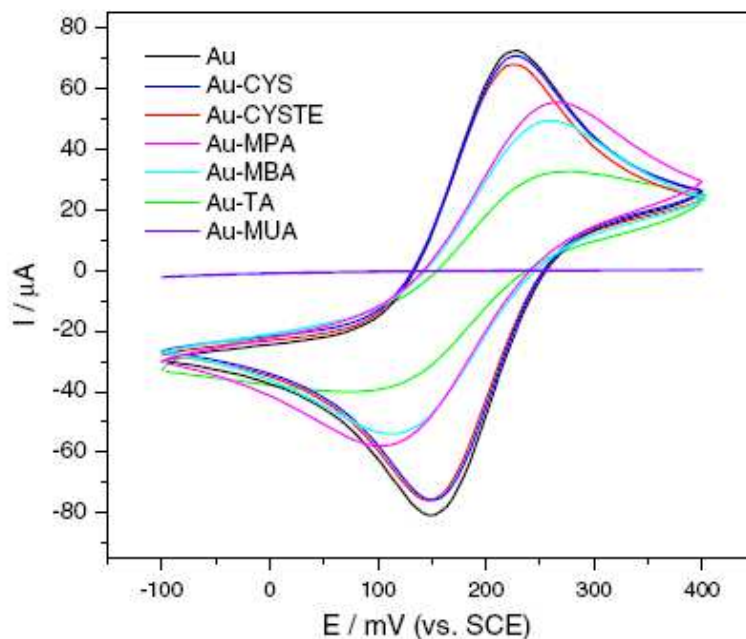


Figura 4 - Voltamogramas cíclicos para o eletrodo ouro base e os eletrodos modificados com diferentes SAMs em $5 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5. Velocidade de varredura 100 mV s^{-1} . Varredura anódica [55].

Através dos estudos foi demonstrado que a utilização de eletrodos de ouro modificados com cadeias curtas entre 2, 3 e 4 carbonos a transferência de elétrons ocorre através da SAM, produzindo perfis voltamétricos muito similares aos observados com a superfície do ouro sem modificação. No caso das cadeias longas, tal como o MUA a transferência de elétrons é totalmente bloqueada, não fornecendo perfil voltamétrico.

Shervedani *et al* [56] estudaram o comportamento eletroquímico da glicose oxidase (GOx) imobilizada sobre o eletrodo de ouro modificado pela técnica de SAM por três tipos de ácidos mercaptocarboxílicos, incluindo o ácido 3-mercaptopropiônico (MPA), ácido 3-mercaptosuccínico (MSA), e ácido tiodisuccínico (TDSA). A GOx foi imobilizada no SAM por rota via anidrido para preparar os

biossensores (Au-MPA-GOx), (Au-MSA-GOx), e (Au-TDSA-GOx). Etapas de formação e desempenho analítico dos biossensores preparados foram avaliadas por voltametria cíclica (VC), cronoamperometria (CA) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Calculou-se a cobertura da superfície parcial (θ) de ouro pelos tióis, as quais mostraram a seguinte ordem Au-MPA (θ 36%) > Au-MSA (θ 30%) > Au-TDSA (θ 24%), efeito inverso foi observado a inclinação das curvas de calibração para a determinação de glicose com Au-MPA-GOx < Au-MSA-GOx < Au-TDSA-GOx. Este comportamento foi explicado com base nas ramificações dos ácidos carboxílicos (ou seja, TDSA), que permite a imobilização de uma maior quantidade da enzima, mesmo com menor cobertura da superfície (24%) por tióis.

1.2.2.1 Preparação das monocamadas auto-organizadas

A preparação da monocamada possui um papel fundamental no desempenho eletroanalítico do eletrodo modificado. Segundo Carvalho *et al* [57] a estrutura da monocamada depende fortemente do substrato e da sua morfologia, da natureza do acoplamento e das forças intermoleculares entre as moléculas e o adsorbato.

A escolha do material para o eletrodo base, cuja superfície sofrerá a modificação, é um aspecto muito importante da preparação de um EQM. Este substrato deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização selecionado [8].

O substrato mais utilizado para a construção das SAM é o ouro. A quimissorção de tiolatos sobre o ouro ocorre espontaneamente. Dentre as razões de o ouro ser o metal preferido e a classe mais utilizada para a formação da SAM a partir do ponto de vista eletroquímico pode-se citar: sua relativa inércia; a formação de monocamadas bem empacotadas; forte interação específica e estabilidade com o

enxofre, permitindo a formação de monocamadas na presença de muitos outros grupos funcionais; além de ser um metal fácil de ser obtido na forma de colóide ou filme fino e apto a estudos biológicos já que muitas células podem aderir à superfície áurea sem sofrer riscos de toxidez [58].

Há, no entanto, um número de fatores experimentais que podem afetar a estrutura da monocamada resultante, a reprodutibilidade e a sua taxa de formação. Algumas aplicações das SAM exigem o aparecimento de irregularidades na monocamada construída (denominadas *pinholes*), porém outras requerem a otimização das condições a fim de minimizar a formação de defeitos estruturais, principalmente em estudos de corrosão [59]. Nos sensores eletroquímicos estes defeitos podem ter um efeito pronunciado no comportamento eletroquímico do eletrodo, que se pode assemelhar a um arranjo de microeletrodos [50]. Dentre os principais fatores que influenciam no desenvolvimento da SAM destacam-se [60]:

Solventes: O solvente pode interferir na cinética de formação e mecanismo de organização das SAM [43]. O parâmetro que governa a adsorção do tiol está relacionada a interação solvente-substrato e solvente-adsorbato. Se as moléculas tioladas possuem mais afinidade pelo solvente que pela superfície metálica, a taxa de formação da SAM será altamente afetada. Por outro lado, se o solvente possuir grande afinidade pelo substrato pode ocorrer um impedimento da troca das moléculas do solvente pelas do adsorbato, dificultando a adsorção do tiol [61].

Na literatura há relatos do uso do tolueno [62], hexano [63], metanol [59] e etanol [55] como solventes. Atualmente o etanol é o solvente mais utilizado devido ao seu baixo custo, baixa toxicidade e alta pureza. Este solvente dissolve uma variedade de tiocompostos, com diferentes polaridades e tamanho de cadeias carbônicas.

Temperatura: A temperatura influencia na formação da monocamada. O preparo de SAM em temperaturas superiores a 25°C pode melhorar a cinética de formação e reduzir o número de defeitos produzidos [64]. A quantidade de vacâncias diminui linearmente com o aumento da temperatura, mas em relação ao arranjo estrutural as monocamadas não variam significativamente. Porém em altas temperaturas, acima de 80°C as SAMs podem desorver da superfície metálica. A temperatura limite abaixo da qual uma monocamada ordenada é formada foi encontrada em função do comprimento da cadeia carbônica (cadeias maiores requerem temperatura limite de 18°C enquanto cadeias menores a temperatura pode variar a 10°C) [32].

Dentro desse contexto, Paulo *et al* [65] estudaram como a temperatura afeta o processo de formação da SAM, relacionada a estabilidade termodinâmica de uma monocamada de 5-(4-piridina)-1,3,4-(oxadiazol)-2-tiol (Hpyt) sobre o ouro. A partir da magnitude da energia livre de adsorção (ΔG_{ads}) foi possível ter uma medida quantitativa da força de adsorção, a qual foi obtida pela equação $\Delta G_{ads} = -RT \ln \beta_i$, permitindo o monitoramento no processo químico de formação de monocamada. Os autores obtiveram boa cobertura da superfície nas monocamadas formadas variando-se a temperatura de 10 a 50°C, com uma maior imobilização da SAM em 30°C.

Concentração e tempo de imersão: estes dois parâmetros [60, 66] são inversamente proporcionais, ou seja, baixas concentrações de tióis em solução requerem tempos maiores de imersão [67]. SAMs formadas em soluções bem diluídas, mesmo após longos tempos de imersão, em torno de uma semana, não exibem as mesmas propriedades físicas que aquelas formadas em soluções mais concentradas. Isto ocorre, pois a quantidade de impurezas ou outros compostos

produzidos pela oxidação de tióis podem complicar o uso de soluções extremamente diluídas para formar as monocamadas.

Souza *et al* [68] estudaram o tempo de imobilização utilizando o eletrodo de ouro modificado após diferentes tempos de imersão em solução de 1,4 – ditiano (dt). Com o aumento do tempo de imersão, foi verificada uma diminuição dos valores de corrente faradaica da molécula sonda redox. A partir destes dados, os autores sugeriram um mecanismo de adsorção que tem um passo lento, responsável pela configuração final do modificador na superfície, o qual pode atuar como uma barreira na superfície em relação às reações heterogêneas de transferência de elétrons. A Figura 5 demonstra que com o aumento do tempo de imersão maior será a organização da molécula e conseqüentemente, menor o número de *pinholes* e defeitos encontrados.

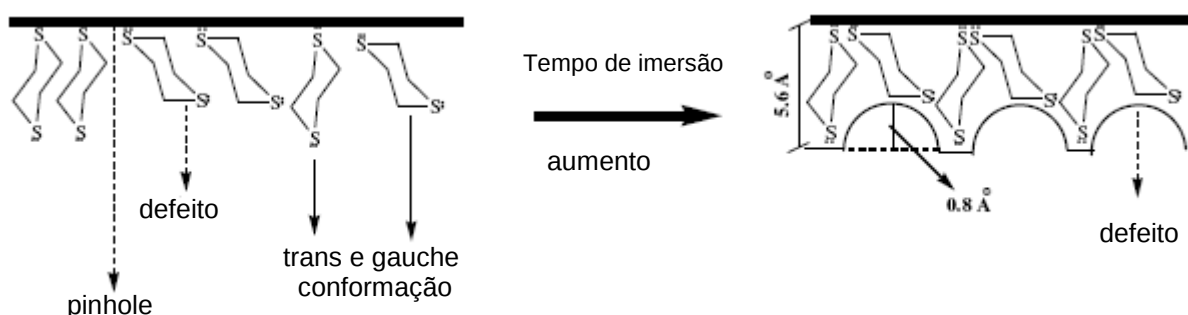


Figura 5 - Organização da monocamada de 1,4-dt sobre a superfície com a parte (a) e (b) representando respectivamente, a recém preparada SAM 1,4–dt (15 min de imersão) e aquela obtida após longo tempo de imersão (acima de 6 horas) do substrato ouro em solução 1,4–dt [68].

Assim, a diminuição dos *pinholes* locais na superfície com um aumento do tempo de imersão é responsável pela atenuação observada da transferência de elétrons interfacial atribuída ao sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$, conforme pode ser observado a partir dos voltamogramas da Figura 6.

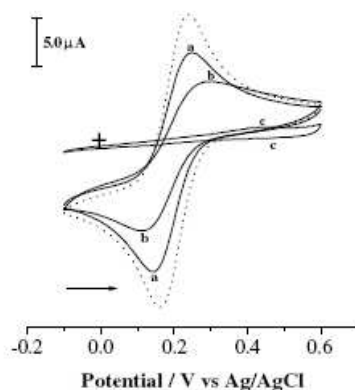


Figura 6 - Voltamogramas cíclicos de $8 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução aquosa de $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em 100 mV s^{-1} para o eletrodo de ouro (linha pontilhada) e para o eletrodo de ouro modificado após (a) 30, (b) 60, e (c) 900 min de tempo de imersão em uma solução etanólica de $1,4\text{-dt}$ [68].

Nos estudos de Raoof *et al* [69], foram otimizados os parâmetros de formação da SAM estudando-se os efeitos do tempo de imersão de 0 a 150 min, assim como o efeito da concentração do modificador ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfônico (Nq) variando-se de $0,1$ a 1 mmol L^{-1} , os quais influenciaram na determinação voltamétrica da cisteamina. Através destes estudos os pesquisadores obtiveram os eletrodos Au-Nq com melhores propriedades eletroquímicas no tempo de imersão de 30 min na concentração de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. As curvas de calibração para determinação da cisteamina apresentaram faixas lineares de concentração de $6,0 \times 10^{-5}$ a $4,5 \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$ e de $8,0 \times 10^{-6}$ a $5,5 \times 10^{-4} \text{ mmol L}^{-1}$ por voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (VPD), respectivamente. O limite de detecção de encontrado foi $36 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (VC) e $5,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (VPD).

Limpeza do substrato: este provavelmente seja o fator mais crítico para a obtenção de SAM reprodutível e com minimização dos defeitos. Superfícies contendo impurezas diminuem a adsorção dos tióis que ocorre por meio de um processo de troca. As impurezas presentes na superfície são desorvidas e trocadas pelas moléculas de tiol e, conseqüentemente, esta taxa de desorção dos contaminantes afeta a cinética de formação das SAM [55, 60].

Na literatura, várias metodologias são encontradas para a realização da limpeza superficial do substrato [55, 70], entretanto não existe uma técnica que garanta a melhor limpeza. A capacidade de fabricar camadas automontadas de boa qualidade em ouro policristalino depende sensivelmente da remoção de contaminantes do ambiente e das superfícies, para posterior exposição da superfície de ouro no tiol. Tkac e Davis [71] apresentaram um método simples de redução da camada de óxido de ouro formada por tratamentos oxidativos extensivos, comumente utilizado para limpeza da superfície. O método consiste em uma redução eletroquímica da superfície do substrato no mesmo eletrólito que o utilizado para o polimento eletroquímico, o qual é demonstrado tanto para SAM tioladas de alquilas saturadas e etileno glicol. A remoção eletroquímica do óxido de ouro foi conduzida por 10 sucessivas varreduras em solução aquosa de H_2SO_4 $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ a partir de $0,75 \text{ V}$ a $0,2 \text{ V}$ na velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . O protocolo é altamente reproduzível, e uma forma mais eficaz e rápida de garantir uma alta densidade molecular de espécies quimissorvidas após o pré-tratamento químico.

Carvalho [61] avaliou três diferentes técnicas de limpeza para o ouro policristalino, e verificou diferenças significativas para a formação da SAM. Na limpeza mecânica observou-se que, apenas com este tipo de polimento, a rugosidade do ouro aumenta significativamente, porém esta pode ser diminuída com a adição do tratamento eletroquímico. Mesmo assim, a superfície não se torna livre de defeitos. A melhor combinação de técnicas de limpeza observada foi por meio da oxidação química com solução fortemente oxidante (para otimizar a limpeza e a ativação da superfície do ouro), seguida da limpeza eletroquímica, minimizando a rugosidade do ouro policristalino e obtendo-se uma maior reprodutibilidade da superfície exposta para a adsorção das moléculas de alcanotóis. Fica evidente que

estratégias de pré-tratamento de superfície para a formação de SAM são de extrema importância para a formação de estruturas mais orientadas e organizadas com o mínimo de defeitos possíveis.

A exposição prolongada das superfícies limpas às condições ambientes pode permitir novamente a adsorção de impurezas nos eletrodos e, desta forma, a formação das SAM deve ocorrer imediatamente após a etapa de limpeza superficial.

1.2.2.2 Defeitos na SAM

Apesar destes cuidados no pré-tratamento, muitas vezes torna-se inevitável que irregularidades sejam produzidas nas monocamadas e a caracterização dos defeitos é de extrema importância, uma vez que os mesmos podem prejudicar algumas aplicações que envolvem as SAMs, bem como a transferência de elétrons.

As causas para a formação de defeitos nas monocamadas podem ser explicadas por fatores intrínsecos ou extrínsecos: fatores externos, tais como os métodos de preparação e de limpeza do substrato, a pureza das soluções dos adsorbatos, e por fatores resultantes do simples fato das SAMs se apresentarem como sistemas dinâmicos com comportamento complexo, neste caso com influência principal da estrutura e tamanho das cadeias orgânicas dos tiocompostos [72].

Um dos tipos de defeitos inerentes à construção da SAM em superfícies de ouro consiste nas vacâncias, que consistem em regiões da SAM que possuem um desnível em relação às regiões vizinhas, ocasionado pela diminuição de átomos de ouro presentes na superfície em determinados locais. A Figura 7 apresenta alguns defeitos produzidos em uma superfície recoberta por uma monocamada.

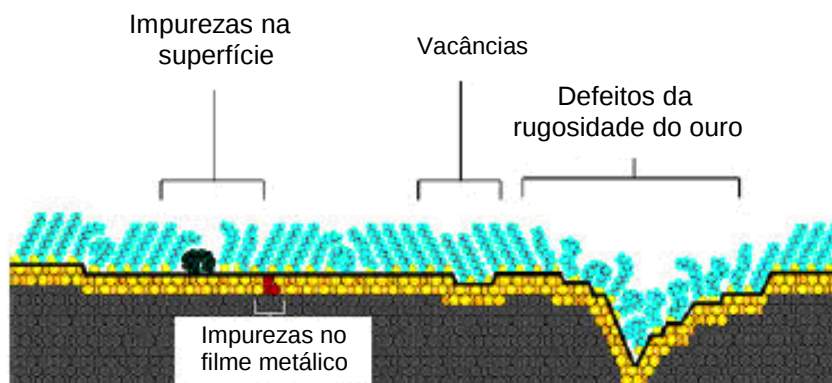


Figura 7 - Esquema de alguns dos defeitos intrínsecos e extrínsecos encontrados em SAM formadas em substrato de ouro [60].

As impurezas tanto no filme metálico quanto na superfície, podem ocorrer facilmente. A ação destes interferentes, inibindo e mascarando a resposta eletroquímica da espécie de interesse, pode ser devido, em geral, a um ou mais dos seguintes fenômenos: passivação (adsorção do interferente à superfície do eletrodo o que impede o acesso da espécie de interesse, ou reduz a velocidade de troca de elétrons); competição do interferente com a espécie de interesse pelos sítios ligantes existentes à superfície do eletrodo; impurezas no substrato metálico policristalino [8]. Uma maneira de promover exclusão, destes interferentes é o pré-tratamento da superfície para evitar esses tipos de defeitos.

No entanto, defeitos de SAMs, que podem ser ligados a características do substrato (por exemplo, a rugosidade, as ligações entre os átomos) e do filme (por exemplo, comprimento da cadeia alquila e tamanho do grupo terminal), podem influenciar substancialmente as características da camada em nanoescala. Este fato pode conduzir a pobre reprodutibilidade, e impedir o uso desses sistemas para medidas precisas de análise, como os requeridos na superfície base para aplicação como sensor [73].

As monocamadas raramente apresentam um empacotamento perfeito podendo conter *pinholes* ou outros defeitos. O defeito é um sítio onde moléculas ou

íons podem se aproximar da superfície do eletrodo em uma distância mais curta que a espessura da monocamada, enquanto um *pinhole* é definido como um sítio ou um nanoporo no qual a superfície do eletrodo é exposta ao eletrólito [50]. Tanto o eletrólito quanto o par redox têm acesso ao substrato através dos *pinholes*, devido o resultado de adsorção imperfeita dos tióis à superfície de ouro durante o passo da automontagem e/ou perda subsequente do tiol durante a lavagem, armazenamento ou utilização, a qual pode ser caracterizada por vários métodos eletroquímicos.

As técnicas mais empregadas para avaliar a presença de defeitos e *pinholes* são as técnicas eletroquímicas. A fração de área total de *pinholes* pode ser medida por voltametria cíclica em presença de ácido sulfúrico, e também por impedância faradaica na presença de várias moléculas sonda [66].

1.2.2.3 Formação e remoção das monocamadas

O processo de formação das SAMs é determinado pela energia e cinética de adsorção da molécula sobre o substrato. Por isso, este processo é fortemente dependente da estrutura do composto organossulfuroso, da concentração da solução, da polaridade e estrutura do solvente utilizado.

Pesquisas sobre a formação dessas camadas [32] mostram que durante o processo de imersão a cinética de adsorção da SAM sobre a superfície do eletrodo pode ser descrita em duas etapas, na qual há uma quimissorção caótica inicial, seguida de uma etapa lenta de organização dependente do tempo. De modo geral, inicialmente há um crescimento muito rápido na espessura do filme, cerca de 80 a 90% do valor final, em poucos minutos, seguida de um processo lento, onde adsorção e organização ocorrem por uma etapa lenta (na ordem de horas) para maximizar a densidade de moléculas até atingir um elevado grau de compactação e

minimizar os defeitos da monocamada. Um esquema da cinética da formação de monocamadas ao longo do tempo pode ser observado segundo a Figura 8.

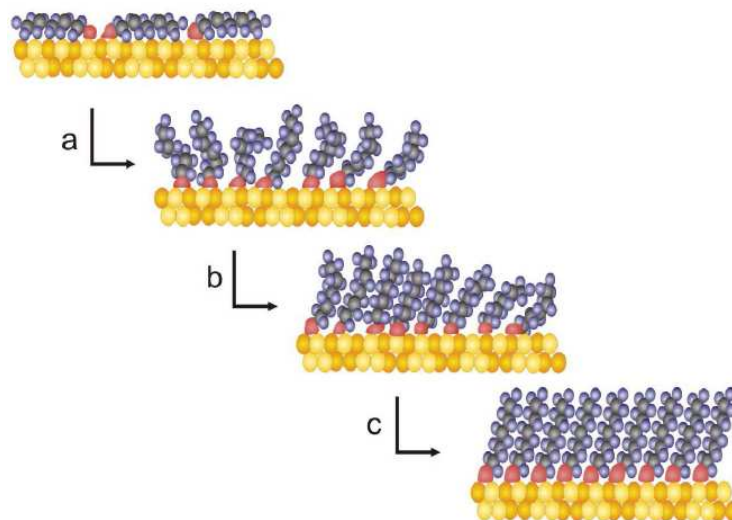
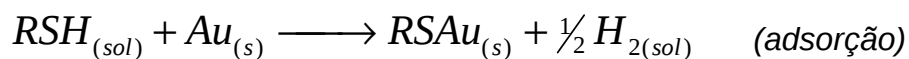


Figura 8 - Esquema da cinética de formação de SAM. As etapas de formação de uma monocamada: (a) a etapa inicial é caracterizada pela rápida adsorção e crescimento da espessura do filme, seguida por um processo mais lento (b) de adsorção e organização, até a formação final (c) da monocamada auto-organizada [51].

Na formação da SAM, são necessárias três etapas: a quebra da ligação S-H, a formação da ligação Au-S e o destino remanescente do cátion H^+ . O mecanismo envolvido na reação de tióis com ouro (Au^0) produz uma espécie tiolato a partir de um processo de adsorção química (quimissorção) com a liberação de H_2 . A união do grupo tiolato à superfície de ouro é muito forte (a força de ligação homolítica é de aproximadamente 40 kcal mol^{-1}) [32].

Baseado em evidências eletroquímicas, a reação é favorecida, pois a formação de H_2 é termodinamicamente favorável. Com base nas energias de ligação RS-H, H_2 , e RS-Au (87 , 104 e 40 kcal mol^{-1} , respectivamente), a energia líquida de adsorção de alcanotiolatos em ouro seria -5 Kcal mol^{-1} (exotérmica). Um valor de $-5,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ foi calculado com base em dados eletroquímicos de Schlenoff [74], sugerindo que a estimativa de 40 kcal mol^{-1} para a força de ligação Au-S é provavelmente correta.

O processo físico-químico de adsorção e dessorção eletroquímica podem ser representados pelas seguintes reações.



O mecanismo de formação e a estrutura das monocamadas por tióis têm sido estudados em nível molecular graças ao substancial avanço de técnicas de microscopia, tais como microscopia de força atômica (AFM) [75] e de tunelamento (STM) [76, 77]. Resultados de microscopia indicam que as monocamadas automontadas de alcanotióis, por exemplo, têm a capacidade de organizar-se com uma periodicidade bidimensional e com um empacotamento geralmente hexagonal e espaçamento médio de 4,9 Å entre os sítios de ligação dos adsorbatos, ou seja, os átomos de enxofre [32], conforme a Figura 9. Monocamadas formadas por moléculas mais volumosas apresentam espaçamentos superiores a 4,9 Å.

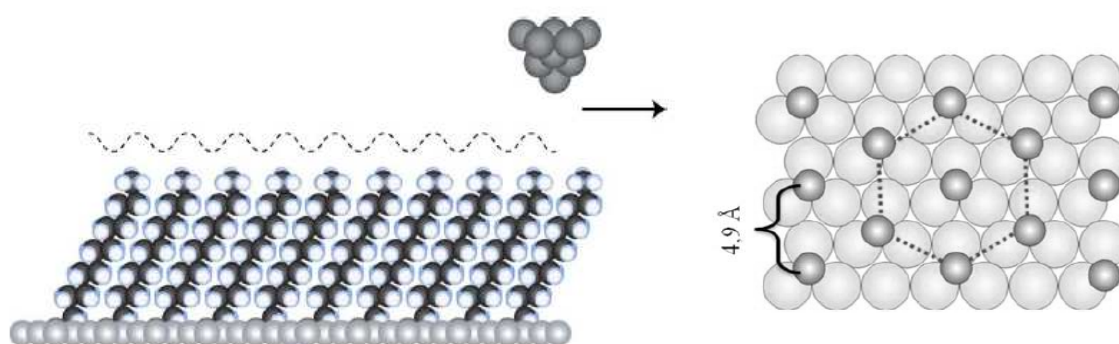


Figura 9 - Esquema da microscopia de varredura de tunelamento em toda a superfície de um *n*-alcanotiolato e a representação da organização hexagonal nas monocamadas de alcanotióis formadas sobre o ouro.

Szefczyk *et al* [53] propuseram que em uma superfície limpa, plana e livre de defeitos, as moléculas adsorvidas emparelham-se geralmente com uma inclinação

$(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R 30^\circ$ em relação ao substrato, que determina a estrutura do conjunto SAM. A espessura da monocamada não é simplesmente igual ao comprimento da cadeia, ela está relacionada à inclinação deste grupamento como demonstra a Figura 10.

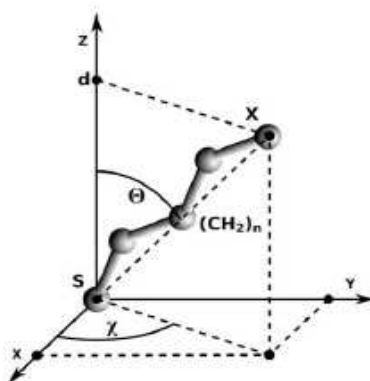


Figura 10 - Esquema da formação da monocamada sobre o substrato. Definição do ângulo de inclinação (Θ), ângulo de precisão (χ) e espessura da monocamada (d). S é o átomo de enxofre e X é grupo terminal. Os ângulos são medidos entre o eixo Z e a linha que une enxofre ao grupo terminal [53].

Estudos envolvendo as contribuições de entalpia de formação e dinâmica das monocamadas tem sido foco de diversos trabalhos [64, 65]. Além destes, estudos dos fenômenos de dessorção eletroquímica são comumente utilizados para caracterizar SAM [55].

Cancino [51] descreve três metodologias empregadas para a dessorção: o deslocamento por troca, a foto-oxidação e a dessorção eletroquímica. O deslocamento por troca ocorre quando as moléculas que constituem uma SAM são expostas a soluções contendo outras espécies de alcanotióis ou dissulfeto, que trocam de posição gradualmente. Porém este método não produz uma monocamada homogênea e uniforme. A remoção por foto-oxidação baseia-se na oxidação das SAMs da superfície do ouro quando expostas à irradiação ultravioleta (UV), na qual os grupos tióis se convertem em sulfatos e a SAM oxidada é facilmente removida da superfície usando solventes polares. A metodologia mais empregada é a dessorção

eletroquímica, pois os tióis sofrem dessorção redutiva quando potenciais negativos são aplicados em eletrodos metálicos [78], como mostra a Figura 11.

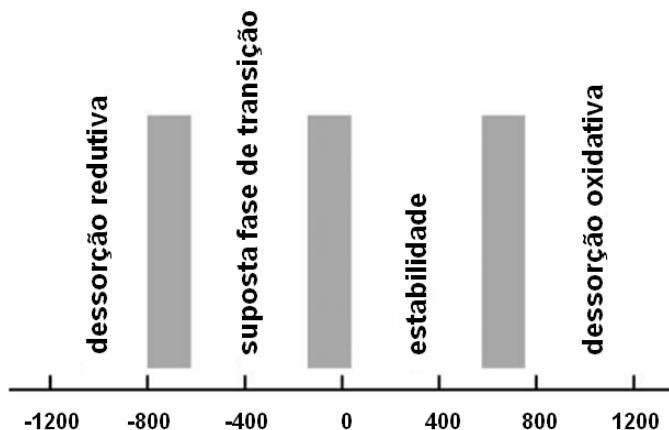


Figura 11 - Potenciais eletroquímicos para a estabilidade de tióis adsorvidos sobre o eletrodo de ouro. Adaptado da ref [78].

Tióis se dessorvem redutivamente de uma superfície metálica quando sobre esta superfície são aplicados potenciais suficientemente negativos (entre -800 a -1200 mV) [56]. O fenômeno é em geral conduzido em eletrólitos suportes, com pH básico ou neutro. Após dessorção, tanto o tiolato, quanto a superfície se solvatam. Parte do tiolato solvatado se difunde da superfície, enquanto parte pode ser readsorvido se o potencial retornar para valores positivos [60].

Conforme demonstra a Figura 11, a faixa ideal para aplicação do eletrodo como sensor, varia entre -800 a 800 mV, pois nestes valores ocorre a estabilidade da superfície metálica. Nos potenciais positivos (entre 800 a 1200 mV) ocorre a dessorção oxidativa. Esta faixa de potencial é utilizada para ativar a superfície metálica e para diminuir a rugosidade da superfície, para posterior modificação.

1.2.2.4 Aplicações das SAMs como sensores eletroquímicos

Os sensores químicos são dispositivos que transformam uma informação química, com a variação da concentração de um componente específico (analito) de uma amostra em relação à composição total, em um sinal analítico útil. Este sistema contém duas unidades funcionais básicas: um reconhecedor e um transdutor. O reconhecedor monitorará o desaparecimento de algum reagente ou o aparecimento de algum produto da reação do analito de interesse, através de um sinal. Este sinal pode resultar de uma mudança da concentração de prótons, da liberação ou absorção de gases, emissão, absorção ou reflectância de luz, emissão de calor, e dessa forma, trazer informações sobre a reação catalisada pelo modificador. O transdutor converte este sinal em uma resposta mensurável, tais como corrente elétrica, diferença de potencial elétrico, mudança de temperatura ou absorção da luz através de fenômenos eletroquímicos, térmicos ou ópticos. Este sinal pode ser ainda amplificado, processado ou armazenado para posteriores análises [79].

A obtenção de informação analítica depende essencialmente da capacidade do filme, em reconhecer a espécie de interesse da maneira seletiva. Um aspecto relevante associado a esta operação envolve a necessidade de acesso a algum processo químico, como por exemplo, uma reação de oxidação-redução que viabilize a transdução do sinal para o detector [3].

As aplicações destes no monitoramento e controle ambiental, em agricultura, indústria de alimentos, farmacêutica e clínica têm possibilitado análises com monitoramento contínuo e *in vivo* em tempo real [80].

Sensores eletroquímicos baseados na modificação de sua superfície por monocamadas auto-organizáveis são muito atrativos, pois combinam alta sensibilidade dos métodos eletroquímicos tradicionais com as novas possibilidades

de aumento de seletividade e estabilidade promovidas pelas SAMs. Na Figura 12, são apresentadas algumas vantagens das monocamadas [4] que podem ser empregadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos.

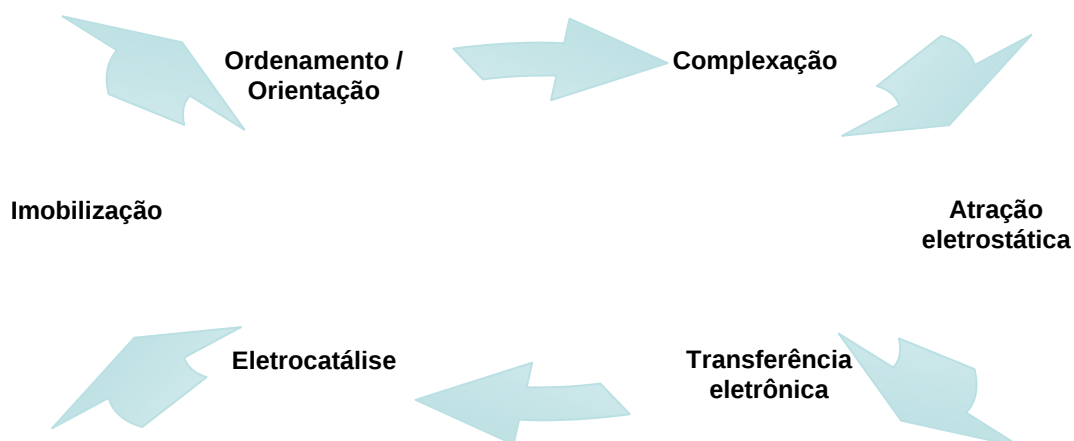


Figura 12 - Esquema das principais propriedades das monocamadas auto-organizadas utilizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. Adaptado da ref. 4.

Na seqüência estão apresentados alguns exemplos da literatura do emprego das SAM como sensores eletroquímicos para a determinação de diversas espécies de interesse. As SAMs contendo grupos específicos sobre eletrodos de ouro podem ser utilizadas com êxito para o reconhecimento seletivo de diferentes íons inorgânicos, com grande sensibilidade e seletividade em relação a outros eletrodos. Em um trabalho realizado por Li *et al* [81], uma monocamada do tiol ciclodextrinas (MEA- β -CD) foi imobilizada sobre o eletrodo de ouro, para determinação de Pb^{2+} apresentando alta sensibilidade e reprodutibilidade. O limite de detecção alcançado foi de $7,1 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, o qual é cerca de dez vezes melhor quando comparado aos outros métodos relatados na literatura para a determinação do Pb^{2+} .

A maioria das aplicações das SAM em eletroquímica consiste na determinação de espécies orgânicas de interesse biológico e ambiental. Isto pode ser atribuído as seguintes razões: (a) as monocamadas oferecem ambientes

hidrofóbicos, similares aos utilizados em cromatografia de fase reversa, os quais são mais adequados para extração de moléculas orgânicas não iônicas; (b) há uma grande demanda no mercado de métodos analíticos simples e rápidos para determinação de substâncias orgânicas; (c) as monocamadas apresentam maior gama de possíveis interações com moléculas orgânicas comparada aos íons metálicos, possibilitando um aumento na seletividade [4].

Lee *et al* [82] desenvolveram eletrodos modificados com SAM com o ácido ditiobis(4-butilarilamino-*m*-fenilborônico) (DTBA-PBA) e aplicaram como sensor para a detecção de monossacarídeos (galactose, frutose, manose e glucose). Pela técnica de plasma de superfície (SPR), verificaram-se o aumento das interações moleculares entre DTBA-PBA-SAM e monossacarídeos, o qual resultou em uma mudança de excitação elétron opticamente induzida na superfície do Au através de uma mudança no índice de refração da camada de reconhecimento interfacial. Essa correlação entre a excitação de elétrons e de interação molecular foi mensurável em concentrações muito baixas de monossacarídeo ($1,0 \times 10^{-12}$ mol L⁻¹). O eletrodo Au-DTBA-PBA mostrou-se seletivo para a frutose, entre os quatro tipos de monossacarídeos, mesmo em um intervalo de baixa concentração.

Outra estratégia recentemente difundida na literatura consiste na utilização de nanopartículas, Zhou *et al* [83] eletrodepositaram nanopartículas de zircônia sobre a monocamada de ácido 2-mercaptoetanosulfônico de sódio sobre o eletrodo de ouro. O eletrodo foi desenvolvido para a determinação de paration (organofosfato). A eletroquímica do eletrodo obtido foi estudada utilizando a voltametria cíclica e a voltametria de onda quadrada. A resposta voltamétrica de adsorção foi linear no intervalo de concentração de 0,005 a 1,0 µg mL⁻¹ (depois de 2 min de adsorção) obtidos com os parâmetros operacionais otimizados da voltametria de onda

quadrada. O limite de detecção foi de $0,8 \text{ ng mL}^{-1}$ ($S/N = 3$). O eletrodo exibiu reprodutibilidade aceitável 4,16% e uma boa estabilidade. O eletrodo foi aplicado para a determinação do paration em amostras reais, e resultados satisfatórios foram obtidos.

A exploração de materiais biológicos tem se constituído de um fator positivo para o desenvolvimento da Eletroanalítica. Um biossensor é definido como dispositivo analítico contendo um elemento biológico, tal como enzimas [56], anticorpos [84] e antígenos [70] os quais são capazes de reconhecer determinada substância, conectado ou integrado em um transdutor que converte uma resposta biológica em um sinal eletrônico ou óptico proporcional à concentração do composto a ser detectado [79]. A Figura 13 representa esquematicamente os componentes de um típico biossensor:

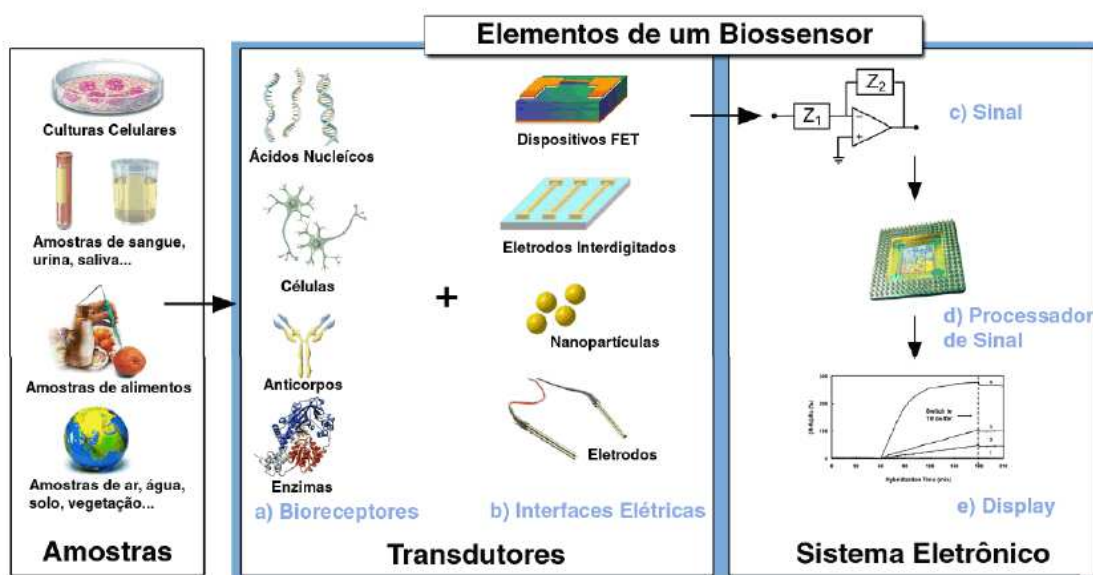


Figura 13 - Elementos e componentes de um típico biossensor [79].

Os biossensores eletroquímicos têm demonstrado alta seletividade, sensibilidade e baixo custo, podendo ser empregados para métodos analíticos

quase específicos para a determinação de compostos alvos [4, 85]. A SAM constitui um método de imobilização muito promissor para a construção de biossensores, pois permitem orientar as enzimas sobre a superfície dos eletrodos sem desnaturação, além de viabilizar a transferência eletrônica direta das enzimas para a superfície dos eletrodos.

A monocamada permite o isolamento eletroquímico da superfície do ouro (eletrodo de trabalho), e é uma excelente técnica de imobilização de proteínas, as quais protegem do contato direto com a superfície sólida, assim reduzem o risco da desnaturação do elemento sensor. Além disso, a utilização de proteínas imobilizadas por ligação covalente, pode ser exposta a diferentes valores de pH, sendo regeneradas conduzindo a um sistema reutilizável. Limbut *et al* [86] imobilizaram covalentemente o anticorpo anti-alfafetoproteína (anti-AFP) a uma superfície de ouro modificado com uma monocamada automontada de tiouréia (TU). O desempenho das SAM de anticorpos foi comparado com os das camadas similares à base de ácido tióctico (TC) e ácido 3-mercaptopropiônico (MPA), utilizando sistema de injeção de fluxo do imunossensor capacitivo. O sistema constituído pela ligação covalente do anti-AFP sobre eletrodo de ouro modificado com monocamada de tiouréia (SATUM) pode ser utilizado para detectar a alfa-fetoproteína com alta eficiência, sensibilidade semelhante, no mesmo intervalo linear ($0,01 - 10 \mu\text{g L}^{-1}$) e limite de detecção (10 ng L^{-1}), como os obtidos a partir de sensores baseados em monocamadas de ácido tióctico (SATCM) e monocamada de ácido 3-mercaptopropiônico (SAMPAM). O sistema apresentou-se específico para a alfa-fetoproteína, a qual pode ser regenerada e reutilizada até 48 vezes.

Existem várias aplicações de biossensores de DNA ou genossensores [87, 88]. A detecção de seqüências específicas de bases em ácidos nucleicos humanos,

virais e bacterianos vem crescendo de importância no diagnóstico de doenças. Os eletrodos modificados com DNA têm sido comumente empregados na análise e seqüenciamento de bases por técnicas de hibridização [89]. No processo de hibridização, o eletrodo modificado com ácido nucléico identifica a seqüência de bases complementares por meio da formação de dupla hélice híbrida. Esta identificação é eficaz e específica na presença de outras seqüências não complementares, como no trabalho desenvolvido por Zhang *et al* [90] na detecção sensível de ssDNA com o eletrodo Au-Mercaptobenzotiol. (Au-MBT) A interação seletiva de MBT com dsDNA reflete a extensão da hibridação entre ssDNA sonda e ssDNA alvo. Combinando com as vantagens da simplicidade e baixo custo, o biossensor eletroquímico desenvolvido mostrou potencial na detecção contínua e qualitativa de ssDNA em amostras biológicas.

A utilização de biossensores a base de SAMs utilizando enzimas na área alimentícia é também bastante ampla. Conzuelo *et al* [91] aplicaram na determinação de lactose no leite e outros alimentos (chocolate, manteiga, margarina, iogurte, queijo e maionese), e os resultados obtidos foram validados por comparação com os obtidos por um kit de teste comercial de enzimas. Os eletrodos de ouro foram modificados com SAM de ácido 3-mercaptopropiônico em que as enzimas β -galactosidase (β -Gal), glicose oxidase (GOx), peroxidase (HRP) e o mediador tetratiofulvaleno (TTF) foram co-imobilizados por uma membrana de diálise. A β -Gal catalisa a hidrólise da lactose, a glicose oxidase produzida catalisa a reação da glicose a ácido glucônico e o peróxido de hidrogênio gerado nesta reação é reduzido na presença de HRP. Esta reação enzimática é mediada pelo TTF, e a redução da TTF^+ em 0,00 V (AgCl / vs Ag) dá origem a um sinal amperométrico proporcional à concentração de lactose. O biossensor apresenta uma boa repetibilidade das

medições realizadas com o mesmo biocompósito, uma boa reprodutibilidade das respostas obtidas e uma vida útil de 28 dias. A curva de calibração linear foi obtida para a lactose na faixa de concentração entre $1,5 \times 10^{-6}$ a $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, com um limite de detecção de $4,6 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. O efeito de potenciais interferentes foi avaliado de modo a verificar a estabilidade e seletividade da resposta do biossensor. Além disso, o biossensor apresentou um desempenho adequado em sistemas de injeção em fluxo em conexão com detecção amperométrica.

Atualmente existem várias possibilidades de aumentar a gama de aplicações dos eletrodos de ouro como sensores eletroquímicos. Vários complexos miméticos têm sido preparados para produzir um sistema capaz de imitar a catálise enzimática e utilizados na construção de sensores biomiméticos como relatados na literatura [92]. A química dos sítios ativos das metalo-enzimas pode ser aproveitada para o desenvolvimento de novos sensores para serem utilizados na análise de um grande número de substâncias biológicas. Recentemente, Moccelini *et al* [58] estudaram a oxidação catalítica do catecol pelo complexo de níquel (II) imobilizado no eletrodo de ouro modificado com MPA. Este eletrodo modificado foi utilizado como sensor para a determinação do catecol em amostras de chá verde. Os resultados obtidos na determinação do catecol em amostras de chá verde utilizando o eletrodo Au-MPA-complexo de Ni(II) foram comparados com o método de eletroforese capilar. Este eletrodo modificado ofereceu vantagens, incluindo uma boa faixa linear de $3,31 \times 10^{-6}$ a $2,53 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de $8,26 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, alta estabilidade, baixo custo e tempo de resposta rápido.

Na Tabela 1 estão resumidas as características de alguns sensores e biossensores eletroquímicos de ouro modificados com diferentes SAMs, descritos na literatura.

Tabela 1 - Exemplos de sensores e biossensores de eletrodos de ouro.

<i>Analito</i>	<i>Tipo de modificador</i>	<i>Descrição</i>	<i>Faixa de resposta linear</i>	<i>Sensibilidade</i>	<i>Limite de detecção</i>	<i>Referência</i>
Alfa-fetoproteína	Ácido tiótico, ácido tiótico, ácido 3-mercaptopropiônico	Sensor desenvolvido pela ligação covalente do anticorpo anti alfa-fetoproteína sobre o eletrodo de ouro modificado pelas SAM.	0,01–10 $\mu\text{g L}^{-1}$	–	10 ng L^{-1}	86
Catecol	Complexo de níquel	Sensor amperométrico, formada pela SAM de ácido 3-mercaptopropiônico e complexo de níquel	$3,31 \times 10^{-6} - 2,53 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$6,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$8,26 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$	58
Cisteamina	Ácido 1,2-nafotquinona-4-sulfônico de sódio	Sensor amperométrico, formado pela adsorção do modificador sobre o Au	$6,0 \times 10^{-5} - 4,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (CV) $8,0 \times 10^{-6} - 5,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (VPD)	–	36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ VC 5,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ VPD	69
Colesterol	Octadecanotiol 1-fluoro-2-nitro-4-azidobenzeno	Sensor modificado pela reação nitreno do 1-fluoro-2-nitro-4-azidobenzeno, o qual liga-se covalente com o colesterol oxidase via reação térmica	50 a 500 mg dL^{-1}	–	50 mg dl^{-1}	93
Dopamina	3-3'-ditiodipropiônico	Sensor amperométrico	$0,35 \times 10^{-5} - 3,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$1,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	$1,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	105
Epinefrina	Ácido mercaptopropiônico, nanopartículas de ouro e cistamina	Sensor voltamétrico aplicado para determinação simultânea de epinefrina e ácido ascórbico e úrico em solução aquosa	0,1 – 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$	–	0,040 $\mu\text{mol L}^{-1}$	94
Frutose	4-mercaptopotetra-Tiafulvaleno	Biossensor eletroquímico	$2,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	$1,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	$2,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$	95

Glicose	Ácido 3-mercaptopropiônico, ácido 3-mercaptosuccínico, ácido tiodisuccínico	Sensor amperométrico, o eletrodo de ouro foi modificado por três tipos de ácidos mercaptocarboxílicos e imobilizado a enzima glicose oxidase	1,0 – 100 mmol L ⁻¹	–	–	56
H ₂ O ₂	Cisteamina e HRP	Sensor amperométrico, a enzima HRP foi imobilizada sobre a SAM pelo glutaraldeído	3 – 100 µmol L ⁻¹	8,4 mmol L ⁻¹	0,6 µmol L ⁻¹	55
NADH e AA	4-(6-mercaptopurin-9-ol)benzeno-1,2-diol	Sensor amperométrico, modificação pela reação eletroquímica da o-quinona sobre a SAM de 6-mercaptopurina	0,5 mmol L ⁻¹ NADH 3 mmol L ⁻¹ AA	1,982 µA/mmol L ⁻¹ NADH e 9,48 µA/mmol L ⁻¹ AA	100 nmol L ⁻¹ NADH e 25 nmol L ⁻¹ AA	96
Ferrugem de soja <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	Cisteamina e anticorpo anti-micélio	O anticorpo anti-micélio do fungo <i>Phakopsora pachyrhizi</i> (agente causador da doença) foi imobilizado em substrato de ouro via formação de monocamadas auto-organizadas de tióis e ligações covalentes com a biomolécula	0,35-3,5 µg mL ⁻¹ ,	292 Ωµg mL ⁻¹	385 ng mL ⁻¹	97
Proteína reativa C	Cistamina e anticorpo anti-PCR	Imunosensor, modificado pela interação do antígeno PCR com o anticorpo PCR (aPCR) imobilizado sobre a superfície eletródica	1,15×10 ⁻⁵ – 1.15 mg L ⁻¹	1,58×10 ⁻¹ (VPD) 8,60×10 ⁻² (CA)	4,7×10 ⁻⁷ (CA) 0,38 mg L ⁻¹ (VPD)	98
ssDNA	2-mercaptop benzotiazol	Biossensor, o eletrodo tem a habilidade de distinguir ssDNA e dsDNA	1,59×10 ⁻⁸ – 2,4×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	2,6062×10 ⁻⁸ mol L ⁻¹	2,38×10 ⁻⁹ mol L ⁻¹	90
Troponina cardíaca T	Carboximetildextrano e estreptavidina	Imunosensor, sensor SPR formado por SAM de estreptavidina terminal	0,03 – 6,5 ng mL ⁻¹	-	0,01ng mL ⁻¹	99

1.2.2.5 Aplicações das SAMs como sensores para a determinação da Dopamina

A Dopamina (DA) é uma das catecolaminas de ocorrência natural. É um composto importante para a transferência de impulsos no sistema nervoso central dos mamíferos. É um neurotransmissor sintetizado por certas células nervosas, que age em regiões do cérebro promovendo, entre outros efeitos, a sensação de prazer, além de desempenhar um papel determinante na regulação e controle do movimento, motivação e cognição. Anormalidades nos seus níveis estão associadas a muitas desordens psíquicas, tais como Parkinson [100] e esquizofrenia [101].

A determinação quantitativa do fármaco DA em fluidos fisiológicos [102] é de grande importância para diagnósticos, clínicos e bioquímicos. Devido à sua atividade eletroquímica, a DA também pode ser determinada por métodos eletroquímicos. Os métodos atuais para a detecção de DA são caros e necessitam preparo da amostra, já as técnicas eletroquímicas têm atraído grande interesse em muitos casos, pois estas apresentam baixo custo, resposta rápida, além de possibilitar a obtenção de baixos limites de detecção [103].

No entanto, um grande problema freqüentemente encontrado na detecção eletroquímica de DA é devido a interferências graves causadas pelo ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (UA), que existem em fluídos do corpo em concentrações relativamente elevadas [104]. A determinação da DA em presença de AA usando métodos eletroquímicos é importante porque ambas as moléculas tendem a oxidar em potenciais próximos. O AA está presente *in vivo* com concentrações 10^2 e 10^3 maior que a dopamina. Assim, o desenvolvimento de técnicas de monitoramento seletivo da dopamina tem sido o foco de muitas pesquisas.

Monocamadas de ácido 3,3-ditiodipropriônico (DTDPA) sobre o eletrodo de ouro foram utilizadas por Codognoto *et al* [105] para determinação da dopamina (DA). Este sensor foi utilizado para determinar quantitativamente a DA em formulações farmacêuticas, apresentando boa faixa linear. A corrente de pico anódica para DA aumentou linearmente na faixa de $0,35 \times 10^{-5}$ a $3,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e o limite de detecção foi de $1,1 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. O eletrodo modificado Au-DTDPA mostrou um comportamento estável e a presença de grupos COOH na superfície evitou a passivação do eletrodo durante a oxidação da dopamina.

Dentro desse contexto, Li *et al* [106] fabricaram um eletrodo de ouro modificado com a monocamada de D,L-cisteína, a qual foi imobilizada o ácido β -ciclodextrina sulfônico (CIS- β -CD-SO₃) para investigar o comportamento eletroquímico da dopamina. Os resultados experimentais indicaram que o eletrodo apresentou resposta eletroquímica seletiva para dopamina, com alta sensibilidade e excelente tolerância de ácido ascórbico. A dopamina pode ser determinada com precisão na faixa de concentração de 1 a 200 μ mol L⁻¹ na presença de ácido ascórbico de 5 mmol L⁻¹. O desvio padrão relativo de 1,9% (n = 5) foi obtido na concentração de dopamina, de 5×10^{-5} mol L⁻¹. O sensor proposto foi aplicado com sucesso na determinação de dopamina em amostras de soro sanguíneo.

Outra estratégia recentemente difundida na literatura consiste na utilização de enzimas imobilizadas sobre monocamadas para a determinação da dopamina. Um dos exemplos desta aplicação pode ser demonstrado no trabalho de Moccelini *et al* [107], os quais imobilizaram a peroxidase do broto de feijão em um eletrodo de ouro modificado com SAM de L-cisteína para determinação de dopamina em amostras farmacêuticas usando a voltametria de onda quadrada. No eletrodo Au-SAM-broto de feijão, a peroxidase, na presença de peróxido de hidrogênio catalisa a oxidação

de dopamina para a correspondente quinona, que é eletroquimicamente reduzido novamente a dopamina. A curva analítica foi linear para as concentrações de dopamina de $9,91 \times 10^{-6}$ a $2,21 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e o limite de detecção foi de $4,78 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. A recuperação de dopamina variou 98,0 a 111,8% e desvio padrão relativo foi de 3,1% para uma solução contendo $1,30 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de dopamina (n = 6). A vigência deste biossensor foi de 15 dias (no mínimo 300 determinações).

1.3. Métodos de caracterização

As potencialidades eletroanalíticas da voltametria cíclica (VC), voltametria de onda quadrada (VOQ) e da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), bem como a importância de suas aplicações às investigações e caracterizações de processos superficiais e interfaciais estão intimamente ligadas ao desenvolvimento de métodos confiáveis [108, 109, 110]. Dentre as técnicas eletroquímicas, a EIE tem sido uma das mais utilizadas para caracterizar estruturas sobre ouro e na maioria das vezes possibilitando a determinação de propriedades gerais do filme fino tais como resistência à transferência de elétrons, capacitância, recobrimento, eletroatividade.

Neste contexto, o emprego combinado destas técnicas tem sido explorado com o propósito de fornecer informações complementares que possibilitem interpretações seguras sobre o sistema avaliado. A Tabela 2 simplifica as potenciais aplicações das técnicas.

Tabela 2 - Principais parâmetros e informações obtidos em aplicações das técnicas VC, VOQ, e EIE para a caracterização de SAM.

Potenciais aplicações das técnicas		
Técnica	Parâmetros	Informações
VC	Corrente anódica (oxidação) e catódica (redução); Potenciais anódicos e catódicos; Potencial de meia onda Limite de detecção; Equação da reta.	Sistema reversível, irreversível ou quase-irreversível; Processo difusional ou não difusional; Estabilidade do eletrodo; Determina os potenciais redox da espécie de interesse; Indícios sobre a formação da monocamada
VOQ	Potenciais de pico; Largura de meia altura da onda; Corrente de pico; Limite de detecção; Equação da reta.	Sistema reversível, irreversível ou quase-irreversível Excelente sensibilidade e alta rejeição a correntes capacitivas; Seletividade; Mecanismo e a cinética dos processos eletródicos de interesse; Adsorção de espécies;
EIE	Capacitância da dupla camada; Resistência à transferência de carga; Impedância de dupla camada; Resistência ao movimento das espécies; Impedância Warburg.	Passivação dos eletrodos; Adsorção de espécies; Ionização de adsorbatos; Difusão de íons em membranas; Estrutura de monocamadas; Constante de transferência de elétrons direta e reversa.

1.3.1 Caracterização pelas Técnicas Eletroquímicas

Atualmente, existem diversas técnicas de voltametria que são utilizadas pelos químicos inorgânicos, físico-químicos e bioquímicos para fins analíticos. Entre os exemplos de técnicas voltamétricas, pode-se citar a voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada, entre outras.

Nos próximos itens, estão descritos os princípios básicos das técnicas eletroquímicas utilizadas para a caracterização das SAMs neste trabalho, são elas: a voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e a espectroscopia de impedância eletroquímica.

1.3.1.1 Voltametria cíclica (VC)

A voltametria cíclica uma das técnicas mais amplamente utilizada para a aquisição de informações qualitativas sobre reações eletroquímicas envolvendo SAM. A VC é selecionada como a técnica inicial para investigar um sistema que envolve espécies eletroativas [111], sendo empregada em diagnósticos e estudos fundamentais para a obtenção de informações qualitativas de processos eletroquímicos [81, 112]. A VC fornece rapidamente as informações importantes sobre a termodinâmica do processo redox na cinética das reações heterogêneas de transferência de elétrons, e juntamente reações químicas ou processos de adsorção [113].

Os métodos voltamétricos baseiam-se na medida da corrente em função do potencial aplicado a um eletrodo, sob condições de completa polarização de concentração [114]. A Figura 14 ilustra a resposta de um par redox reversível durante um único ciclo de potencial. O gráfico de corrente versus o potencial é chamado de voltamograma cíclico. A partir deste é possível obter os principais

parâmetros de análise, sendo estes os valores de potenciais de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}), além das correntes de pico anódica e catódica I_{pa} e I_{pc} respectivamente [113].

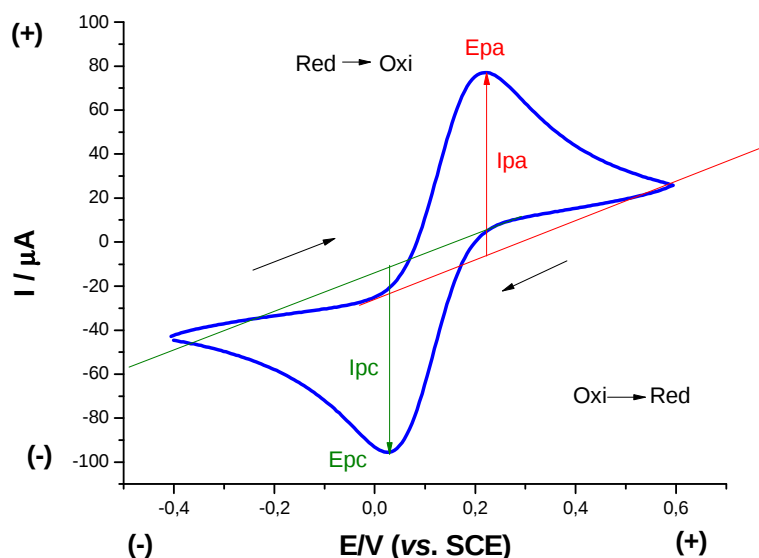


Figura 14 - Voltamograma cíclico típico de espécies redox em solução e os principais parâmetros obtidos a partir do mesmo.

A caracterização de defeitos em SAM através da voltametria cíclica é bastante utilizada, monitorando as mudanças na transferência de elétrons das moléculas sondas redox na presença da monocamada [115]. Para os estudos voltamétricos utilizam-se as moléculas sondas, tais como os complexos $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ [116], $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ [117] e a metaloproteína citocromo c [118], devido apresentarem rápida reação de transferência de elétrons. Utilizando-se como eletrodos de trabalho os substratos modificados, é possível deduzir algumas propriedades químicas e físicas dos EQM, por meio de análise dos voltamogramas na presença das moléculas sonda, as quais possuem variados tamanhos, carga iônica e constante de velocidade heterogênea de transferência de elétrons (k^0) exatamente determinadas [119].

A corrente de pico em VC é diretamente proporcional à concentração do analito, apesar disso, ela não é normalmente empregada em trabalhos de rotina analítica devido a sua baixa sensibilidade em relação a outras técnicas voltamétricas, entretanto ocasionalmente é encontrada aplicação deste tipo na literatura científica [96]. Um exemplo desta aplicação quantitativa da VC consiste na determinação da dopamina pelo eletrodo de ouro modificado com ácido tioláctico. Neste trabalho, a dependência da corrente de pico com a concentração de DA apresentou uma relação linear na faixa de $4,0 \times 10^{-5}$ a $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, e o limite de detecção encontrado foi de $3,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ [120].

Raoof *et al* [69] utilizaram a técnica de VC e voltametria de pulso diferencial (VPD) para a determinação da cisteamina utilizando um eletrodo de ouro modificado com o ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfônico (Au-Nq). A corrente de pico anódica aumentou linearmente com a concentração de cisteamina em solução sobre a superfície do eletrodo Au-Nq. Sob condições otimizadas as correntes de pico da VC e VPD foram linearmente relacionadas com as concentrações de cisteamina no intervalo de $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ a $4,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e $8,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a $5,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, respectivamente. Os limites de detecção foram determinados como 36 µmol L⁻¹ e 5,2 µmol L⁻¹ por VC e VPD. Recuperações aceitáveis e reprodutíveis foram obtidas para este eletrodo.

Sousa *et al* [68] utilizaram a VC para a caracterização eletroquímica da formação da monocamada sobre a superfície eletródica, a qual pode ser acompanhada através dos voltamogramas cíclicos obtidos após diferentes tempos de imersão do eletrodo de ouro na solução etanólica de 1,4-ditiano. A partir dos dados obtidos, verificaram um decréscimo dos parâmetros cinéticos da molécula sonda com o aumento do tempo de imersão, sugerindo que o mecanismo de

adsorção para esta molécula ocorre lentamente, o qual é responsável pela configuração do modificador sobre a superfície.

1.3.1.2 Voltametria de Onda Quadrada

Entre as técnicas voltamétricas de pulso, a voltametria de onda quadrada (*square wave voltammetry*) destaca-se pela maior rapidez na análise, redução de problemas relacionados ao bloqueio da superfície do eletrodo e menor consumo de espécies eletroativas em relação à voltametria de pulso diferencial [121]. Por apresentar bons limites de detecção é comparada as técnicas cromatográficas e espectroscópicas [122].

Na VOQ uma onda simétrica de potencial de amplitude (ΔE_p ou a – amplitude de pulsos) sobreposta a uma rampa de potencial em forma de escada caracterizada pelo potencial de largura (ΔE_s - incremento de varredura de potenciais) e de duração 2τ (período) é aplicado ao eletrodo de trabalho [108], como representado na Figura 15. Na curva de potencial-tempo, a largura do pulso ($\tau/2$) é chamada t e a frequência de aplicação dos pulsos é chamada de f e é dada por $(1/t)$. O voltamograma resultante consiste da diferença entre estas duas rampas destacadas na Figura 15.

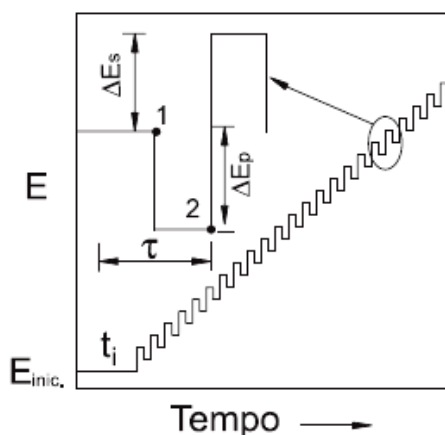


Figura 15 - Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada, onde ΔE_p – amplitude de pulsos, ΔE_s - incremento de varredura de potenciais, f – frequência, 2τ – período. [108].

A Figura 16 ilustra o gráfico de corrente versus o potencial aplicado e estão representados os principais parâmetros que podem ser obtidos a partir do mesmo: o pico da corrente resultante (I_p) que é definido por um máximo de corrente, onde são considerados os potenciais de pico (E_p) no valor do máximo de I_p e a largura de meia altura da onda de redução e/ou oxidação ($\Delta E_p/2$).

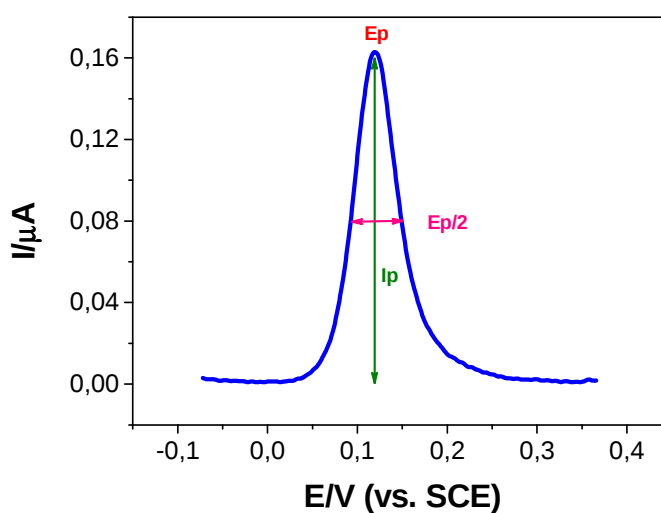


Figura 26- Voltamograma de VOQ com seus principais parâmetros obtidos a partir do pico resultante, onde I_p – corrente de pico, E_p – potencial de pico e $\Delta E_p/2$ - largura de meia altura da onda de redução e/ou oxidação.

Esta técnica apresenta excelente sensibilidade decorrente da diminuição das correntes capacitivas e aumento das correntes faradaicas, uma vez que as medidas de corrente são realizadas ao final do degrau de potencial onde a corrente capacitiva já se tornou negligenciável, melhorando assim a resolução dos dados experimentais e conseqüentemente a sensibilidade analítica.

As determinações analíticas empregando esta técnica podem ser feitas em concentrações tão baixas como 10 nmol L^{-1} . Por causa desta sensibilidade e rapidez ela é útil para a análise de drogas em suas formas farmacêuticas e amostras biológicas, devido aos limites de detecção baixos e determinação em análise de traços [123]. Sun [124] *et al* em seus estudos imobilizaram através de monocamadas auto-organizadas de 3-amino-5-mercaptop-1,2,4-triazol (TA) sobre eletrodos de ouro. Este eletrodo foi utilizado para a determinação de epinefrina, utilizando a técnica de VOQ obtendo boa relação linear entre a I_{pc} e a concentração de epinefrina (EP) nas faixas de $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-5}$ a $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, com limite de detecção de $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, segundo a Figura 17 de modo que o eletrodo é apto para a determinação quantitativa da EP em formulações farmacêuticas.

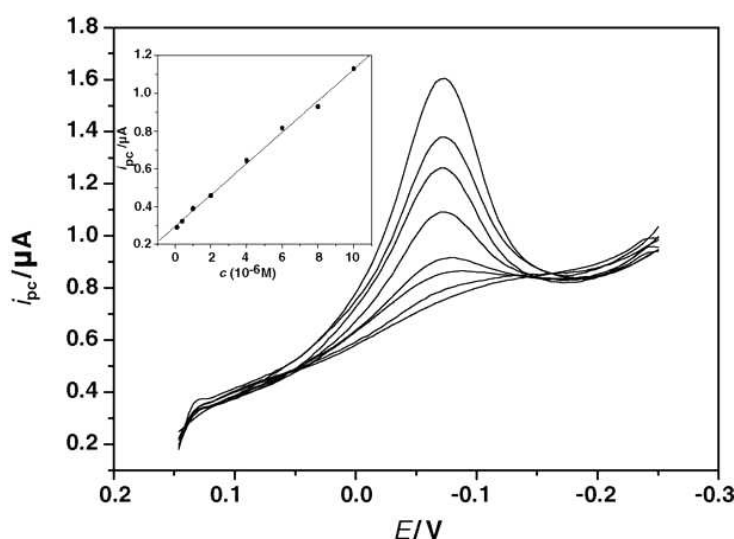


Figura 17 – VOQ de diferentes concentrações de EP $0.1, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, utilizando o eletrodo de Au-SAM-TA. Gráfico inserido: relação linear entre I_p e a concentração de EP.

1.3.1.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A EIE tem sido amplamente aplicada, com os mais variados propósitos, para estudos da cinética do eletrodo [125], estudos de dupla camada, processos em baterias, investigação sobre processos de corrosão [126], eletroquímica em estado sólido, e bioeletroquímica [111, 127].

Esta técnica envolve a aplicação de uma perturbação de potencial ou de corrente no sistema sob investigação. A perturbação do sistema é feita mediante a aplicação de um potencial contínuo sobre a qual é superimposta uma variação senoidal de potencial com pequena amplitude. Além disto, é possível perturbar o sistema usando diferentes valores de frequência. Uma vez que a perturbação no sistema sob investigação é de pequena amplitude é possível empregar a técnica para a análise de etapas de reação [128].

O conceito de impedância, originalmente introduzido para descrever a resposta de sistemas compostos por capacitâncias, resistências e indutâncias, estendeu-se aos sistemas eletroquímicos, uma vez que inúmeros processos podem contribuir para a relação entre a corrente e o potencial do sistema. A obtenção de informações a partir dos dados de impedância eletroquímica pode ser conduzida mediante a utilização de diferentes modelos de medida, como circuitos equivalentes ou modelos matemáticos. Uma representação comum para a impedância em sistemas compostos por resistores e capacitores é através de um diagrama de fasores no qual a impedância apresenta uma componente real (resistiva) e imaginária (capacitiva).

Conforme pode ser observado na Figura 18, na região de altas frequências a componente real da impedância tende a R_s enquanto que nas regiões de baixa frequência tende a $R_s + R_{ct}$. Ao avaliar este comportamento é possível inferir como

obter informações sobre a resistência da solução na região de altas frequências e na região de baixas frequências sobre os processos de eletrodo (resistência à transferência de carga). Obtém-se a relação entre a componente imaginária e a componente real da impedância, conforme apresentado a seguir:

$$\left(Z' - R_s - \frac{R_{ct}}{2} \right)^2 + Z''^2 = \left(\frac{R_{ct}}{2} \right)^2 \quad (\text{eq. 1})$$

Onde Z' – componente real, Z'' – componente imaginária, R_s – resistência da solução, R_{ct} – resistência à transferência de carga. Pode ser verificado na expressão anterior que um gráfico de Z'' em função de Z' resulta num comportamento circular com raio de $R_{ct}/2$ e centro em $Z' = R_s + R_{ct}/2$ e $Z'' = 0$. Neste contexto, a representação gráfica Z'' (componente imaginária da impedância) vs Z' (componente real da impedância), também denominado diagrama de Nyquist, Argand, Sluyters ou gráfico de Cole-Cole (Figura 18) pode fornecer informações sobre as possíveis naturezas dos elementos que constituem a impedância total do sistema.

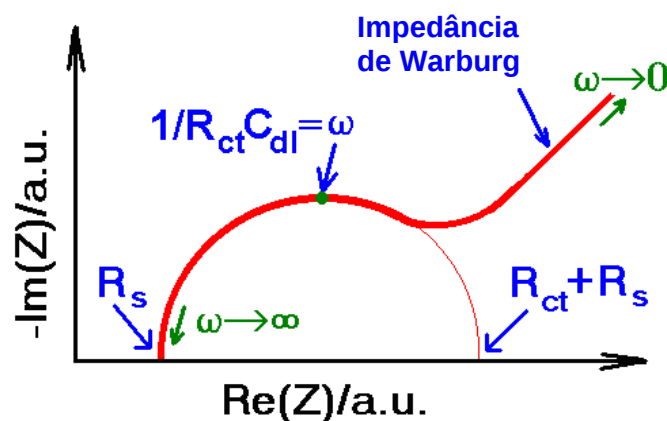


Figura 18 - Diagrama de impedância (diagrama de Nyquist).

Adicionalmente, representações de $\log |Z|$ ($|Z|$ - módulo da impedância) e ϕ (ângulo de fase) vs $\log \omega$ (ω - frequência), chamadas de curvas de Bode, são de grande importância para a interpretação de dados provenientes da EIS, pois as informações obtidas a partir destes gráficos podem ser complementares às obtidas no diagrama de Nyquist.

Desta forma, os efeitos da transferência de carga (R_{ct}), da dupla camada elétrica (C_d), bem como os efeitos da solução sobre a migração de íons, podem ser obtidos mediante a avaliação de diagramas de Nyquist e curvas de Bode. Adicionalmente, nos sistemas que apresentam efeitos significativos da impedância à transferência de massa (Z_{tm}) a introdução de um elemento denominado “impedância Warburg” é feita com o propósito de simular as características do sistema experimental, tanto em processos que sofrem difusão linear, esférica ou sob convecção forçada [129].

Mendes *et al* [130] estudaram o comportamento entre tióis de cadeias carbônicas com tamanhos diferentes e contendo o grupo terminal COOH na formação de SAM sobre a superfície de eletrodos de ouro (ácido mercaptoacético, MAA; ácido 3-mercaptopropiônico, MPA; ácido mercaptobenzóico, MBA; ácido mercaptoundecanóico, MUA). Utilizando a técnica EIE determinou a variação da resistência de transferência de carga (R_{ct}) e a constante velocidade aparente (K_{app}) variando o comprimento da cadeia alquila e o pH da solução, conforme Figura 19. Mudanças no pH da solução resultaram em variações na carga do grupo terminal das SAM e, conseqüentemente, em alterações na interação eletrostática da SAM com as espécies eletroativas em solução. A R_{ct} aumentou com o tamanho da cadeia alquila, porque as cadeias longas tornam-se mais espessas. Os autores verificaram que em pH elevado, o R_{ct} é maior devido à força de repulsão entre o par redox

$\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ e a monocamada. Para K_{app} o efeito é inverso e diminui com o aumento da cadeia alquila, uma vez que cadeias longas tornam a transferência de elétrons mais difícil. Foi também observado que para os compostos aromáticos, tais como o MBA a transferência eletrônica comparada aos outros tióis foi facilitada devido à propriedade de ressonância que estes compostos possuem.

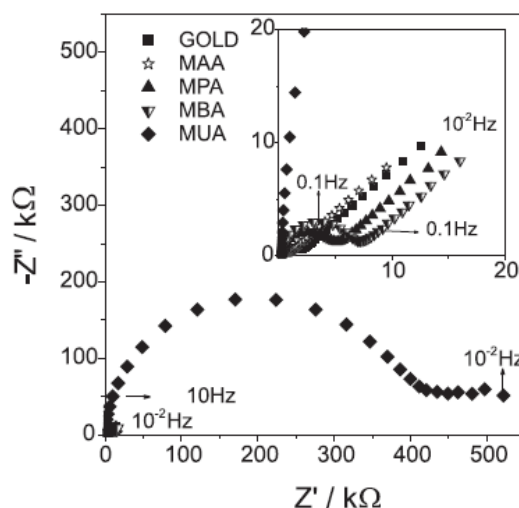


Figura 19 – Diagrama de Nyquist para 5 mmol L^{-1} de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ em solução KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ usando Au-SAM em pH 8,0, frequência de 0,01 a 10 KHz [130].

Neste contexto de investigação de parâmetros cinéticos e de cobertura de superfície de cada camada, Ribaut *et al* [131] relataram, pela primeira vez, uma estratégia para imobilizar eritrócitos em um transdutor de ouro de uma forma reproduzível através da sobreposição de camadas ligadas entre si por ligações covalentes ou eletrostáticas. Os eritrócitos foram imobilizados a partir da reticulação de um antígeno/anticorpo com base na colagem de anti-D com o antígeno correspondente da membrana celular das células vermelhas sanguíneas (RBC), segundo Figura 20.

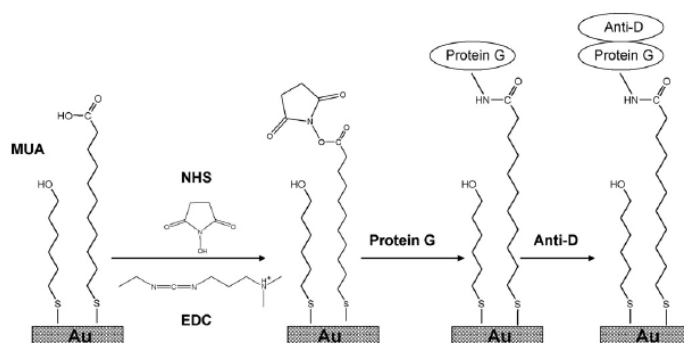


Figura 20 - Estratégia para a imobilização das células vermelhas sanguíneas sobre os carboxilatos terminais das SAM sobre o ouro. Adição de NHS e carbodiimida EDC solúvel em água na sobre a SAM para a formação do éster NHS [131].

Cada camada depositada foi caracterizada, primeiramente por uma microbalança de cristal de quartzo (MCQ) e então medidas de EIE foram efetuadas para determinar os parâmetros cinéticos e cobertura da superfície de cada camada usando um par redox como sonda ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$).

Medidas de EIE e posterior modelagem com circuitos adequados permitiram o cálculo dos valores dos componentes que representam a interface (eletrodo/filme/solução) em cada etapa do processo de montagem. EIE mostrou que os valores para os diferentes elementos do circuito equivalente variaram de acordo com a camada. Assim, este eletrodo modificado pode ser considerado como um sensor de RBC da interface/solução. As células vermelhas do sangue estão envolvidas em numerosas doenças, e este sensor poderá fornecer informação úteis sobre o seu comportamento em várias situações, tais como o stress ou invasão por agentes patogênicos. Com efeito, após o estresse, ocorre à liberação dos pares redox (radicais livres, por exemplo) e variações nos processos de transferência de massa e de transferência de carga são esperados. Da mesma forma, as variações na capacitância podem ser esperadas após invasão.

1.4 Delimitação do problema

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos desperta grande interesse na comunidade científica, o qual pode ser comprovado pela quantidade crescente de publicações sobre esse tipo de sensor [25]. Estes têm sido aplicados na determinação de diversas espécies de interesse farmacológico, ambiental e clínico. Existem inúmeras vantagens destes eletrodos modificados em relação aos eletrodos convencionais, sendo a principal delas a possibilidade de controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução, proporcionando uma variedade de efeitos atrativos e levando os eletrodos com características que podem contornar efetivamente muitos dos problemas apresentados pelos sensores eletroquímicos tradicionais, tal como a passivação da superfície.

A modificação pelos filmes finos nanoestruturados têm sido vastamente explorada em diferentes áreas, tais como ambiental, industrial, farmacêutica. A montagem destes é essencial para o desenvolvimento de dispositivos moleculares e sensores devido suas características importantes, tais como grande área superficial e reduzido tamanho de partícula, características que podem beneficiar certas propriedades ou mesmo modificar o mecanismo de ação em determinadas aplicações.

O desenvolvimento deste trabalho deu-se pela necessidade de investigar as potencialidades da utilização de sistemas auto-organizados, visando à melhoria das propriedades apresentadas por estes materiais, na construção de uma ferramenta analítica com características vantajosas em relação àquelas existentes aos eletrodos convencionais, de modo a proporcionar a obtenção de sensores eletroanalíticos mais seletivos e sensíveis. A relevância de sistemas baseados em reagentes imobilizados reside na minimização da quantidade de reagente necessária para uma

análise em particular, o que redundará em custos baixos, metodologias analíticas simples. Sendo as SAMs superfícies com características eletroquímicas vantajosas comparadas ao eletrodo de ouro convencional, esses filmes poderão ser aplicados como um possível sensor para detecção de espécies, tais como a Dopamina.

2.0 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral o estudo das melhores condições na preparação das diferentes monocamadas auto-organizadas sobre eletrodos de ouro e a sua influência na presença do analito. Para atingir o objetivo proposto as seguintes etapas serão realizadas:

- ✓ Preparação dos eletrodos modificados a partir da formação de monocamadas utilizando-se diferentes tióis propostos: ácido 3-mercaptopropiônico, MPA; ácido tioláctico, TLA; ácido mercaptoundecanóico, MUA e cistamina, CYS.
- ✓ Avaliar as melhores condições para obtenção das monocamadas, a partir da determinação do melhor tempo de imersão, pH do meio e velocidade de varredura.
- ✓ Caracterizar os eletrodos modificados com SAM dos diferentes tióis, investigar o comportamento eletroquímico do par redox através do bloqueio da superfície modificada determinando os possíveis defeitos. Neste estudo será utilizada como molécula sonda o ferricianeto de potássio $K_3[Fe(CN)_6]$ através da técnica de voltametria cíclica e de espectroscopia de impedância eletroquímica
- ✓ Aplicação dos diferentes eletrodos preparados sob condições otimizadas na detecção de espécies de interesse farmacológico, tais como a dopamina, utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada.

3.0 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados nos experimentos são de pureza analítica (PA) e foram utilizados sem purificação prévia. Na Tabela 3, são apresentadas as procedências dos mesmos e suas respectivas purezas. Todas as soluções foram preparadas em água deionizada ou destilada.

Tabela 3 - Procedência e pureza dos reagentes utilizados.

Reagentes	Fórmula química	Procedência	Pureza
Ácido acético	$C_2H_4O_2$	Vetec	99,7%
Ácido bórico	H_3BO_3	Vetec	99,5%
Ácido L(+) ascórbico	$C_6H_8O_6$	Vetec	99,0%
Ácido o-fosfórico	H_3PO_4	Synth	85,0%
Ácido 3-mercaptopropiônico	$HSCH_2CH_2COOH$	Sigma-Aldrich	99,0%
Ácido 11-mercaptoundecanóico	$HS(CH_2)_{10}COOH$	Aldrich	99,0%
Ácido sulfúrico	H_2SO_4	Vetec	99,0%
Ácido tioláctico	$CH_3CH(SH)COOH$	Sigma-Aldrich	95,0%
Álcool etílico	C_2H_6O	Vetec	99,8%
Cloreto de sódio	$NaCl$	F.Maia	99,0%
Dihidrocloreto de Cistamina	$C_4H_{12}N_2S_2 \cdot 2HCl$	Sigma-Aldrich	-
Dopamina	$C_8H_{11}NO_2$	Sigma	-
Ferricianeto de potássio anidro	$K_3[Fe(CN)_6]$	Vetec	99,0%
Ferrocianeto de potássio trihidratado	$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$	Vetec	98,5%

Fosfato de sódio dibásico anidro	Na_2HPO_4	Vetec	99,0%
Fosfato de sódio monobásico anidro	NaH_2PO_4	Vetec	99,0%
Hidróxido de sódio	NaOH	F. Maia	97,0%
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	Vetec	30,0%

3.2 Limpeza da superfície do ouro

A limpeza do eletrodo de ouro policristalino é um passo crítico e importante para a formação da SAM o qual deve ser acompanhado sistematicamente, submetido a um protocolo de pré-tratamento. O procedimento de pré-tratamento mecânico consistiu no polimento manual dos eletrodos de ouro, com solução de alumina 0,5 μm até que a superfície adquirisse um aspecto espelhado. Após, os eletrodos foram enxaguados e sonicados em água deionizada e etanol durante 5 minutos para a remoção de partículas residuais de alumina na superfície.

O pré-tratamento químico consistiu na imersão do eletrodo de ouro em solução piranha (1:3 mistura de H_2O_2 30% - H_2SO_4), durante 10 minutos. Esta mistura é extremamente exotérmica e atinge temperaturas próximas a 80°C nas condições utilizadas. Posteriormente os eletrodos foram enxaguados e sonicados em água deionizada e etanol durante 1 minuto.

O pré-tratamento eletroquímico foi realizado aplicando-se 100 varreduras sucessivas entre os potenciais redox do ouro (no intervalo de 0,2 V a 1,6 V vs SCE) em solução aquosa de 0,5 mol L^{-1} de H_2SO_4 em 50 mV s^{-1} . Na etapa final, realizou-se a imersão do eletrodo de ouro em etanol, durante 30 minutos, para garantir a redução de algum possível contaminante e assim melhorar a superfície para a posterior quimissorção.

3.3 Formação da SAM na superfície eletródica

A quimissorção da SAM é realizada a partir de soluções alcoólicas sobre superfícies oxidadas de ouro. Baseando-se nos fatores que influenciam nas propriedades dos eletrodos de Au modificados, foram realizados os estudos do tempo de imersão da solução tiol.

A adsorção do tiol sobre a superfície eletródica foi realizada mergulhando-se o eletrodo de ouro limpo na solução recém preparado do respectivo tiol, conforme Figura 21, com concentração 10 mmol L^{-1} em etanol por durante diferentes tempos de imersão 10 min, 30 min, 1 h, 3 h e 24 h. Após este período, o eletrodo foi enxaguado com etanol e água antes de ser usado nos experimentos.

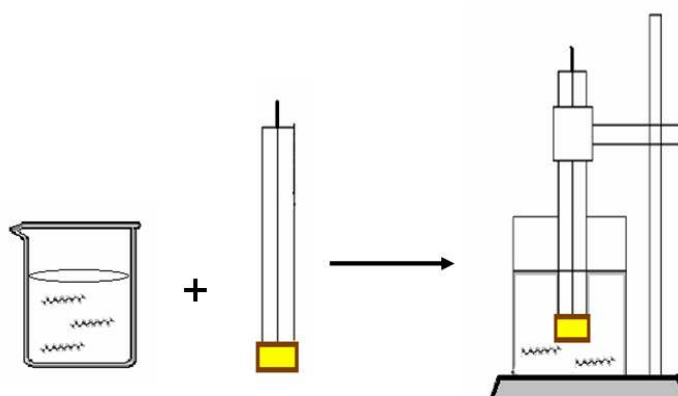


Figura 21 - Representação esquemática da imersão do substrato para formação da monocamada.

As seguintes moléculas foram utilizadas para a modificação da superfície: ácido 3-mercaptopropiônico (MPA), ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA), ácido tioláctico (TLA) e cistamina (CYS), cujas estruturas estão mostradas na Figura 22.

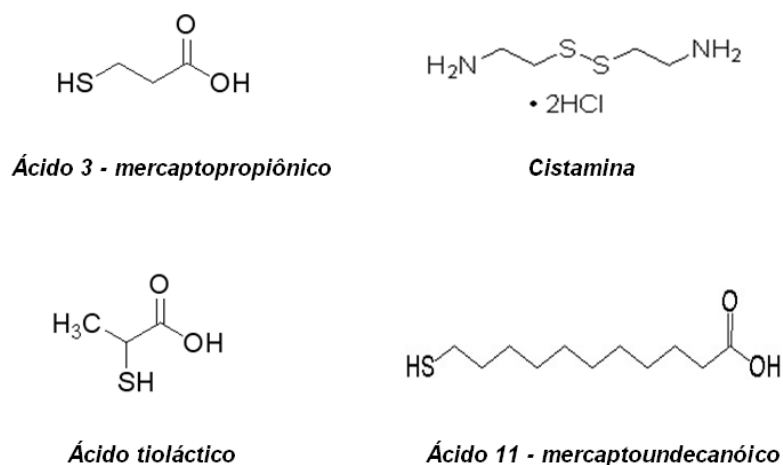


Figura 22 – Moléculas utilizadas no estudo da formação das SAMs.

Foi utilizado o programa GAUSSIAN 03 e o MOLEKEL 5.3 para desenhar as estruturas e os mapas de potencial eletrostático das cadeias de tióis, utilizadas na preparação das monocamadas.

3.4 Estudos Eletroquímicos

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em temperatura ambiente, utilizando uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos: eletrodo de Platina como contra eletrodo (área geométrica = 0,5652 cm²), eletrodo de calomelano saturado (SCE) como referência e o eletrodo de ouro policristalino como eletrodo de trabalho. A área geométrica do eletrodo de ouro policristalino foi de 0,0401 cm².

3.4.1 Estudos pela Voltametria cíclica

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato Palm Sens conectado a um microcomputador para a aquisição dos dados. As respostas eletroquímicas de potenciais e correntes de pico foram obtidas pela técnica de VC,

na presença de 10 mL de ferricianeto de potássio ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) em meio ao eletrólito suporte (PBS - tampão fosfato salino $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,0 e BR - tampão Britton-Ronbinson), contidos na célula eletroquímica.

Para a caracterização dos eletrodos pela VC a faixa de potencial estudada foi de -0,2 a 0,6 V e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Para os estudos de otimização da velocidade, esta foi variada na faixa de 10 a 250 mV s^{-1} .

Nos estudos para a determinação da área ativa e fator de rugosidade, a faixa estudada foi de -0,2 a 1,6V, velocidade de varredura 50 mV s^{-1} em solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Para a determinação do excesso superficial das diferentes SAMs a faixa de potencial utilizada foi de -1,4 a 0,2 V, em solução NaOH e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Nos estudos qualitativos do comportamento dos eletrodos na presença do analito (dopamina $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) foram conduzidos pelas soluções tampões. A faixa de potencial estudada foi de -0,2 a 0,6 V e a velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . As soluções estoques dos analitos foram todas recém preparadas na concentração de $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ para a realização dos estudos eletroquímicos.

3.4.2 Estudos pela Voltametria de onda quadrada

As medidas de VOQ também foram realizadas em um potenciostato Palm Sens conectado a um microcomputador para a aquisição dos dados. Nos estudos quantitativos utilizou-se apenas o eletrodo Au-TLA para a determinação do analito. Para a realização dessas medidas adicionaram-se 10 mL de eletrólito suporte (PBS), sob agitação, a qual era desligada e após registrado o voltamograma. Após a otimização do sistema, as curvas analíticas foram obtidas pela adição de alíquotas

da solução padrão na célula eletroquímica, numa faixa de potencial de -0.1 a 0,6 V vs. SCE na presença da Dopamina.

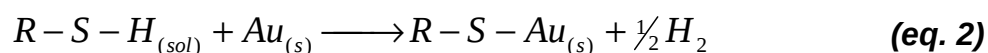
3.4.3 Estudos pela Espectroscopia de impedância eletroquímica

As medidas de EIE foram realizadas no potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT, conectado ao um microcomputador e controlado pelo software FRA, o qual foi utilizado para aquisição e análise dos dados de impedância. Utilizou-se no modo potenciostático, sendo o potencial fixado a 200 mV, a amplitude de voltagem senoidal de 10 mV, e a faixa de frequência de 10 KHz a 100 mHz.

Utilizou-se como eletrólito suporte 10 mL de solução PBS 0,1 mol L⁻¹, ajustado em pH = 7,0 na presença do complexo [Fe(CN)₆]^{-3/-4} (0,008 mol L⁻¹).

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de obtenção das monocamadas ordenadas de compostos a base de enxofre sobre a superfície do eletrodo de ouro, é de grande interesse, por razões fundamentais e práticas [132]. A técnica é simples e não requer equipamentos onerosos, como discutidos anteriormente. A quimissorção ocorre espontaneamente quando se adiciona o substrato à solução contendo o grupo tiol. A reação química que representa a quimissorção de um tiol em uma superfície metálica de ouro é considerada como uma reação de adição oxidativa do grupo tiol seguido de uma posterior eliminação redutiva do hidrogênio, como mostra a equação 2.



Estas monocamadas mostram, em geral, um bom grau de organização, compactação e estabilidade como resultado do grupo cabeça da molécula tiol, o enxofre, o qual é ligado ao ouro via uma ligação covalente Au-S extremamente forte e estável. Os grupos funcionais na outra extremidade da molécula controlam as propriedades da superfície do eletrodo [25].

As monocamadas auto-organizadas (SAMs) neste trabalho foram preparadas por diferentes estruturas de tióis, variando o tamanho e arranjo da cadeia carbônica e do grupo terminal. Variações dos grupos terminais das monocamadas determinam o comportamento químico da superfície modificada, que é essencial na determinação de novas interfaces com propriedades interessantes. Foram selecionadas para este trabalho, moléculas derivadas de enxofre,

freqüentemente citadas na literatura [55, 77, 130], tanto com grupos terminais carboxílicos (MPA, MUA e TLA) como com o grupo amina (CYS).

4.1 Caracterização do eletrodo ouro policristalino sem modificação

A estabilidade e reprodutibilidade das SAMs são dependentes das condições de superfície. Conseqüentemente, a limpeza da superfície do substrato é um dos parâmetros mais importantes na formação de monocamadas com alta reprodutibilidade e com o mínimo de defeitos. Portanto, esta deve ser vigorosa para não afetar a cinética de formação das SAMs.

Seguiu-se inicialmente um protocolo de pré-tratamento proposto por Carvalho *et al* [57], a qual avaliou três diferentes técnicas de limpeza para o ouro policristalino: mecânica, química e eletroquímica. O tratamento mecânico com alumina remove os materiais orgânicos contaminantes adsorvidos e forma uma camada de óxidos de ouro sobre a superfície do metal. O tratamento químico tem como objetivo remover a fina camada de óxidos de ouro ou remover materiais inorgânicos adsorvidos. A etapa de tratamento eletroquímico consiste em diminuir a rugosidade e/ou ativar a superfície eletródica. Para intensificar a limpeza da superfície deixou-se o eletrodo imerso em etanol, o qual tem a finalidade de reduzir quimicamente possíveis contaminantes que tenham permanecido na superfície do ouro nas etapas anteriores.

Voltamogramas cíclicos foram obtidos a 50 mV s^{-1} em solução H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para o eletrodo de ouro limpo como mostra a Figura 23. A varredura anódica não apresenta corrente faradaica até atingir aproximadamente o potencial $1,0 \text{ V}$, mostrando apenas a região de dupla camada elétrica. A partir deste potencial encontra-se a região de formação dos óxidos de ouro pela incorporação do oxigênio

originado da camada de hidratação na faixa de potencial aproximadamente de 1,0 V, na qual se observa a formação de mais de um pico de oxidação, referente aos diferentes óxidos de ouro (AuO , Au_2O_3). Na varredura catódica, o óxido de ouro é reduzido na faixa de potencial de 0,9 V a 0,7 V (em aproximadamente 0,85 V) e, posteriormente, segue a região de dupla camada elétrica até o final da varredura [56].

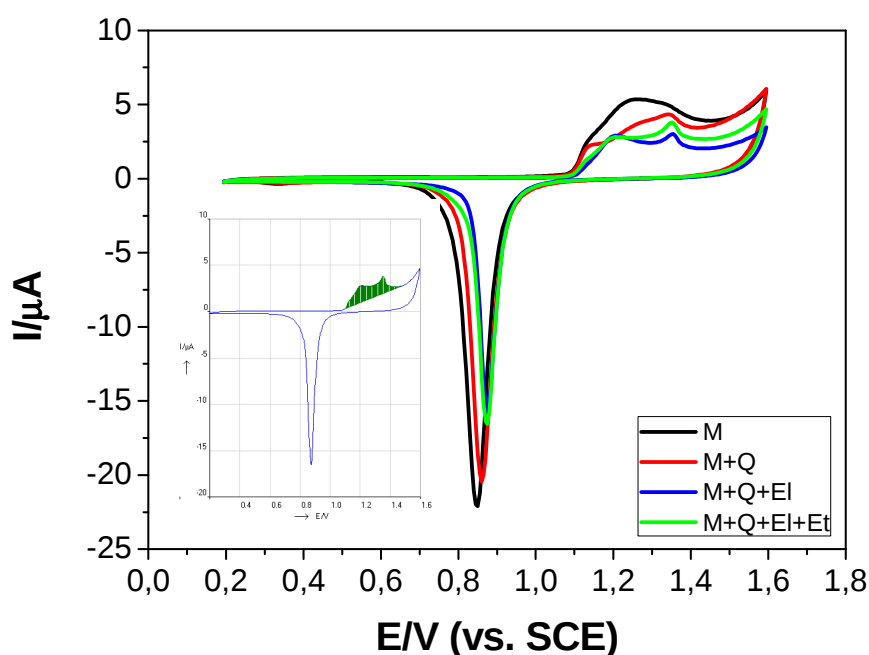


Figura 23 - Voltamogramas cíclicos dos diferentes procedimentos de pré-tratamento sobre superfícies de ouro: M – mecânico, Q – químico, EI – eletroquímico e Et – etanol. Eletrólito suporte: H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} , velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . Gráfico inserido: área de formação do óxido de ouro, utilizada para o cálculo da carga do processo de adsorção.

A eficiência de cada pré-tratamento (mecânico, químico, eletroquímico e etanol) foi acompanhada pela oxidação e redução do ouro em solução ácida, como mostra a Figura 23. A área eletroquimicamente ativa do eletrodo de ouro pode ser calculada através da medida baseada na adsorção de oxigênio da solução, as quais foram medidas quantitativamente pela área pico de formação do óxido, conforme

Figura 23, gráfico inserido. Este método é aplicável à platina e ouro [9], devido a regiões bem estabelecidas de formação e redução de óxidos.

A carga (Q) do processo de adsorção foi obtida da razão entre a área referente ao processo de formação do óxido e a velocidade de varredura. Segundo a equação 3.

$$Q = \frac{\text{Área do pico (A.V)}}{v \text{ (V s}^{-1}\text{)}} \quad (\text{eq. 3})$$

Onde, Q a carga (A.s^{-1} ou C), área do pico (A.V) e v é a velocidade de varredura (V s^{-1}). Os valores de carga obtidos estão relacionados com a quantidade de oxigênio adsorvido. Segundo a literatura [73,133] uma carga de $390 \mu\text{C}$ corresponde a uma área de $1,0 \text{ cm}^2$ do eletrodo policristalino de ouro, para uma reação monoeletrônica. Utilizando esta relação, encontrou-se o valor para a área eletroquimicamente ativa (A_{ativa}) do eletrodo.

Baseando-se neste resultado, o fator de rugosidade f_x (equação 4) determinado como a razão entre as áreas eletroquimicamente ativa e geométrica foi calculado, caracterizando rugosidade microscópica. Este valor está de acordo com os trabalhos encontrados na literatura os quais variam entre 1,0 a 4,0 [119].

$$f_x = \frac{\text{área eletroquimicamente ativa}}{\text{área geométrica}} \quad (\text{eq. 4})$$

Os materiais policristalinos apresentam superfície onde a periodicidade da distribuição de átomos pode incluir diferentes defeitos, dependendo do procedimento empregado na preparação da superfície [61]. Deste modo, os resultados observados, segundo a Tabela 4, se devem a formação, durante o polimento

mecânico, de degraus, buracos e interrupções bruscas de planos cristalinos regulares, que são responsáveis por uma área microscópica maior que a área geométrica exibida pelo eletrodo.

Tabela 4 - Carga, área ativa e fator de rugosidade obtido pela área de adsorção do oxigênio pelos diferentes tratamentos de limpeza de superfície.

Pré-tratamento	Área de pico (A V)	Carga (C)	Área ativa (cm ²)	Fator de rugosidade f_x
M	$7,41 \cdot 10^{-7}$	$1,48 \cdot 10^{-5}$	0,152	3,78
M+Q	$4,64 \cdot 10^{-7}$	$9,28 \cdot 10^{-6}$	0,094	2,33
M+Q+EI	$4,16 \cdot 10^{-7}$	$8,32 \cdot 10^{-6}$	0,084	2,08
M+Q+EI+Et	$3,95 \cdot 10^{-7}$	$7,9 \cdot 10^{-6}$	0,081	2,01

A determinação da área superficial eletroquimicamente ativa bem como o fator de rugosidade é fundamental para a caracterização, e estão relacionadas à limpeza da superfície do eletrodo na resposta do sensor. Observou através dos dados da Tabela 4, que o eletrodo que recebeu somente o polimento mecânico, apresentou maior área ativa, no entanto com a menor reprodutibilidade na formação da monocamada, devido impurezas em sua superfície. Aplicando-se os demais procedimentos, verifica-se que a área ativa diminui gradativamente, tornando a superfície metálica ativa e livre de impurezas. O decréscimo na rugosidade microscópica por meio da aplicação do procedimento eletroquímico é creditado à formação e remoção dos óxidos de ouro da superfície durante o pré-tratamento [57]. Sendo assim, pode-se afirmar que o tratamento de limpeza neste estudo foi efetivo, pois se obteve uma maior área eletroquimicamente ativa (0,081 cm²) comparada a área geométrica (0,040 cm²), assim como uma diminuição do fator de rugosidade,

caracterizando rugosidade microscópica [134]. A rugosidade do polimento no eletrodo decresceu de um fator 1,77 quando o pré-tratamento M+Q+El+Et foi utilizado, o que está de acordo com os dados de Carvalho *et al* [57] onde o fator de decréscimo foi de 1,4. Fica evidente através dos dados obtidos pelos voltamogramas que o pré-tratamento apresentou boa reprodutibilidade, conforme mostra a Figura 24 na limpeza superficial confirmando a eficiência do processo. O desvio padrão da resposta da área ativa foi de 2,45% (S/N = 10) sendo de extrema importância para a formação de estruturas mais orientadas e organizadas com o mínimo de defeitos possíveis na obtenção do filme SAM.

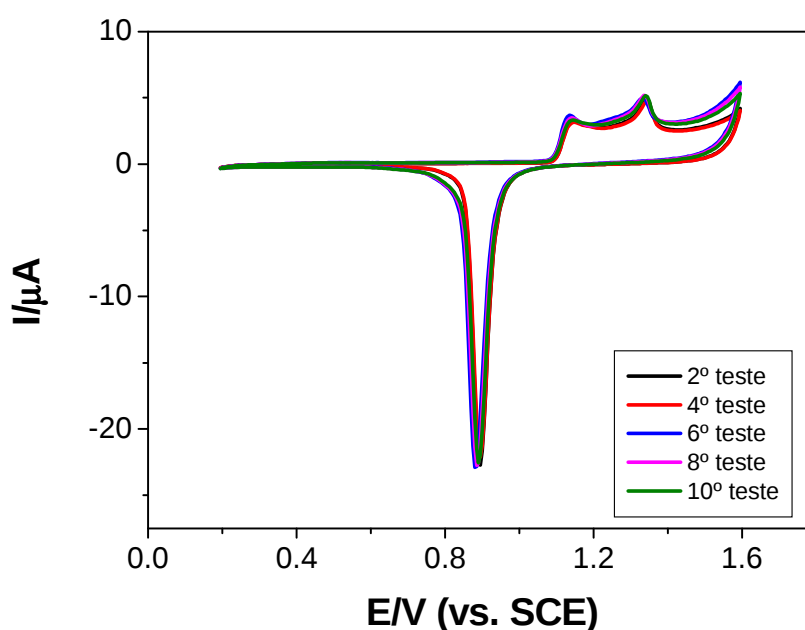


Figura 24 – Reprodutibilidade da limpeza superficial.

Nos estudos de caracterização do eletrodo é necessário definir a solução eletrolítica, na qual o eletrodo de trabalho apresente o melhor comportamento. O eletrólito suporte [135] tem ampla aplicação em processos de eletrodo e, a princípio, deve apresentar como propriedades, alta solubilidade, alto grau de ionização, estabilidade química e eletroquímica. Com relação às suas aplicações, verifica-se

que são bastante amplas: mantêm os coeficientes de atividade praticamente constantes, o número de transporte da espécie eletroativa praticamente igual a zero, diminui a espessura da dupla camada elétrica, mantêm a viscosidade e o coeficiente de difusão, além de incrementar a condutividade em meios de solventes polares, tanto orgânicos quanto inorgânicos [135].

Portanto, cuidados foram adotados na escolha do eletrólito suporte, na presença da molécula sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Os eletrólitos foram o tampão Fosfato Salino (PBS) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e o tampão Britton-Robinson (BR) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ na presença do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pois estes apresentaram um bom perfil voltamétrico, boa reprodutibilidade e estabilidade. Desta forma, uma vez determinado o eletrólito suporte, verificou-se o comportamento voltamétrico da espécie eletroativa $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em diferentes valores de pH na solução tampão BR, conforme mostra a Figura 25. Este tampão foi utilizado, pois apresenta ampla faixa de pH (2,0 a 12,0).

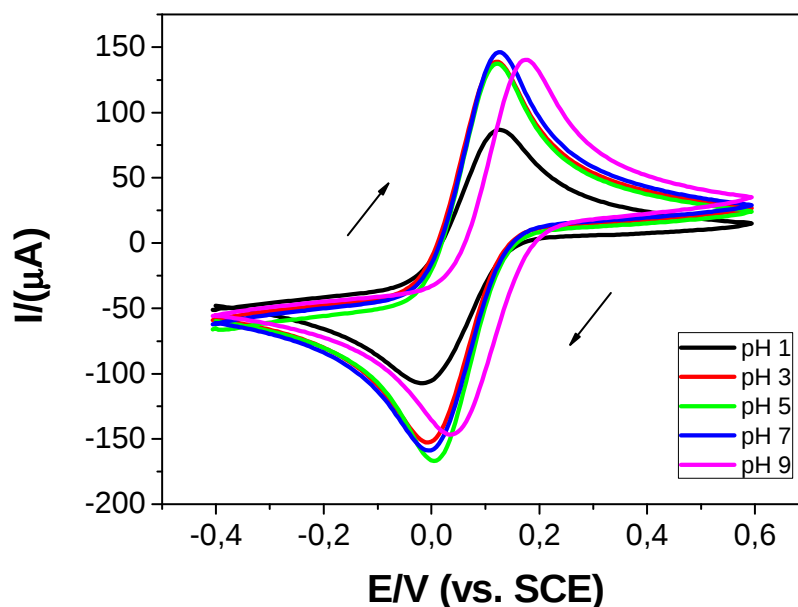


Figura 25 - Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro base em solução tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ com $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH.

De acordo com os valores de corrente de pico verificou-se que a corrente faradaica varia com o pH do meio, assim como o potencial, conforme os dados da Tabela 5.

Tabela 5 - Valores de I_{pa} e E_{pa} em diferentes valores de pH.

<i>pH</i>	<i>I_{pa} (μA)</i>	<i>E_{pa} (V)</i>
<i>1,0</i>	104,8	0,126
<i>3,0</i>	159,0	0,122
<i>5,0</i>	164,0	0,118
<i>7,0</i>	170,7	0,126
<i>9,0</i>	153,1	0,175

Verificou-se que com o aumento do pH da solução, houve um acréscimo na corrente de pico anódica (do pH 1,0 ao 7,0). No entanto, em solução alcalina (pH 9,0) ocorreu uma diminuição no valor de I_{pa} , provavelmente devido a diminuição da concentração de prótons em solução dificultando a velocidade de transferência de elétrons. O potencial de pico (E_{pa}) permaneceu praticamente constante na faixa de pH entre 1,0 a 7,0 deslocando para potenciais mais positivos apenas quando o meio tornou-se alcalino. Desta forma, optou-se trabalhar com a espécie redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em pH 7,0 para assegurar que as interações eletrostáticas não venham interferir no entendimento da transferência eletrônica das moléculas quando aplicadas as monocamadas.

Em pH 7,0 obteve-se a maior corrente de pico anódica, onde a relação $I_{pa}/I_{pc} = 1,00$ ($I_{pa} = 170,74 \mu\text{A}$ e $I_{pc} = 169,62 \mu\text{A}$). A variação entre os potenciais de pico $\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| = |0,126 \text{ V} - 0,01 \text{ V}| = 0,116 \text{ V}$ demonstram que a

oxidação eletroquímica do ferricianeto é caracterizada como um sistema quase-reversível.

Através da técnica de voltametria cíclica estudou-se as espécies eletroativas do sistema reversível $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6^{3-} / \text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{4-}$ em diferentes velocidades de varredura no pH 7,0 (escolhido anteriormente), como mostra a Figura 26. A partir destes dados pode-se verificar se o processo é difusional ou não difusional.

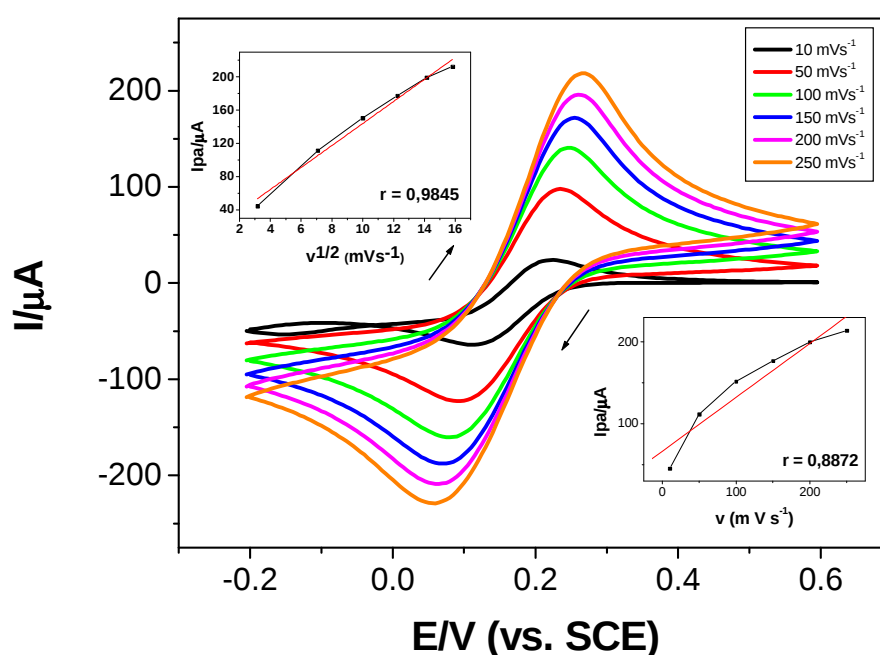


Figura 26 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro base em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ com $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 0,05 mol L⁻¹ em diferentes velocidades de varredura, em pH = 7,0. Gráficos inseridos: Relação entre I_{pa} vs $v^{1/2}$ e relação I_{pa} vs v .

A corrente de pico varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura no intervalo de 10 a 250 mV s^{-1} (Coeficiente de correlação I vs $v^{1/2}$, $r = 0,9845$ e I vs v , $r = 0,8872$), como pode ser observado na Figura 26. Esse comportamento é um indicativo que o transporte de massa é controlado pela difusão de espécies na superfície eletródica. Para o ouro sem modificação a cinética de transferência de elétrons é rápida, portanto para este tipo de eletrodo pode-se

utilizar velocidade de varredura altas. Adotou-se a velocidade de 100 mV s^{-1} para os estudos eletroquímicos, pois obteve-se uma resposta rápida da transferência eletrônica e a relação entre a corrente de pico anódica e catódica aproximou-se da unidade.

4.2 - Diferentes moléculas utilizadas para a modificação do eletrodo de ouro.

Estudos experimentais, suportados pela teoria, demonstram que a velocidade de transferência de elétrons pode ser sensivelmente afetada em função da modificação da superfície dos eletrodos [4]. Essa transferência está relacionada com base no grau de interação entre o modificador e a superfície do eletrodo [53].

As SAMs afetam muitas das propriedades de revestimento das superfícies. Na maioria, os desempenhos das suas aplicações estão fortemente ligados à estrutura da SAM, ou seja, o ambiente de cada molécula, a liberdade de entropia de seu grupo terminal, a presença de *pinholes* ou linha de defeitos, etc [136].

SAMs contendo grupos terminais funcionais (tais como $-\text{COOH}$ e grupos $-\text{NH}_2$), que podem ser facilmente formadas pela solução eletrolítica, são importantes e têm sido intensamente estudadas [55, 137].

Portanto, neste estudo optou-se por trabalhar com o ácido mercaptopropiônico ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) [56, 86], ácido tioláctico ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{SH})\text{COOH}$) [120, 138], ácido mercaptoundecanóico ($\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$) [139, 140] e a cistamina ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{S})_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) [54,94], já conhecidos na literatura com o propósito de aplicar as monocamadas automontadas formadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos.

Uma maneira de visualizar a distribuição de carga em uma molécula é a partir de um mapa de potencial eletrostático (MPE) [141]. A importância em se

estudar o MPE, é que através da visualização do perfil do mesmo é possível prever como ocorrerá a interação entre a SAM e um possível analito de interesse. As regiões de uma superfície de densidade eletrônica que são mais negativas do que as outras em um MPE são coloridas de vermelho. Essas regiões atrairiam uma espécie carregada positivamente (ou repeliriam uma carga negativa). As regiões no MPE que são menos negativas (ou são positivas) são azuis. As regiões azuis são mais prováveis de atrair elétrons de outra molécula. As regiões no MPE que são neutras apresentam colorações esverdeadas. O espectro de cores do vermelho para o azul indica a tendência na carga do mais negativo para o menos negativo (ou positivo).

As estruturas das cadeias de tióis, utilizadas na preparação das monocamadas e os seus mapas de potencial eletrostáticos, os quais foram obtidos para prever como ocorrerá a interação entre as SAMs formadas pelos diferentes tióis e os analitos, foram obtidas pelos programas GAUSSIAN 03 [142] e MOLEKEL 5.3 [143] sendo apresentadas na Figura 27.

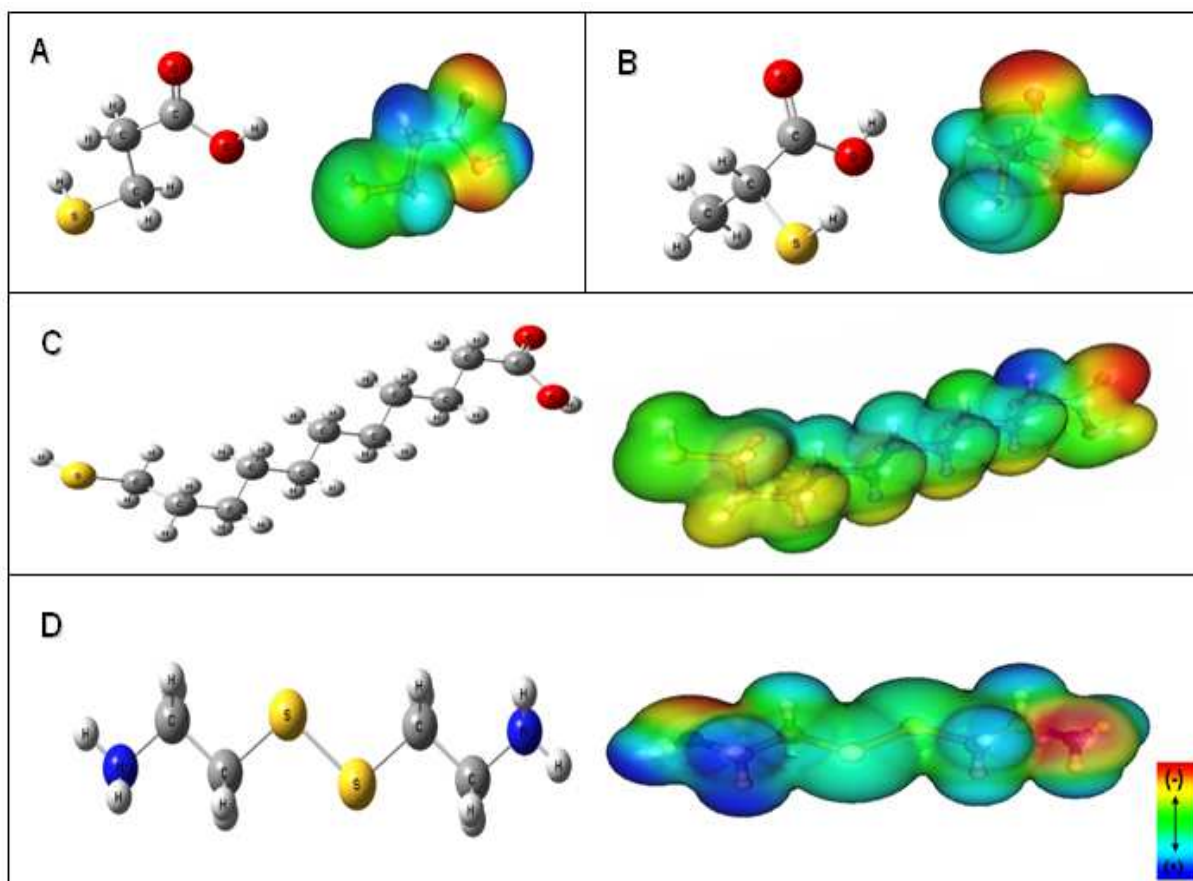


Figura 27 - Representação estrutural e mapas eletrostáticos, regiões de carga relativamente mais negativas em vermelho e carga mais positiva em azul: (A) ácido mercaptopropiônico - MPA, (B) ácido tioláctico - TLA, (C) ácido mercaptoundecanóico – MUA, (D) cistamina – CYS. Esquema de cores dos átomos (●) enxofre, (●) carbono, (●) hidrogênio, (●) oxigênio e (●) nitrogênio.

Tanto no MPA, TLA e no MUA, o átomo de oxigênio possui densidade de carga negativa, o que pode ser confirmado pelo mapa de potencial eletrostático (coloração vermelha). Isso ocorre porque ele é um átomo mais eletronegativo do que o carbono, atraindo a densidade eletrônica. Além disso, possui dois pares de elétrons não compartilhados, o qual está relativamente exposto o que lhe confere caráter de base de Lewis (doadora de elétrons) e de base de Brønsted-Lowry (pode receber prótons). Por isso, está sujeita aos ataques eletrofílicos. Os carbonos possuem densidade de carga negativa, pois são mais eletronegativos do que os hidrogênios a que estão ligados. Entretanto, como a diferença de eletronegatividade entre o carbono e o oxigênio é maior do que entre o carbono e o hidrogênio, a

densidade eletrônica no carbono é menor (não atrai tanto a nuvem eletrônica dos hidrogênios). Os átomos de hidrogênio possuem densidade positiva, o que pode ser confirmado pelo mapa de potencial eletrostático (coloração azulada). Isso porque estão ligados aos átomos de carbono (mais eletronegativos). Dessa forma, possuem um caráter ácido, entretanto neste caso, somente podem ser retirados por bases muito fortes.

Na CYS, o átomo de nitrogênio possui densidade de carga negativa, o que pode ser confirmado pelo mapa de potencial eletrostático (coloração vermelha). Isso ocorre porque ele é um átomo mais eletronegativo do que o carbono, atraindo a densidade eletrônica, além de possuir dois pares de elétrons não compartilhados. Estes elétrons estão relativamente expostos, o que lhe confere caráter de base. Portanto está sujeito como os ácidos carboxílicos aos ataques eletrofílicos. Os carbonos possuem densidade de carga negativa, pois são mais eletronegativos do que os hidrogênios a que estão ligados, apresentando o mesmo comportamento descrito anteriormente para os ácidos carboxílicos.

O enxofre nestas moléculas está localizado numa região neutra das moléculas, apresentando coloração esverdeada nos diferentes tióis. Essa parte neutra da molécula tiol que é responsável pela interação ao substrato ouro, formando a ligação covalente, forte e estável (Au-S).

4.3 Caracterização dos eletrodos de ouro modificados pelas diferentes SAMs pela voltametria cíclica (VC)

As SAMs, como já se discutiram anteriormente, apresentam uma metodologia bastante simples de preparação. Porém alguns parâmetros devem ser previamente estudados com a finalidade de se obter estas de forma reprodutível.

O solvente utilizado na formação da SAM foi o etanol, devido ao fato de dissolver com eficiência os tióis utilizados neste trabalho, diminui os *pinholes* da superfície, além de ser barato e não-tóxico.

O tempo de imersão das monocamadas constitui outro fator preponderante na formação e organização das monocamadas [68, 69]. Desta forma, o estudo em diferentes tempos de imersão (10 min, 30 min, 1, 3 e 24 horas) foi realizado. Após a formação das SAM foram realizados estudos de VC, para a caracterização das monocamadas, com a finalidade de verificar a eficiência do processo de adsorção do tiol sobre a superfície eletródica. Tal estudo é importante uma vez que a cinética de transferência de elétrons do par redox em solução no eletrodo modificado por SAM depende da compactação e espessura da monocamada [60].

Através das técnicas eletroquímicas, é possível adquirir informações sobre a transferência eletrônica de espécies redox [68], o grau de recobrimento [56], o excesso superficial [55], as irregularidades superficiais após sua formação, a formação de defeitos e pinholes na monocamada [50], caracterizando os diferentes eletrodos.

4.3.1 Eletrodo de ouro com SAM de ácido 3-mercaptopropiônico (Au-MPA)

O ácido 3-mercaptopropiônico, $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ é um tiol, que possui apenas um átomo de enxofre e na sua outra extremidade um grupo carboxílico. É considerada uma molécula de cadeia curta, pois possui apenas três átomos de carbono em sua estrutura. Quando imobilizada em substrato de ouro, rompe a ligação S-H, e adsorve sobre a superfície áurea, conforme Figura 28.

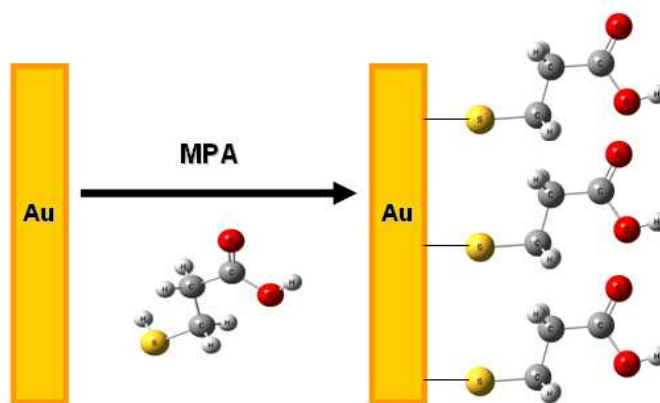


Figura 28 - Representação esquemática da formação da monocamada de ácido mercaptopropiônico, (●) enxofre, (●) carbono, (●) hidrogênio e (●) oxigênio.

MPA forma uma monocamada bidimensional que adota uma estrutura bem organizada e orientada. A monocamada proporciona uma menor permeabilidade do reagente através das cadeias na superfície do eletrodo, por causa do seu grupo funcional COOH, prevenindo a passivação do ouro [144].

Iniciaram-se os estudos do MPA nos diferentes tempos de imersão, propostos anteriormente, a Figura 29 mostra os voltamogramas obtidos.

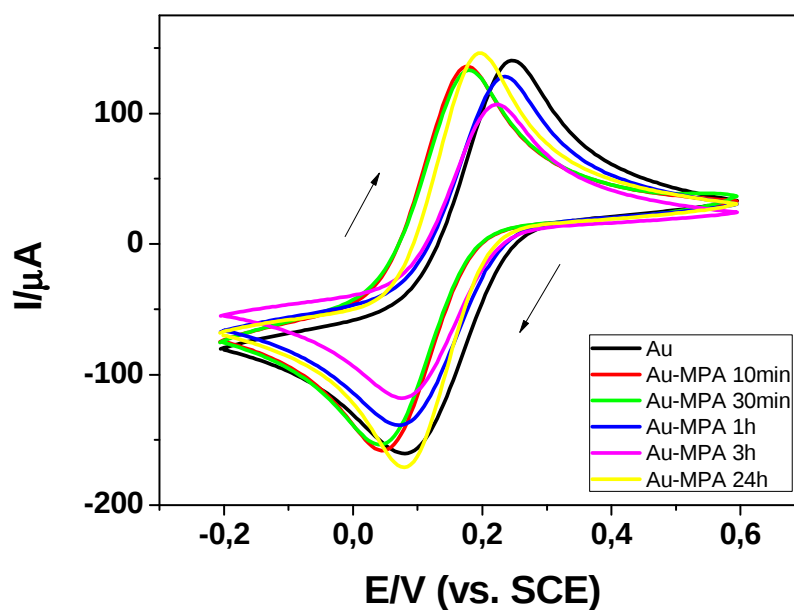


Figura 29 - Voltamogramas cíclicos do MPA em diferentes tempos de imobilização em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ com [Fe(CN)₆]³⁻ 0,05 mol L⁻¹ em pH 7,0. Velocidade de varredura: 100 mV s⁻¹.

De acordo com os voltamogramas cíclicos dos diferentes tempos de imersão do MPA, determinaram-se os parâmetros eletroanalíticos, segundo a Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros eletroanalíticos da MPA na presença da molécula sonda.

<i>Eletrodo</i>	<i>I_{pa} (μA)</i>	<i>E_{pa} (V)</i>	<i>I_{pa}/I_{pc}</i>	<i>ΔE_p (mV)</i>	<i>E_{p1/2} (mV)</i>
<i>Au</i>	149,29	0,24	1,15	160	80
<i>Au-MPA 10min</i>	148,00	0,17	1,13	130	65
<i>Au-MPA 30min</i>	141,47	0,18	1,12	140	70
<i>Au-MPA 1hora</i>	131,08	0,23	1,13	160	80
<i>Au-MPA 3horas</i>	115,15	0,22	1,16	150	75
<i>Au-MPA 24horas</i>	161,26	0,19	1,06	110	55

A partir dos voltamogramas obtidos para a molécula sonda, é possível considerar que o processo de quimissorção ocorre rapidamente, já nos primeiros 10 min. Neste tempo de imersão pode-se sugerir a existências de *pinholes* no arranjo inicial da monocamada e pouca organização e empacotamento das cadeias, pois a corrente de pico não diminui consideravelmente. À medida que o tempo de imersão do eletrodo na solução de MPA é aumentado, uma diminuição nas correntes de pico é observada, exceto na imersão de 24 horas, indicando uma cinética de transferência de elétrons mais lenta em relação ao eletrodo de Au. O aumento nas correntes de pico, após o período de imersão de 24 horas, pode ser atribuído a um processo de dessorção da monocamada, uma vez que a resposta voltamétrica apresenta um perfil similar ao eletrodo de Au limpo. Outra possível explicação é que com o aumento do tempo, a monocamada formada inibe a adsorção de impurezas

ou interferentes na superfície eletródica tornando-se mais disponível para a ocorrência do processo eletroquímico [151]. Quanto ao processo que ocorre na superfície do eletrodo, a relação I_{pa}/I_{pc} para as imobilizações foi superior a 1 e valores de ΔE_p acima de 100 mV, o que caracteriza o sistema quase-reversível.

Baseado nos estudos de imersão há um consenso geral de que a formação de SAM de tióis ocorre em duas etapas, segundo um processo adsorptivo do tipo de Langmuir: inicialmente um quimissorção caótica, seguida de etapa organizacional dependente do tempo e do tamanho da cadeia [68]. Coberturas densas do adsorbato são obtidas mais rapidamente a partir de soluções milimolar em milisegundos a minutos, mas um processo de reorganização lento requer tempos da ordem de horas para maximizar a densidade das moléculas e minimizar os defeitos do SAM. A maioria dos trabalhos típicos encontrados na literatura para a formação de monocamadas não utiliza tempos superiores de 12 a 18 horas, fornece SAM com propriedades convenientes para várias aplicações, mesmo em cadeias de tióis longas que requerem maior tempo [25], para tióis de cadeia curta, o tempo de imersão de 2 a 3 horas é o mais utilizado [151].

Tempos maiores de imersão podem melhorar a reprodutibilidade e a estabilidade da monocamada. Como o MPA é considerado um ácido de cadeia curta, este não requer longo tempo para etapa organizacional, portanto optou-se por deixar o eletrodo em solução, durante 3 horas para garantir a formação e organização total da monocamada. A Figura 30 mostra o comportamento do Au-MPA em diferentes velocidades de varredura na presença da molécula sonda.

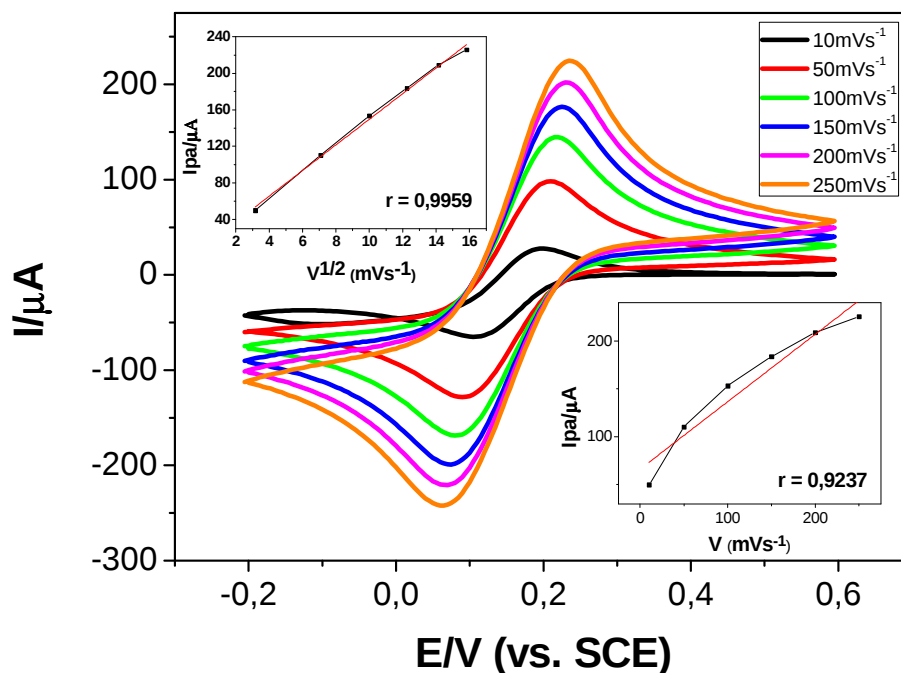


Figura 30 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo Au-MPA no tempo de imersão 3 horas em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ com [Fe(CN)₆]³⁻ 0,05 mol L⁻¹ em diferentes velocidades de varredura, em pH = 7,0; Gráficos inseridos: Relação entre Ipa vs v^{1/2} e relação entre Ipa vs v.

Esses estudos resultaram em uma relação linear ($r = 0,9959$) entre os valores de corrente de pico anódico e a raiz quadrada da velocidade de varredura, caracterizando um processo difusional de transferência de elétrons na interface eletrodo-solução, o que possibilita a aplicação do eletrodo estudado como sensor eletroquímico. Pelos dados obtidos, optou-se trabalhar em velocidades mais baixas de varredura, 100 mV s⁻¹ pois no eletrodo modificado a cinética de transferência de elétrons é mais lenta.

4.3.2 Eletrodo de ouro com SAM de ácido tioláctico (Au-TLA)

A segunda molécula de tiol estudada foi o ácido tioláctico. O TLA (CH₃CH(SH)COOH) possui a mesma quantidade de átomos de carbonos, enxofre e hidrogênios que o MPA (HSCH₂CH₂COOH), o que difere entre estas moléculas está

na posição que o enxofre se encontra. No TLA, o enxofre está ligado ao segundo carbono, já no MPA o enxofre encontra-se no carbono terminal.

O TLA possui apenas um átomo de enxofre e na sua outra extremidade um grupo carboxílico e uma metila. Também é considerada uma molécula de cadeia curta, pois possui apenas três átomos de carbono. Quando imobilizada em substrato de ouro, rompe a ligação S-H, e adsorve sobre a superfície áurea, segundo a Figura 31.

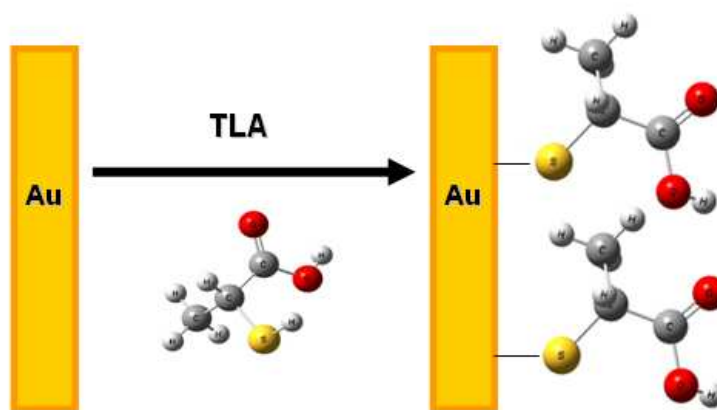


Figura 31 - Representação esquemática da formação da monocamada de ácido tioláctico; (●) enxofre, (●) carbono, (●) hidrogênio e (●) oxigênio.

TLA forma uma monocamada bidimensional que adota uma estrutura bem organizada e orientada [138]. Esses grupos funcionais terminais tornam a SAM mais volumosa quando comparada ao MPA. Esta monocamada pode proporcionar uma maior repulsão do analito através das cadeias na superfície do eletrodo devido aos seus grupos funcionais terminais (COOH e CH₃) [55, 138].

Utilizando o mesmo procedimento de imobilização, estudou-se o comportamento do TLA na formação da monocamada automontada. Os tempos de imersão foram avaliados na presença da molécula sonda, segundo a Figura 32.

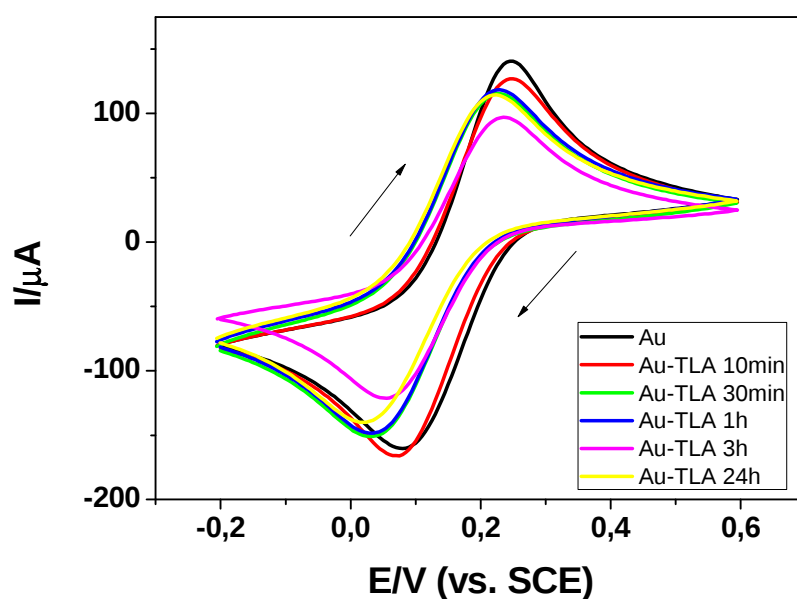


Figura 32 - Voltamogramas cíclicos do TLA em diferentes tempos de imobilização em solução PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com $[Fe(CN)_6]^{3-}$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH=7,0. Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} .

As SAMs formadas pelo TLA apresentaram comportamento similar à de MPA nos diferentes tempos de imersão, a corrente de pico diminuiu com o tempo de imersão indicando que a barreira para a transferência de elétrons é mais alta comparada ao eletrodo sem modificação e também modificado com o MPA. A Tabela 7 apresenta os parâmetros medidos nos voltamogramas cíclicos para TLA.

Tabela 7 - Parâmetros eletroanalíticos do TLA na presença da molécula sonda.

<i>Eletrodo</i>	<i>I_{pa} (μA)</i>	<i>E_{pa} (V)</i>	<i>I_{pa}/I_{pc}</i>	<i>ΔE_p (mV)</i>	<i>E_{p1/2} (mV)</i>
<i>Au</i>	149,29	0,24	1,15	160	80
<i>Au-TLA 10min</i>	141,08	0,24	1,06	170	85
<i>Au-TLA 30min</i>	127,02	0,22	1,15	190	95
<i>Au-TLA 1hora</i>	126,29	0,22	1,10	180	90
<i>Au-TLA 3horas</i>	105,83	0,23	1,07	180	90
<i>Au-TLA 24horas</i>	123,84	0,22	1,17	200	100

A partir dos voltamogramas do Au-TLA obtidos para a molécula sonda, pode-se considerar que o processo de quimissorção inicia-se como no Au-MPA já nos primeiros 10 min, onde se observa que a corrente de pico diminui comparadamente ao eletrodo de ouro sem modificação. À medida que o tempo de imersão na solução de TLA é superior a 10 min a imobilização é aumentada, pois ocorre a etapa organizacional, conferindo maior estabilização da monocamada. Uma diminuição nas correntes de pico e um deslocamento do potencial para regiões mais negativas podem ser verificados pelos voltamogramas. Neste caso a relação I_{pa}/I_{pc} também foi superior a 1 e com ΔE em torno de 180 mV, para todos os tempos de imobilização indicando que o sistema é considerado quase-reversível.

Similarmente a Au-MPA, verificou-se um aumento na corrente de pico no tempo de imobilização de 24 horas. Como o TLA também é considerado um ácido de cadeia curta, não requer longo tempo para etapa organizacional. Portanto optou-se deixar o eletrodo em solução por 3 horas para que a etapa organizacional da monocamada fosse efetiva e homogênea. A Figura 33 mostra o comportamento do

Au-TLA (3 horas) em diferentes velocidades de varredura na presença da molécula sonda.

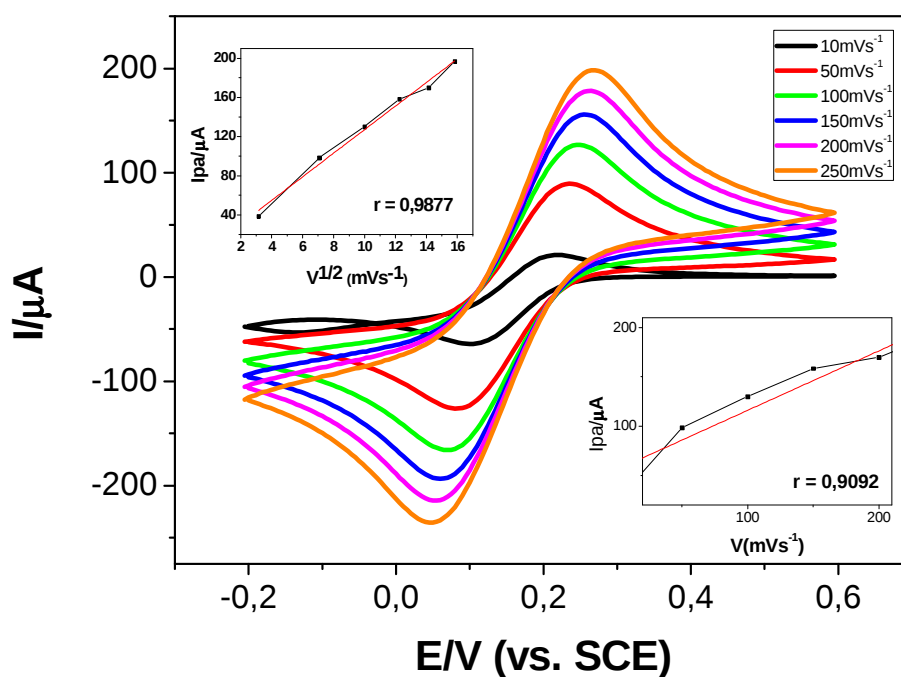


Figura 33 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo Au-TLA no tempo de imersão 3 horas em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ com [Fe(CN)₆]³⁻ 0,05 mol L⁻¹ em diferentes velocidades de varredura, em pH = 7,0; Gráfico inserido: Relação entre I_{pa} e $v^{1/2}$ e relação entre I_{pa} e v .

Esses estudos do TLA também resultaram em uma relação linear ($r = 0,9877$) entre os valores de corrente de pico anódico e a raiz quadrada da velocidade de varredura, o que caracteriza um processo difusional de transferência de elétrons na interface eletrodo-solução. Também neste caso, escolheu-se trabalhar na velocidade de varredura em 100 mV s⁻¹, pois no eletrodo modificado a cinética de transferência de elétrons é mais lenta.

4.3.3 Eletrodo de ouro com SAM de ácido 11-mercaptoundecanóico (Au-MUA)

O MUA possui a cadeia mais longa dos tióis analisados, com uma cadeia carbônica contendo 11 átomos de carbono, um átomo de enxofre e na sua outra

extremidade um grupo carboxílico. Esta molécula quando imobilizada em substrato de ouro, rompe a ligação S-H, e adsorve sobre a superfície áurea, segundo a Figura 34.

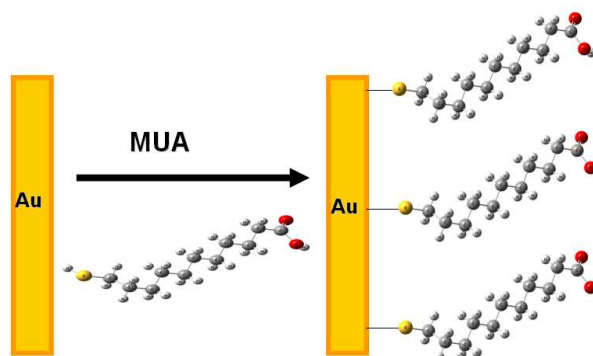


Figura 34 - Representação esquemática da formação da monocamada de ácido 11-mercaptoundecanóico; (●) enxofre, (●) carbono, (●) hidrogênio e (●) oxigênio.

Estudou-se o comportamento do MUA na formação da monocamada automontada. Os tempos de imersão foram avaliados na presença da molécula sonda, segundo a Figura 35.

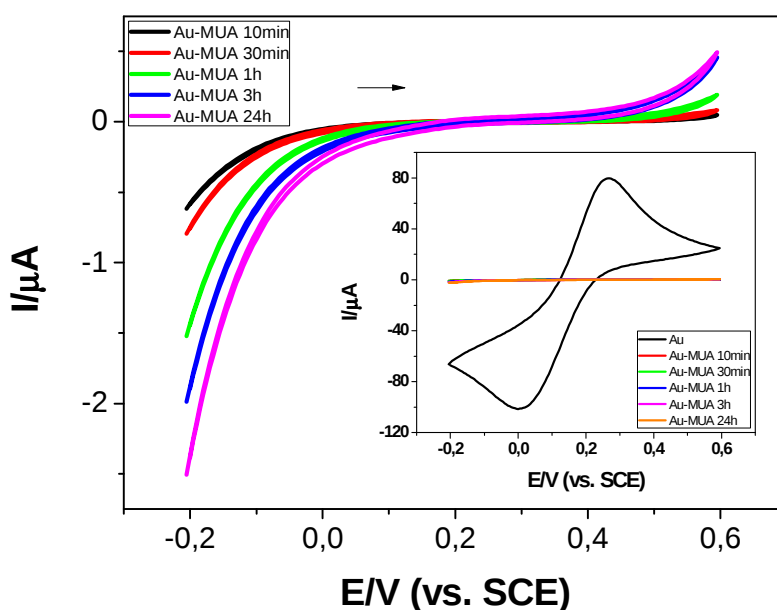


Figura 35 - Voltamogramas cíclicos do MUA em diferentes tempos de imobilização em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ com [Fe(CN)₆]³⁻ 0,05 mol L⁻¹ em pH 7. Velocidade de varredura: 100 mVs⁻¹. Gráfico inserido: comparação do perfil do eletrodo sem modificação e com MUA.

Para esta monocamada não foi possível determinar os parâmetros eletroanalíticos pela molécula sonda (não apresentou picos de oxidação e redução em todos os tempos de imersão estudados). Pode ser observado pelos voltamogramas obtidos que ocorreu uma passivação da superfície do Au com a formação da monocamada, provavelmente devido ao alto recobrimento superficial, o que dificulta a transferência de elétrons entre as espécies e a superfície metálica. Isto mostra que a imobilização pode ser eficiente. Este fato era esperado, uma vez que tióis de cadeia longa produzem SAM com poucos defeitos e, conseqüentemente, alto grau de empacotamento da monocamada [78, 140]. Como cadeias longas requerem maior tempo para sua organização e orientação sobre a superfície metálica, optou-se deixar o eletrodo imerso durante 24 horas [145]. Seguindo o mesmo procedimento proposto para as demais monocamadas, a Figura 36 mostra o comportamento do Au-MUA (24 horas) em diferentes velocidades de varredura na presença da molécula sonda. Pode ser constatado que as diferentes velocidades de varredura, não interferiram no perfil voltamétrico do eletrodo Au-MUA.

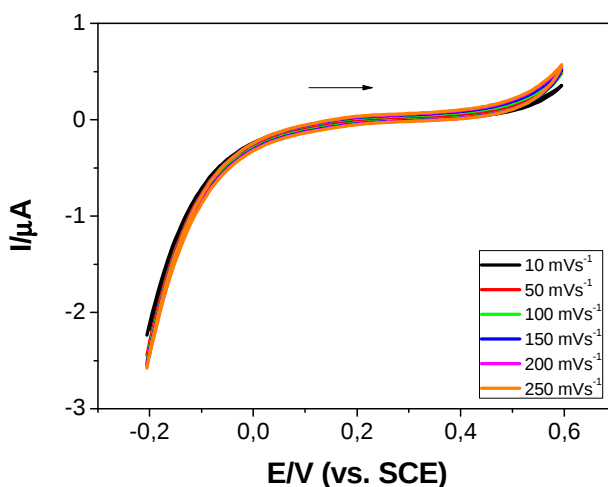


Figura 36 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo Au-MUA no tempo de imersão 24 horas em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ com [Fe(CN)₆]³⁻ 0,05 mol L⁻¹ em diferentes velocidades de varredura, em pH = 7,0.

4.3.4 Eletrodo de ouro com SAM de cistamina (Au-CYS)

A molécula de CYS é um dissulfeto a qual possui dois átomos de enxofre em sua cadeia. Um aspecto interessante ocorre quando há interação com o substrato ouro. Neste caso, para que haja a formação da monocamada é necessário que a molécula de cistamina sofra uma quebra entre seus átomos de enxofre, segundo esquema mostrado na Figura 37.

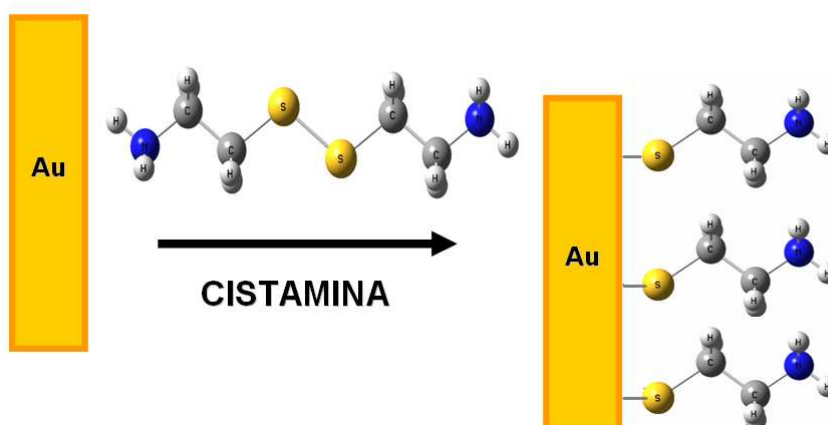


Figura 37 - Representação esquemática da quebra da molécula de cistamina entre os átomos de enxofre e a interação com a superfície de ouro, na formação da monocamada, (●) enxofre, (●) carbono, (●) hidrogênio e (●) nitrogênio.

Como cada molécula de cistamina dá origem a dois tióis após a quebra da ligação S-S [146] a probabilidade de ter dois átomos de enxofre posicionados relativamente próximos uns dos outros sobre a superfície de ouro deve ser maior para cistamina que para as outras monocamadas.

Os mesmos estudos realizados anteriormente para foram adotados para avaliar a adsorção da monocamada. A Figura 38 demonstra o comportamento do Au-CYS em diferentes tempos de imersão.

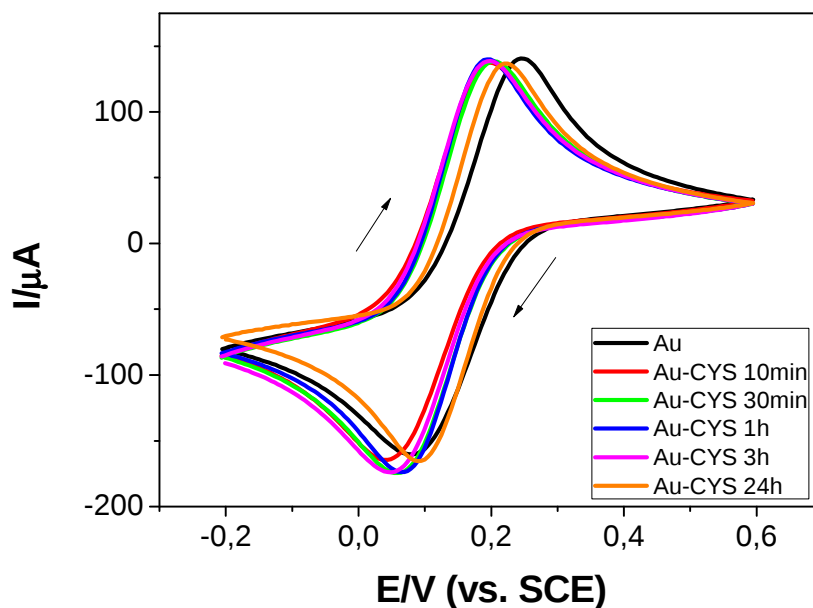


Figura 38 - Voltamogramas cíclicos da CYS em diferentes tempos de imobilização em solução PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{pH} = 7,0$. Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} .

De acordo com a literatura [78] é relatado que na formação da SAM usando um dissulfeto ocorre uma divisão da ligação S-S, diminuindo o tamanho da cadeia e a espessura da monocamada, ocasionando um atraso no primeiro estágio de formação da SAM.

Verifica-se que a monocamada formada pela CYS deve apresentar um baixo recobrimento superficial, pois a sua formação bloqueia muito pouco os processos de oxidação e redução quando comparados ao eletrodo de ouro limpo. Os voltamogramas cíclicos dos eletrodos modificados com CYS mostraram valores de correntes de pico próximos em relação ao ouro sem modificação, pois em pH menor ou igual a 7,0 a superfície amino está carregada positivamente [147] atraindo o Fe^{3+} facilitando a transferência eletrônica. A Tabela 8 apresenta os parâmetros medidos nos voltamogramas cíclicos para CYS.

Tabela 8 - Parâmetros eletroanalíticos da CYS na presença da molécula sonda.

<i>Eletrodo</i>	<i>I_{pa} (μA)</i>	<i>E_{pa} (V)</i>	<i>I_{pa}/I_{pc}</i>	<i>ΔE_p (mV)</i>	<i>E_{p1/2} (mV)</i>
<i>Au</i>	149,29	0,24	1,15	160	80
<i>Au-CYS 10min</i>	157,59	0,19	1,23	150	75
<i>Au-CYS 30min</i>	156,17	0,20	1,14	150	75
<i>Au-CYS 1hora</i>	156,16	0,19	1,16	130	65
<i>Au-CYS 3horas</i>	156,15	0,19	1,2	140	70
<i>Au-CYS 24horas</i>	152,03	0,22	1,13	130	65

Os comprimentos de cadeia cistamina são semelhantes à escala de rugosidade da topografia Au e a transferência eletrônica ocorre através das moléculas por tunelamento direto, devido a pequena distância dos íons à superfície metálica.

Verificou-se a partir dos dados obtidos que o tempo de imobilização não interfere significativamente no perfil voltamétrico das monocamadas da cistamina sobre o eletrodo de ouro. Pode-se verificar que ocorreu a formação da SAM pela CYS nos primeiros tempos de imersão, pois houve um deslocamento do potencial para regiões menos positivas o que é uma indicação da formação da monocamada. Tal deslocamento pode ser atribuído a maior facilidade no processo de transferência de carga pelo eletrodo Au-CYS em relação ao eletrodo de Au limpo. A etapa caótica da CYS mostrou-se rápida já nos primeiros tempos de imersão, não sofrendo mudanças significativas na corrente de pico anódica. Para garantir que a total quebra dos átomos de enxofre da molécula de cistamina, a organização e orientação da monocamada ocorra efetivamente, optou-se deixar o eletrodo um maior tempo imerso na solução do tiol. Acredita-se que a etapa organizacional ocorreu somente no tempo de imersão de 24 horas, onde ocorreu uma pequena diminuição da

corrente de pico quando comparada as CYS de 30min, 1 e 3 horas. Portanto para a molécula de CYS estipulou-se o tempo de imersão de 24 horas, garantindo a formação efetiva e estável da monocamada. A Figura 39 mostra o comportamento do Au-CYS em diferentes velocidades de varredura na presença da molécula sonda no tempo escolhido.

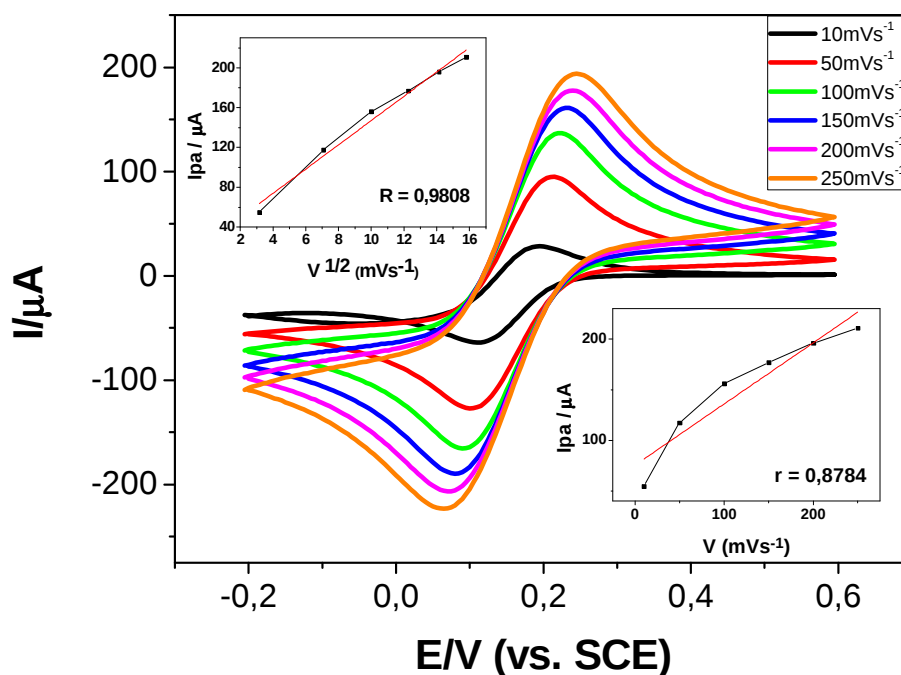


Figura 39 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo Au-CYS no tempo de imersão 24 horas em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ com [Fe(CN)₆]³⁻ 0,05 mol L⁻¹ em diferentes velocidades de varredura, em pH = 7,0; Gráficos inseridos: Relação entre Ipa e v^{1/2}. e relação Ipa e v.

Como os outros tióis, os estudos da CYS resultaram em uma relação linear ($r = 0,9808$) entre os valores de corrente de pico anódico e a raiz quadrada da velocidade de varredura, o que caracteriza um processo difusional de transferência de elétrons na interface eletrodo-solução. Estipulou-se a velocidade de 100 mV s⁻¹ para os demais estudos.

4.4 Comportamento dos diferentes eletrodos modificados comparados ao eletrodo de ouro

A partir dos estudos de tempo de imersão, estipulou-se o tempo de imobilização das monocamadas de ácidos carboxílicos de cadeias curtas para 3 horas e do ácido mercaptoundecanóico e da cistamina para 24 horas. Todos os voltamogramas dos eletrodos modificados apresentaram um deslocamento do potencial para regiões de valores menos positivos, indicando que as imobilizações das moléculas ocorreram, porém provavelmente com a formação de alguns *pinholes* conforme Figura 40.

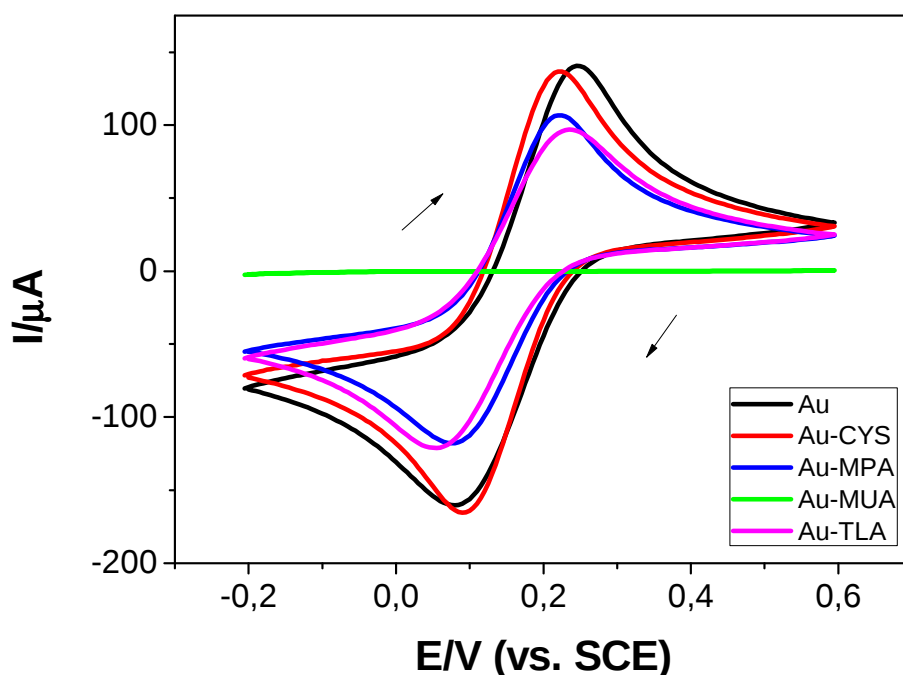


Figura 40 - Voltamogramas cíclicos do Au, Au-MPA e Au-TLA tempo de imersão 3 horas, e Au-MUA e Au-CYS tempo de imersão 24 horas, em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ com [Fe(CN)₆]³⁻ 0,05 mol L⁻¹ (pH=7,0). Velocidade de varredura 100 mV s⁻¹.

As SAMs formadas com moléculas de cadeia curta são relativamente mais desordenadas, o que torna o acesso à superfície do eletrodo mais fácil, devido a pequena distância dos íons à superfície metálica, pois estão menos passivadas em

relação às modificadas com moléculas de cadeia mais longa. Desta forma, as reações transferência de carga foram menos inibidas, resultando em maiores valores de corrente, segundo a Tabela 9.

Tabela 9 - Parâmetros eletroquímicos das diferentes monocamadas.

<i>Eletrodo</i>	<i>I_{pa} (μA)</i>	<i>E_{pa} (V)</i>	<i>I_{pa}/I_{pc}</i>	<i>ΔE_p (mV)</i>	<i>E_{p1/2} (mV)</i>
<i>Au</i>	149,29	0,24	1,15	160	80
<i>Au-CYS 24horas</i>	152,03	0,22	1,13	130	65
<i>Au-MPA 3horas</i>	115,15	0,22	1,16	150	75
<i>Au-MUA 24horas</i>	-	-	-	-	-
<i>Au-TLA 3horas</i>	106,83	0,23	1,07	180	90

O eletrodo modificado com CYS mostrou maiores valores de correntes de pico um pouco maiores em relação ao ouro sem modificação. O aumento nas correntes pode estar relacionado à maior disponibilidade da superfície, devido aos comprimentos da cadeia de cistamina serem semelhantes à escala de rugosidade da topografia Au e também, em meio neutro os grupos aminos encontram-se carregados positivamente facilitando a transferência eletrônica entre a molécula sonda [147].

A molécula de MPA proporcionou uma diminuição nas correntes de pico do processo redox do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, indicando a formação e organização de sua camada. Como a transferência de elétrons do complexo hexacianoferrato ocorre por tunelamento e também meio dos *pinholes*, pode-se verificar que a presença destes é maior na MPA comparada ao TLA, já que a redução destes dificulta o acesso destas moléculas à superfície modificada. No caso do TLA, a deposição da monocamada

proporcionou uma diminuição dos picos de corrente anódica, indicando que sua barreira na transferência de elétrons é mais elevada quando comparada às demais monocamadas. Devido sua maior ramificação dos grupos terminais, estes devem dificultar o acesso das moléculas do ferricianeto à superfície metálica, o que justifica o decréscimo maior da corrente.

O MUA por apresentar a cadeia carbônica mais longa, a sua sensibilidade frente à molécula sonda é baixo, pois seu comprimento dificulta o processo de transferência de elétrons, diminuindo este processo, passivando a superfície eletródica.

As SAMs formadas por grupos terminais carboxílicos são de interesse devido a sua estabilidade e natureza ionizável. O controle sobre interações intermoleculares em uma superfície pode resultar em monocamadas quimicamente sensíveis que podem ser utilizados no reconhecimento molecular baseado em sensores químicos. Os grupos terminais formados por aminas também constituem uma interessante classe de espécies modificadoras que tem sido sistematicamente estudada devido ao grande potencial de aplicação em atividades biológicas [65].

4.4.1 Determinação da área eletroquimicamente ativa das monocamadas

O emprego de SAMs para fins analíticos vêm se tornando possível graças aos esforços para o controle da formação e do surgimento de irregularidades e defeitos nas monocamadas. Neste contexto, é igualmente possível controlar o grau de ordenamento, avaliando a influência dos diferentes modificadores na rugosidade superficial dos eletrodos. Com esta finalidade, a medida da adsorção de oxigênio foi escolhida, por ser um método bastante confiável e adequado para obtenção da área microscópica exibida por superfícies de ouro [134]. A determinação da área

eletroquímica dos eletrodos modificados foi realizada através da integração da área de pico de oxidação da curva voltamétrica do ouro, obtidas segundo a Figura 41, utilizando as equações 3 e 4.

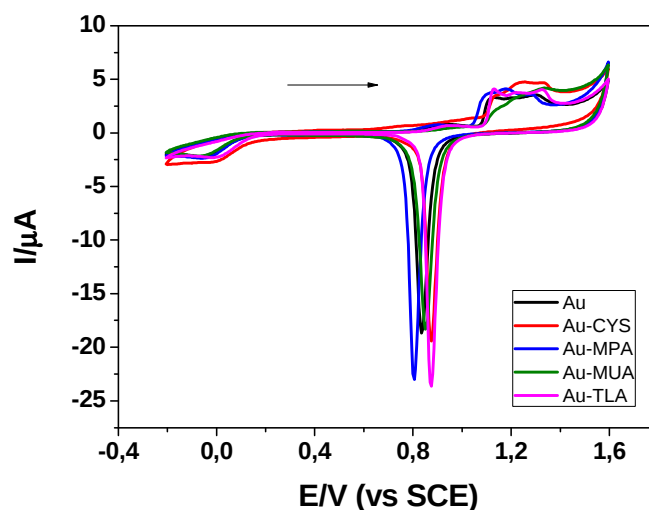


Figura 41 - Voltamogramas cíclicos das diferentes modificadores sobre superfícies de eletrodos de ouro. Eletrólito suporte: H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

Geralmente, os valores de área eletroquimicamente ativa podem ser expressos como fator de rugosidade, que é simplesmente o valor de área eletroquimicamente ativa expresso por unidade de área geométrica superficial, conforme Tabela 10.

Tabela 10 - Determinação da área ativa e fator de rugosidade das monocamadas.

SAM	Área ativa (cm^2)	Fator de rugosidade, f_x
Au	0,081	2,01
Au-CYS	0,048	1,19
Au-MPA	0,056	1,42
Au-MUA	0,031	0,77
Au-TLA	0,058	1,44

Em geral, a melhora das respostas eletroquímicas não pode ser exclusivamente atribuída ao aumento da área superficial eletródica, mas também, ao estado químico e físico em que se encontra a superfície. Apesar de o ouro apresentar maior área, a utilização destes muitas vezes é limitada devido a sua passivação de superfície.

Os resultados indicam que a composição e a topografia da superfície de ouro mudam após a modificação com os diferentes tióis. As SAMs de cadeias curtas apresentam a área do eletrodo aproximadamente 60% de superfície ativa em relação ao eletrodo de ouro, enquanto a molécula de MUA reduz essa área para 38%. Monocamadas de tióis sobre ouro com cadeia longa são livres de defeitos e *pinholes* mensuráveis, portanto possuem menor área ativa. Esse fato ocorre principalmente às fortes interações intermoleculares laterais da molécula de MUA, mantendo uma estrutura com barreira a transferência eletrônica efetiva [148].

4.4.2 Dessorção eletroquímica

Os tióis sofrem dessorção redutiva quando potenciais mais negativos são aplicados em eletrodos modificados. Os estudos do mecanismo deste processo sugerem que a dessorção ocorre primeiramente nas regiões de defeitos das SAMs para prosseguir para regiões com maior organização e mais empacotadas. A carga de dessorção pode ser empregada para determinação da quantidade de moléculas adsorvidas sobre a superfície eletródica, segundo a Figura 42.

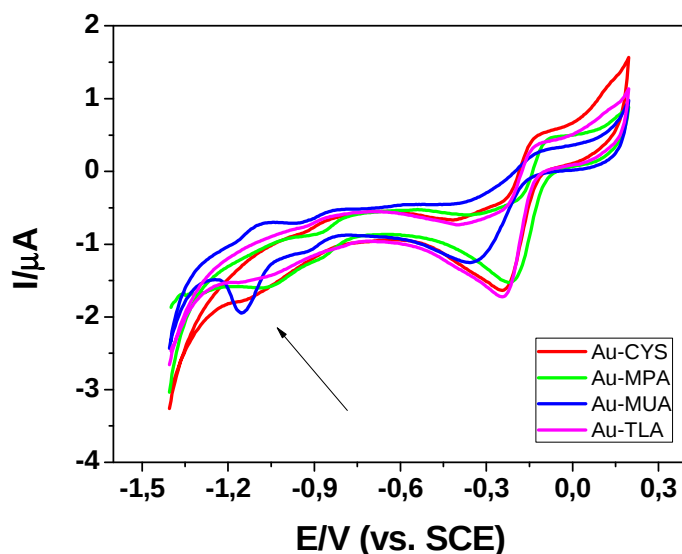


Figura 42 - Dessorção redutiva das diferentes monocamadas, realizados em solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹ a 50 mV s⁻¹.

Todas as monocamadas de tióis estudadas apresentam mais de um pico de redução. A presença desses picos de dessorção é motivo de especulações e controvérsia na literatura, porque segundo a teoria da redução dessortiva [149], este fenômeno é realizado via um processo monoelétrônico, o que não explica o aparecimento de mais de um pico de redução. O surgimento de outros picos pode ser atribuído tanto aos diferentes domínios cristalinos na superfície do ouro policristalino, quanto à presença de moléculas de alcanotióis fracamente ligadas à superfície eletródica, presentes nas regiões de irregularidades das SAMs.

A partir do perfil da dessorção eletroquímica das SAMs foi possível caracterizar as monocamadas, com relação ao excesso superficial, a partir dos voltamogramas cíclicos (Figura 42) para os diferentes modificadores medidos pela integral da carga (Q) do pico catódico de dessorção localizado em potenciais (aproximadamente 1,1 V) mais anódicos do tiol e por meio da equação 5:

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad (\text{eq.5})$$

Onde Γ é o excesso superficial (mol.cm^{-2}), Q é a carga, F é a constante de Faraday, n é o número de elétrons e A é a área eletroativa do eletrodo. Os valores obtidos do excesso superficial encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11 - Valores dos excessos superficiais Γ obtidos a partir da primeira varredura redutiva, do eletrodo de ouro recoberto com as diferentes monocamadas.

SAMs	Excesso superficial (Γ)
Au-CYS	$1,88 \times 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$
Au-MPA	$5,03 \times 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$
Au-MUA	$1,06 \times 10^{-8} \text{ mol.cm}^{-2}$
Au-TLA	$1,35 \times 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$

A diferença entre a quantidade e a magnitude dos picos para as superfícies modificadas com as diferentes SAMs pode ser atribuída a diferenças na estrutura da cadeia carbônica dos distintos tióis. Estas diferenças nas monocamadas podem acarretar em distinções no empacotamento das SAMs formadas por estes tióis, como é o caso do MPA e do TLA.

Segundo o trabalho de Kakiuchi *et al* [150] a voltametria de dessorção redutiva é uma ferramenta valiosa para diagnosticar o estado das SAMs, refletindo equilíbrio, como interações intermoleculares, a energia de Gibbs de adsorção e formação de agregados. Cuidados devem ser tomados para avaliar a quantidade adsorvida de tiolatos da área sob o pico da dessorção redutiva, embora seja uma medida útil de adsorção.

Observa-se que a partir dos dados de carga de dessorção obtidos das monocamadas auto-organizadas dos diferentes tióis, os valores de Γ estão de acordo com os relatados na literatura [51, 151], os quais estão próximos de

$1 \times 10^{-10} \text{ mol.cm}^2$. Por exemplo, Mendes *et al* [60] obteve um excesso superficial de $7,4 \times 10^{-9} \text{ mol.cm}^{-2}$ para MPA, $2,3 \times 10^{-8} \text{ mol.cm}^{-2}$ para o MUA e $4,2 \times 10^{-9} \text{ mol.cm}^{-2}$ para a CYS, valores próximos ao obtido neste estudo. Estes valores demonstram uma cobertura dos sítios ativos da superfície, o que justifica perda na resposta eletroquímica, comparada ao ouro sem modificação.

4.4.3 Estudo da estabilidade e reprodutibilidade das diferentes monocamadas

O estudo da estabilidade das monocamadas pode ser conduzido por meio de sucessivas varreduras de potencial pela técnica de voltametria. Neste caso observou-se, com sucessivos ciclos um pequeno decréscimo no valor das correntes de picos das monocamadas na presença da molécula sonda, o que é associado à perda de massa e atividade eletroquímica do material depositado. A Tabela 12 demonstra as porcentagens de perda da resposta eletroquímica.

Tabela 12 - Porcentagens de perda de resposta voltamétrica após 100 ciclos de varredura para os eletrodos de ouro modificados com SAM na presença de ferricianeto de potássio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$.

Eletrodos	Perda da resposta voltamétrica
Au-CYS	1,92%
Au-MPA	0,65%
Au-MUA	-
Au-TLA	1,58%

O perfil voltamétrico dos eletrodos foi avaliado em relação à estabilidade das correntes de pico anódica. O gráfico de I_{pa} versus números de ciclos dos diferentes eletrodos estudados é ilustrado na Figura 43.

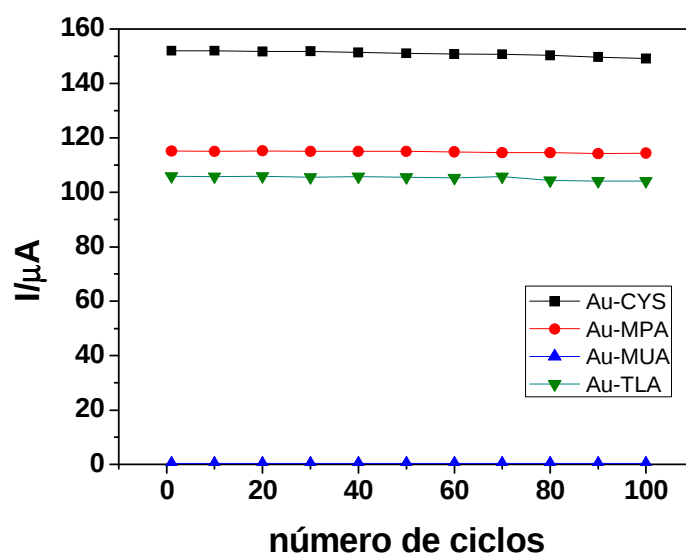


Figura 43 - Correlação entre a corrente de pico anódica e o número de ciclos para os diferentes eletrodos. Eletrólito suporte: tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ com [Fe(CN)₆]³⁻ 0,05 mol L⁻¹, em pH = 7,0. Velocidade de varredura: 100 mV s⁻¹.

As monocamadas apresentaram razoável estabilidade por um período longo de tempo, permitindo que sejam utilizadas para a realização de um grande número de medidas, sem perda significativa da resposta eletroquímica.

A Tabela 13 apresenta os dados obtidos de reprodutibilidade do preparo dos diferentes eletrodos modificados. Estes valores de corrente de pico foram obtidos usando o desvio padrão relativo através de 5 medidas (n = 5) em solução tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ na presença da molécula sonda.

Tabela 13 – Parâmetros da corrente de pico estimados através do desvio padrão relativo obtidos para os eletrodos após cada preparo das diferentes SAMs pela VC em PBS, pH 7,0, na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 0,05 mol L⁻¹. Velocidade de varredura: 100 mV s⁻¹.

Eletrodos	I _{pa} (μA)
Au-CYS	152,03 ± 0,427
Au-MPA	114,86 ± 0,916
Au-MUA	-
Au-TLA	106,57 ± 1,018

Obteve-se para as monocamadas de CYS, MPA e TLA boa reprodutibilidade do filme sobre a superfície metálica, caracterizando como sistemas bem organizados e estáveis. Não foi possível estimar a reprodutibilidade para o MUA, pois este eletrodo não apresentou as correntes de picos em sua resposta voltamétrica.

4.5 Caracterização pela Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica envolve a aplicação de uma perturbação de pequena amplitude no sinal sinusoidal do potencial de célula eletroquímica, medindo sua resposta. O espectro de impedância resultante corresponde à dependência dos valores imaginários (Z''), em função dos valores reais (Z'), contendo informações sobre a transferência de elétrons numa reação na interface eletrodo-solução.

Os espectros de impedância, geralmente apresentam uma região semicircular seguida de uma reta. O semicírculo (frequências mais altas) corresponde ao processo de transferência de elétron, enquanto a reta (frequências mais baixas) representa o processo de difusão. O ponto em que o semicírculo intercepta o eixo de

Z' corresponde ao valor da resistência da solução eletrolítica (R_s) e o diâmetro do semicírculo corresponde à resistência elétrica para a transferência de elétrons (R_{ct}).

A Figura 44 apresenta os diagramas de impedância obtidos para os eletrodos de Au modificados com as diferentes monocamadas de tióis na presença da solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$, os quais foram obtidos a 200 mV.

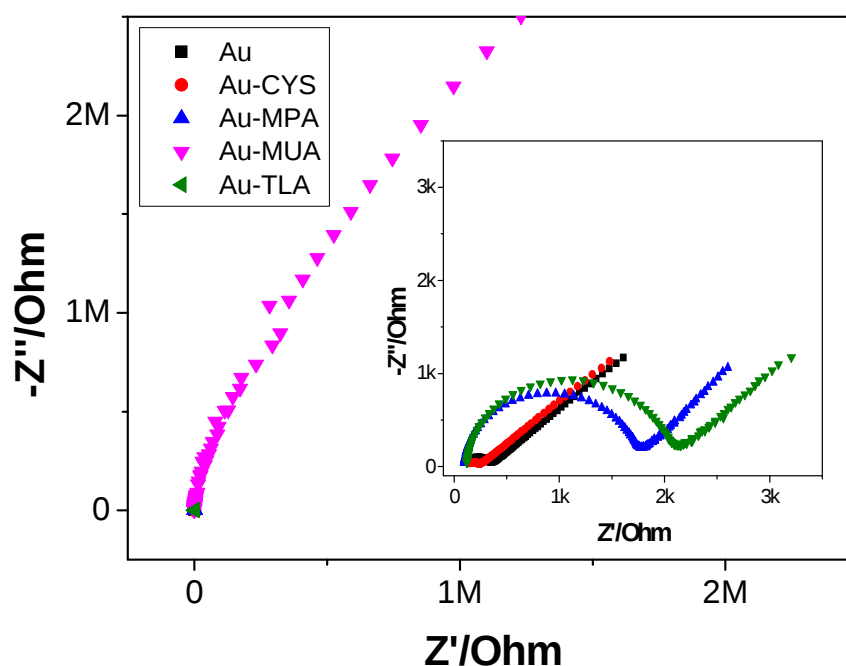


Figura 44 - Diagramas de Nyquist de $0,008 \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para o eletrodo de ouro limpo e modificado com a monocamada, $E_{ac} = 10 \text{ mV}$, $E_{dc} = 200 \text{ mV}$ e faixa de frequência de 10 KHz a 100 mHz

Os diagramas obtidos para as monocamadas de cadeias curtas (Au-CYS, Au-MPA e Au-TLA) são semelhantes em formato, mas apresentam diferenças nos valores de R_{ct} . No caso do eletrodo de ouro sem modificação e do Au-CYS, o processo de transferência de elétrons (elétron e contra-íon) através das interfaces é muito rápido, pois os espectros de impedância destes eletrodos se apresentam praticamente na forma de uma reta. Diferentemente, no Au-MPA, Au-MUA e no Au-

TLA, o processo torna-se mais lento, sendo caracterizado pela presença de uma região semicircular grande.

A partir desses diagramas obtiveram-se valores das propriedades elétricas do sistema estudado, como resistências, capacitância, e frequência máxima do semicírculo. Os parâmetros obtidos para os eletrodos modificados estão listados na Tabela 14.

Tabela 14 - Parâmetros obtidos a partir dos dados de impedância (Diagramas de Nyquist) dos diferentes eletrodos.

Eletrodo	R_s (Ωcm^2)	R_{ct} (Ωcm^2)	$\omega_{\text{máx}}$ (Hz)
Au	104,42	276,9	$2,47 \cdot 10^3$
Au-CYS	102,10	172,6	$3,61 \cdot 10^3$
Au-MPA	98,4	1736,2	215,4
Au-MUA	104,08	$1,45 \cdot 10^{+7}$	$112,3 \cdot 10^{-3}$
Au-TLA	117,35	2030,1	170

* R_s – resistência da solução; R_{ct} - resistência transferência de carga; $\omega_{\text{máx}}$ - frequência máxima.

Como esperado, os valores de R_s são muito similares para os eletrodos estudados, mas apresentam diferenças nos valores de R_{ct} . De acordo com os resultados obtidos o eletrodo Au-MUA possui a maior resistência de transferência de carga comparada às outras SAMs. Este fato está de acordo com a literatura, como no trabalho de Kissling *et al* [148] o efeito de bloqueio induzido pelo MUA se manifestou por um aumento de mais de 3 ordens de magnitude em R_{ct} comparada ao eletrodo sem modificação. Confirmando que monocamadas formadas por moléculas de cadeias longas, bloqueiam e dificultam a transferência de elétrons. O eletrodo Au-TLA apresentou a segunda maior resistência, seguida do Au-MPA, do

Au e o menor valor apresentado foi o Au-CYS. A modificação com CYS facilitou a resposta eletroquímica, pois sua resistência de transferência de carga foi menor que a apresentada pelo ouro sem modificação, indicando que o modificador é mais sensível a este processo.

No caso das resistências faz-se uma extrapolação do semicírculo para o eixo real (Z'), enquanto a capacitância é obtida relacionando-se a frequência no máximo do semicírculo com a resistência de transferência de carga. A partir destes dados obtidos, calculou-se a capacitância através da seguinte equação 6 [152].

$$C = \frac{1}{2 \pi f_{m\acute{a}x} R_{ct}} \quad (\text{eq. 6})$$

Onde C é a capacitância (F), $f_{m\acute{a}x}$ ou $\omega_{m\acute{a}x}$ corresponde a frequência no ponto máximo (Hz) do arco capacitivo e R_{ct} é a resistência de transferência de carga os dados obtidos estão apresentados na Tabela 15. Adicionalmente, os experimentos de EIE permitem avaliar a influência das SAMs sobre a constante aparente de velocidade do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$. Considerando que a reação eletroquímica está em equilíbrio ea concentração do oxidante e redutor são iguais, a constante aparente de velocidade (k_{app}) pode ser expressa como equação 7 [130, 153].

$$k_{app} = \frac{RT}{F^2 R_{ct} C} \quad (\text{eq.7})$$

Onde C é a concentração (mol L^{-1}) do complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$, R_{ct} é a resistência de transferência de carga, R é a constante física dos gases, T é a

temperatura e F é a constante de faraday, os dados obtidos estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Estimativa da capacitância e da constante aparente de velocidade dos diferentes eletrodos modificados.

<i>Eletrodo</i>	<i>C ($\mu\text{F cm}^{-2}$)</i>	<i>Kapp (cm s^{-1})</i>
Au-CYS	25,6	$1,93 \cdot 10^{-7}$
Au-MPA	42,6	$1,92 \cdot 10^{-8}$
Au-MUA	97,8	$2,29 \cdot 10^{-12}$
Au-TLA	46,1	$1,63 \cdot 10^{-8}$

A capacitância do filme SAM representa a soma em série das capacitâncias do filme e das duplas camadas nas interfaces substrato/filme e filme/solução. Os valores obtidos para as SAMs, são da ordem de 25,6 a 97,8 $\mu\text{F cm}^{-2}$, nota-se que os valores de capacitância aumentam enquanto os valores de resistência de transferência de carga dos filmes SAMs diminuem. Esse fato indica que as SAMs formaram um filme protetor sobre a superfície do ouro, dificultando o processo de transferência de carga na interface metal/meio.

Como apresentado na Tabela 15, o eletrodo Au-CYS apresentou o maior valor na constante aparente de velocidade, ou seja, as propriedades eletrocatalíticas que surgiram com a imobilização da CYS sobre o eletrodo de ouro fez com que diminuíssem a resistência de transferência de carga, acelerando a velocidade da reação redox. Esse aumento no valor de Kapp está em concordância com os experimentos de voltametria cíclica, que mostraram que o Au-CYS melhora a reversibilidade, aumenta as correntes de pico, e desloca para valores mais negativos.

O eletrodo que apresentou maior recobrimento da superfície foi o Au-MUA, o qual possui uma cobertura bastante densa e homogênea, sendo assim sua constante aparente de velocidade torna-se bastante baixa, comparada aos outros eletrodos, o que é esperado para as monocamadas de cadeias longas [130]. Os eletrodos Au-MPA e o Au-TLA apresentaram valores próximos de recobrimento e de velocidade de transferência de elétrons. Em concordância ao observado na voltametria cíclica, a transferência de elétrons é um pouco mais facilitada no MPA ($K_{app} = 1,92 \times 10^{-8} \text{ cm s}^{-1}$), o qual apresenta caráter mais reversível que o TLA ($K_{app} = 1,63 \times 10^{-8} \text{ cm s}^{-1}$). Os espectros de impedância eletroquímica confirmam os resultados obtidos pela voltametria cíclica.

4.6 Caracterização dos eletrodos de ouro modificados na presença do analito

4.6.1 Detecção da Dopamina

A utilização de eletrodos de ouro modificados com SAMs oferece vantagens em função de suas propriedades. A dimensão da monocamada, que se situa em escala molecular, evita uma difusão lenta das espécies eletroativas para a superfície, principalmente quando comparada com a cinética apresentada pelos eletrodos modificados com filmes poliméricos finos ou por compósitos. A possibilidade de se obter uma estrutura molecular ordenada, orientada, faz com que seja possível otimizar processos de transferência de elétrons que são fundamentais no desenvolvimento de sensores químicos.

De modo geral, as respostas dos eletrodos foram atribuídas à oxidação da dopamina para dopaminaquinona, na varredura para potencial anódico. Esse processo redox é bastante descrito na literatura [154] e é caracterizado por

apresentar dois elétrons e dois prótons envolvidos na reação, como representado na Figura 45.

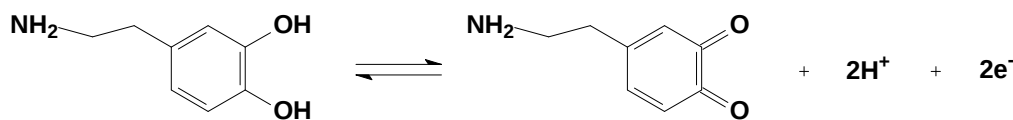


Figura 45 – Representação esquemática da oxidação da dopamina para dopaminaquinona.

Neste contexto, as SAMs obtidas foram utilizadas para avaliar a influência dos grupos carboxílicos (MPA, MUA e TLA) e dos grupos amina (CYS) para determinação da dopamina, conforme Figura 46.

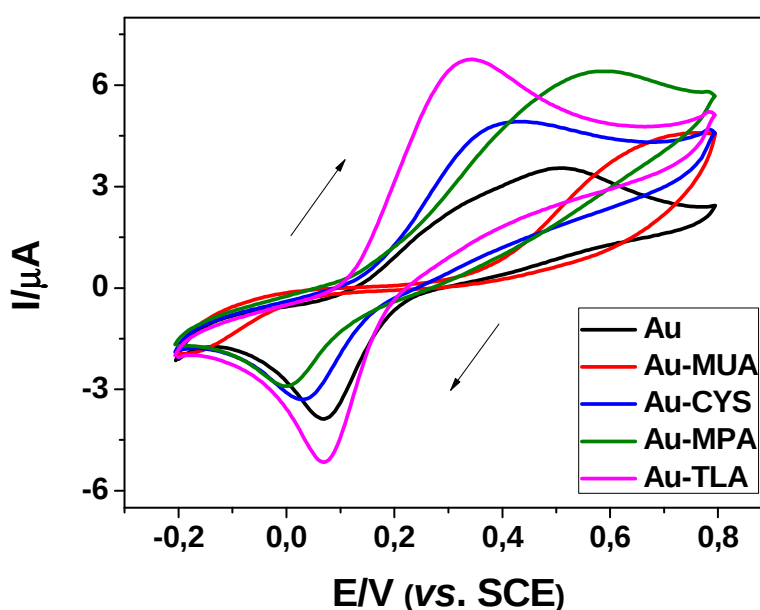


Figura 46 - Voltamogramas cíclicos dos diferentes eletrodos na presença de dopamina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, em solução PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} .

Os produtos da oxidação da dopamina (dopaminaquinona) tendem a adsorver sobre a superfície do ouro causando passivação do mesmo, diminuindo a seletividade e sensibilidade. No entanto, a adição das SAMs sobre a superfície pode produzir uma melhora significativa no comportamento eletroquímico da DA, evitando

a passivação e aumentando a sensibilidade do eletrodo. Através dos voltamogramas obtidos para as diferentes SAM na presença da dopamina, foi possível estimar alguns parâmetros eletroanalíticos, mostrados na Tabela 16.

Tabela 16 – Valores de correntes, potenciais e ΔE_p para oxidação da dopamina.

SAM	Epa (V)	Ipa (μA)	$\Delta E_p(mV)$
Au	0,49	2,18	433
Au-MUA	0,67	1,03	840
Au-CYS	0,38	2,84	376
Au-MPA	0,56	2,57	576
Au-TLA	0,34	5,00	260

Os eletrodos Au-CYS, Au-MPA e Au-TLA formam monocamadas menos densas, ordenadas e estáveis sobre o ouro, as quais são muito curtas para efetivamente bloquear a transferência de elétrons em sua superfície. Verificou-se que estas facilitaram a transferência de elétrons, aumentando a corrente de pico anódica em relação ao eletrodo de ouro. Uma exceção foi a SAM Au-MUA, sobre a qual a DA apresentou uma oxidação praticamente irreversível e um Epa bastante positivo (Epa= 0,670 V). Tal comportamento é atribuído, como já discutido anteriormente, ao maior tamanho da cadeia do MUA, o qual bloqueia a transferência eletrônica, diminuindo significativamente a corrente de pico e conseqüentemente a sensibilidade do eletrodo, provavelmente devido ao alto grau de recobrimento da superfície.

O voltamograma do ouro sem modificação na presença da dopamina apresentou um pico de oxidação praticamente irreversível com ΔE_p de 433 mV. No

entanto, um par de picos redox bem definido referente a oxidação da DA é observada no Au-TLA, com o ΔE_p de 260 mV, o qual apresentou a maior corrente de pico anódica, além da DA oxidar em um potencial menos positivo em relação aos demais eletrodos. Os resultados acima sugerem que o Au-TLA promoveu uma reação eletroquímica da dopamina mais efetiva e reversível.

4.6.2 Detecção do Ácido ascórbico

O ácido ascórbico está presente nos seres vivos, é uma vitamina essencial na dieta humana, além de ser muito popular por suas propriedades antioxidantes, sendo utilizada para a prevenção e tratamento de diversas doenças [155]. Este se encontra presente nos fluídos biológicos em uma concentração 1000 vezes maior que a dopamina. O AA é um problema na determinação do neurotransmissor DA, devido a similaridades dos potenciais de oxidação de ambas as espécies em pH fisiológico. A reação de oxidação do AA está representada na Figura 47 abaixo.

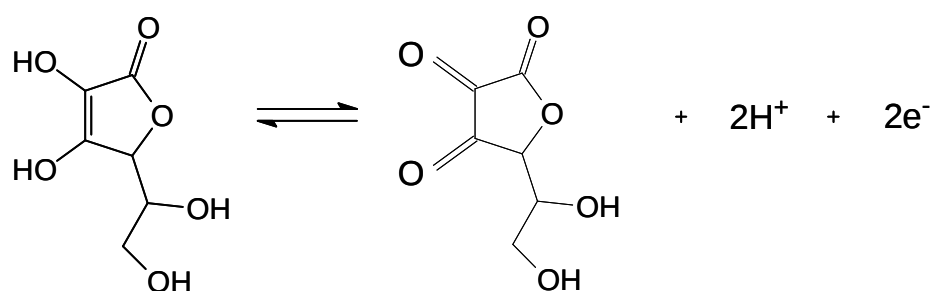


Figura 47 - Processo de oxidação do ácido ascórbico

Neste contexto, as SAMs obtidas também serão utilizadas para avaliar a influência dos grupos carboxílicos (MPA, MUA e TLA) e dos grupos amina (CYS) para determinação do ácido ascórbico, conforme Figura 48.

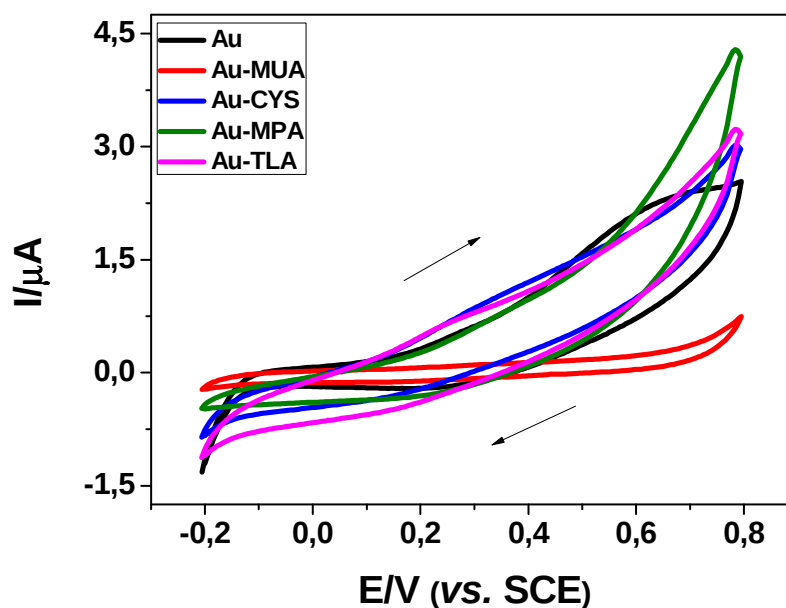


Figura 48 - Voltamogramas cíclicos dos diferentes eletrodos na presença de ácido ascórbico $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, em solução PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. Velocidade de varredura: 100 mVs^{-1} .

De acordo com os voltamogramas apresentados nas figuras, pode-se constatar que os eletrodos modificados com as diferentes SAMs, não são sensíveis a este tipo de fármaco, uma vez que não apresentaram picos de corrente definidos referentes aos processos de oxidação e redução do AA, diferentemente do observado para a DA.

Estas monocamadas auto-organizadas sobre a superfície do ouro bloqueiam a resposta da eletro-oxidação do AA. Elas formam uma camada compacta a qual previne a transferência de elétrons entre o AA e o eletrodo. Tal fato pode ser explicado em função do pK_a do AA e das diferentes SAMs. Em pH maiores que 5 tanto a superfície SAM como o ácido ascórbico (na forma de ascorbato) estão carregados negativamente. A repulsão eletrostática entre a carga negativa da monocamada [156] e AA ($pK_a = 4,2$) [157] conduz a diminuição da transferência de elétrons.

Como era esperado o Au-MUA apresentou menor resposta voltamétrica comparada aos diferentes eletrodos de cadeias curtas, devido ao tamanho de sua cadeia carbônica. Os eletrodos Au-CYS, Au-MPA e o Au-TLA apresentaram um comportamento bastante similar na detecção do AA, pois suas estruturas são parecidas e o bloqueio da superfície ocorre de forma uniforme nas diferentes SAMs.

Além disso, diferentes concentrações de AA foram adicionadas, conforme Figura 49, para verificar e investigar o comportamento do eletrodo modificado. Sendo utilizada neste estudo a monocamada que apresentou melhor resposta eletroquímica na presença da dopamina, a SAM de ácido tioláctico (Au-TLA).

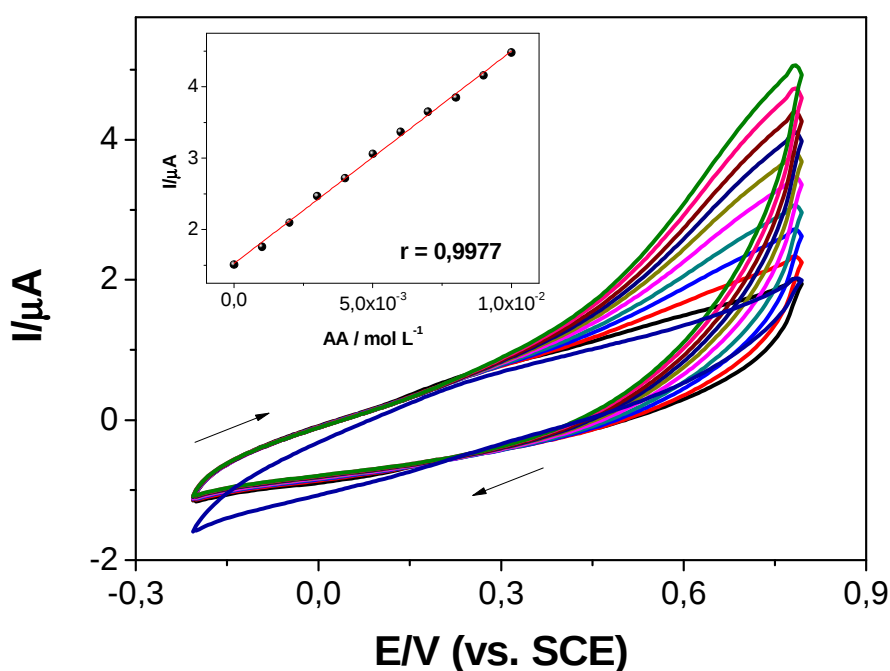


Figura 49 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo Au-TLA com adições de AA (branco, 1×10^{-2} , 9×10^{-2} , 8×10^{-2} , 7×10^{-2} , 6×10^{-2} , 5×10^{-2} , 4×10^{-2} , 3×10^{-2} , 2×10^{-2} a $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AA) em solução Tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} . Gráfico inserido: Relação entre a I_{pa} em função da concentração de DA.

Não há evidências dos picos de oxidação conforme demonstra a Figura 49 do eletrodo Au-TLA com o aumento da concentração do AA. Verificou-se um aumento

linear ($r = 0,9977$) da corrente anódica com o aumento da concentração de AA, a partir de 0,5 V, provavelmente devido ao aumento das espécies em solução.

4.6.3 Aplicação do eletrodo Au-TLA como possível sensor para dopamina

Dentre as monocamadas analisadas, a SAM formada pelo ácido tioláctico (Au-TLA) foi a que apresentou resultados mais satisfatórios quanto a sensibilidade e seletividade em relação ao analito DA. Este resultado foi surpreendente, pois o TLA não é muito utilizado em outros trabalhos. Em um dos trabalhos descritos na literatura, Wang *et al* [138] utilizaram o TLA para a formação da monocamada sobre a superfície do ouro, o qual catalisa a reação eletroquímica da norepinefrina (NE) pela voltametria cíclica. Um par de picos redox bem definidos foram obtidos e a constante de velocidade padrão foi calculada (K_s) foi de $5,11 \times 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$ no eletrodo modificado com a SAM. A corrente de pico apresentou-se linear com a concentração de NE na faixa de $4,0 \times 10^{-5}$ a $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com um limite de detecção é de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Por espectroscopia de impedância ac a constante aparente de velocidade de elétrons (K_{app}) de $\text{Fe(CN)}_3^{3-}/\text{Fe(CN)}_4^{4-}$ na eletrodo Au-TLA foi calculada de $2,5 \times 10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$.

A estrutura química do composto DA tem três prótons com atividade ácida ($\text{pKa}_1 = 8,61$, $\text{pKa}_2 = 9,95$, $\text{pKa}_3 = 12,03$). DA é sensível ao oxigênio e a luz de acordo com uma função do pH sobre o processo de oxidação DA. Os grupos fenólicos em DA são facilmente oxidável em um forma quinona e, portanto, DA livres deterioram-se em meio alcalino [158]. Desta forma, com o intuito de se otimizar as condições mais propícias para a determinação de DA neste eletrodo, primeiramente realizou-se um estudo em diferentes pH do meio na presença deste analito, pois este é um fator significativo.

Em geral, ao analisar os voltamogramas apresentados na Figura 50, verifica-se que os potenciais de pico deslocaram-se para valores menos positivos com o aumento do pH.

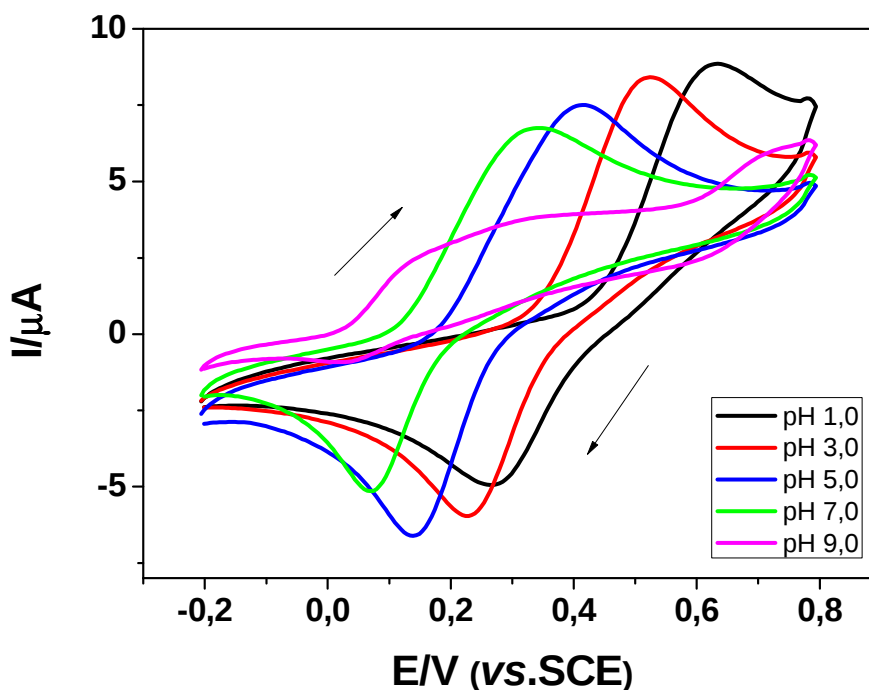


Figura 50 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo Au-TLA em solução tampão BR na presença de dopamina $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH. Velocidade de varredura 100 mV s^{-1} .

De acordo com os valores de corrente de pico verificou-se que a corrente faradaica, assim como o potencial variam com o pH indicando que a transferência eletrônica é dependente da concentração hidrogeniônica do meio demonstrados na Figura 51.

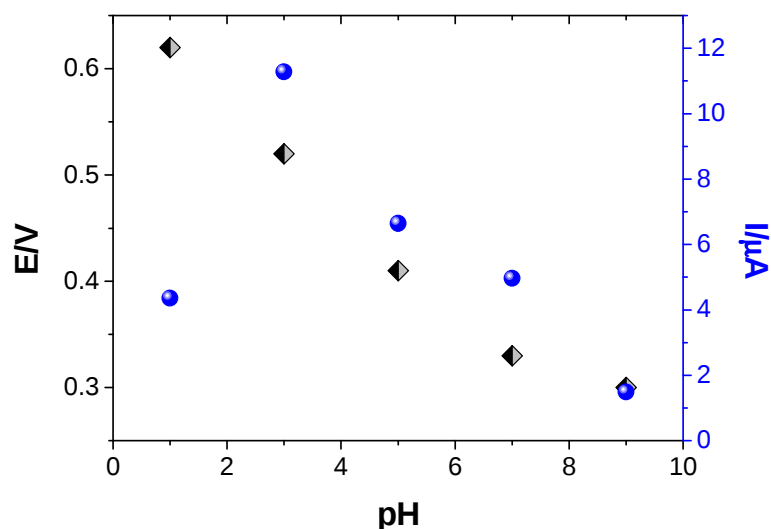


Figura 51 – Relação entre E_p vs pH e a I_p vs pH, em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ contendo dopamina 0,1 mmol L⁻¹

Analisando os resultados apresentados na Figura 51, pode ser observado que no pH 3,0 o eletrodo apresentou maior corrente de pico, no entanto o potencial de pico de oxidação encontra-se em um valor muito positivo, e apresenta uma variação dos potenciais grande, tornando a reação menos reversível. As correntes de pico anódica e catódica apresentaram um decaimento progressivo com o aumento do pH. Tal decréscimo foi mais pronunciado em meio básico, no pH 9,0 indicando a desprotonação da DA, uma vez que em solução, os valores de pKa de molécula são 8,61 (pKa₁) e 9,95 (pKa₂), este efeito proporcionou um aumento da repulsão da SAM pelas moléculas de DA. Além disso, moléculas de DA livres são pouco estáveis em meio alcalino [158].

Desta forma, a faixa de pH entre pH 5,0 a 7,0, são mais indicadas para fins analíticos devido deslocarem os potenciais para valores mais negativos e a reação redox da DA ser mais reversível, facilitando a resposta eletroquímica do sensor Au-TLA.

Analisando o comportamento do eletrodo Au-TLA na faixa de $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em meio de tampão PBS 0,1 mol L⁻¹ em pH 7,0 verifica-se que a variação das correntes de pico é linear com o aumento da concentração da dopamina (Figura 52).

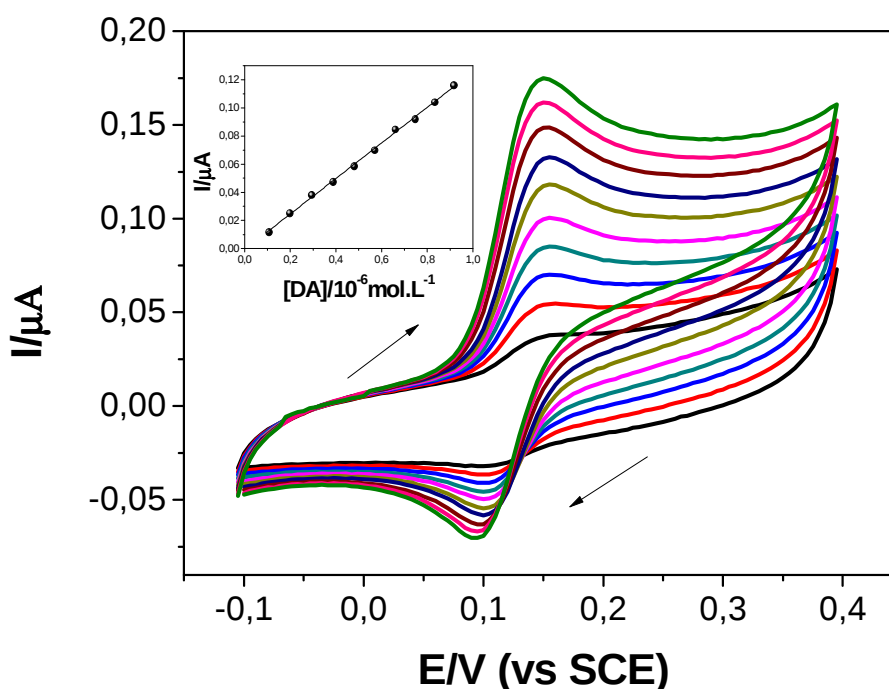


Figura 52 – Voltamogramas cíclicos do eletrodo Au-TLA na presença de DA em diferentes concentrações ($1,07 \times 10^{-7}$, $1,98 \times 10^{-7}$, $2,94 \times 10^{-7}$, $3,88 \times 10^{-7}$, $4,80 \times 10^{-7}$, $5,7 \times 10^{-7}$, $6,6 \times 10^{-7}$, $7,47 \times 10^{-7}$, $8,33 \times 10^{-7}$, $9,17 \times 10^{-7}$ mol. L⁻¹) em Tampão PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. Velocidade de varredura 100 mV s⁻¹. Gráfico inserido: Relação entre a Ipa em função da concentração de DA.

A Figura 52 inserida mostra a curva analítica obtida pela relação de Ipa vs [DA] onde verifica-se que a corrente aumenta linearmente com a concentração da dopamina. Para a determinação do limite de detecção utilizou-se o desvio padrão da média aritmética das correntes obtidas de dez voltamogramas de brancos, no mesmo potencial do pico de oxidação da dopamina, e a relação:

$$LD = \frac{3S_b}{b} \quad (\text{eq.8})$$

onde S_B é o desvio padrão da média aritmética das correntes obtidas dos brancos e b o valor do coeficiente angular da curva analítica.

O limite de quantificação (LQ) foi calculado a partir da média aritmética de 10 voltamogramas do branco, seguindo os mesmos critérios do LD, para a seguinte relação:

$$LQ = \frac{10S_b}{b} \quad (\text{eq. 9})$$

Os parâmetros analíticos obtidos a partir da curva estão descritos na Tabela 17.

Tabela 17 – Parâmetros analíticos obtidos pela técnica de voltametria cíclica em meio a DA na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Equação da reta	r	Sensibilidade $\mu\text{A/molL}^{-1}$	LD (limite de detecção)	LQ (limite de quantificação)
$Y = 0,0199 + 0,1267 x$	0,9994	0,1267	$1,42 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$	$4,74 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$

4.6.4 Aplicação analítica

Visando a determinação de baixas concentrações de DA, foi necessário inicialmente estudar as melhores condições operacionais para sua determinação por voltametria de onda quadrada. De acordo com os dados obtidos pela voltametria cíclica, optou-se trabalhar com o eletrólito suporte em torno do pH 7,0 pois a DA apresenta melhor comportamento voltamétrico nesta faixa. Assim testes de eletroatividade em diferentes eletrólitos suporte foram realizados neste valor de pH visando selecionar aquele onde uma resposta ótima de corrente e potencial de pico fosse obtida, conforme Figura 53. Os eletrólitos suporte utilizados foram: tampão BR, tampão PBS, tampão ácido-bórico, tampão ácido cítrico-fosfato e KCl. Dentre todos

eletrólitos obteve-se uma melhor resposta voltamétrica em solução tampão fosfato salino pH 7,0. Portanto, essas condições foram utilizadas em experimentos posteriores.

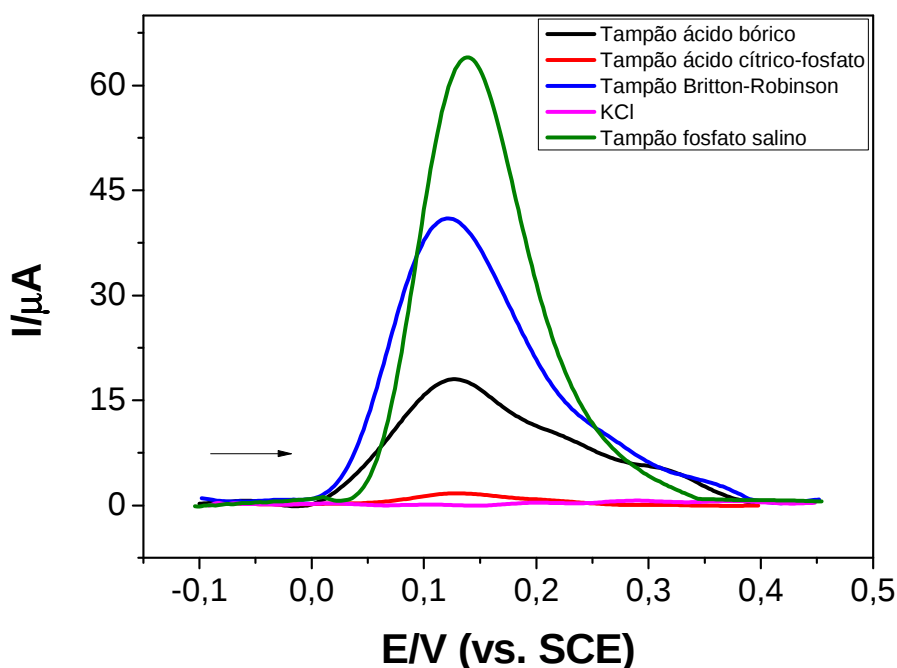


Figura 53 – Voltamogramas de onda quadrada do eletrodo Au-TLA em diferentes eletrólitos suporte. ($\Delta E_s = 2$ mV, $a = 50$ mV e frequência de 100 Hz, $[DA] = 1,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$)

No desenvolvimento de um método eletroanalítico faz-se necessário a otimização dos parâmetros eletroanalíticos pela voltametria de onda quadrada, de forma a melhorar significativamente a resposta voltamétrica. Os parâmetros que podem influenciar são a frequência de pulsos de potencial (f), amplitude de pulso de potencial (a) e o incremento de varredura de potencial (ΔE_s).

O primeiro parâmetro selecionado para a otimização foi o incremento de varredura de potencial do sinal analítico, variado no intervalo de 1 a 8 mV, mantendo-se os demais parâmetros nos valores padrões de amplitude de potencial (50 mV) e frequência (100 Hz), conforme Figura 54.

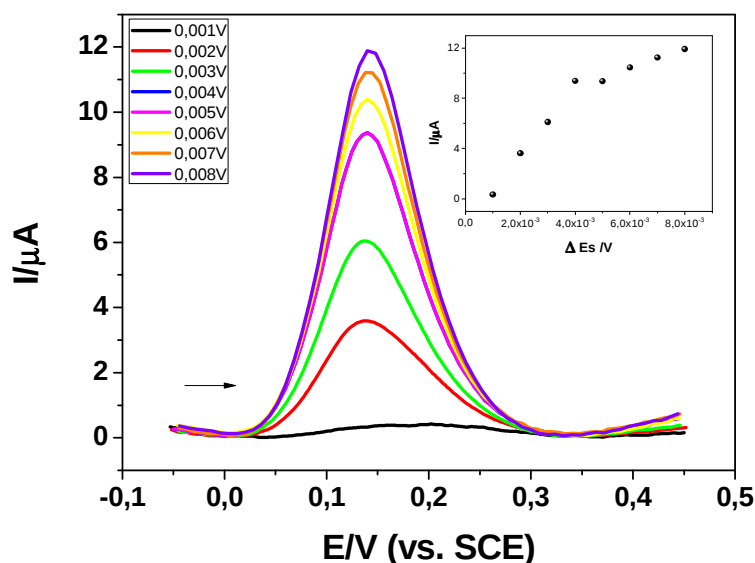


Figura 54 - Variação do incremento da varredura de potencial na presença da DA $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\alpha = 50 \text{ mV}$, $f = 100\text{Hz}$), utilizando-se o eletrodo Au-TLA. Gráfico inserido: dependência da corrente de pico com o incremento da varredura de potencial.

O incremento de potencial é um dos responsáveis pela definição da velocidade de varredura de potenciais, já que esta é dada pelo produto do incremento de potencial pela frequência de aplicação dos pulsos de potencial [159].

Através dos voltamogramas obtidos, observa-se um aumento da magnitude da corrente de pico com o aumento do incremento da varredura do potencial, melhorando a sensibilidade da análise, e um leve deslocamento dos potenciais de pico a partir do ΔE_s de 5 mV para valores mais positivos. No gráfico de corrente versus o incremento (Figura inserida), observa-se que a corrente variou com o incremento linearmente até 4 mV, apresentando uma segunda faixa linear de 5 a 8 mV. Dessa forma, optou-se em trabalhar com um menor valor de incremento da varredura de potencial sendo de 4 mV.

O próximo parâmetro estudado foi a influência da amplitude de pulso de potencial na corrente de pico para a detecção da DA sobre o eletrodo de Au-TLA, no

intervalo de 5 a 80 mV, mantendo já o melhor valor de incremento da velocidade de potencial (ΔE s) de 4 mV e a frequência de 100 Hz, conforme Figura 55.

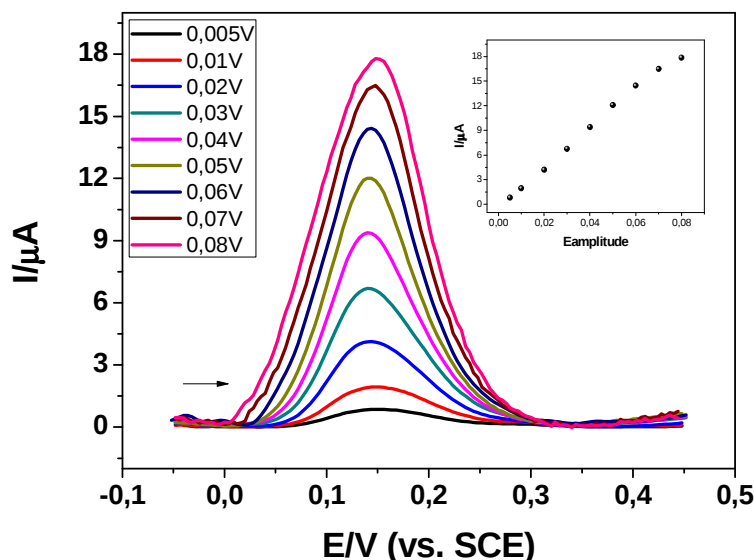


Figura 55 - Variação da amplitude de pulso de potencial na presença de DA 1×10^{-5} mol L $^{-1}$ em tampão PBS 0,1 mol L $^{-1}$ (ΔE s = 4 mV, f = 100 Hz), utilizando-se o eletrodo Au-TLA. Gráfico inserido: Dependência da corrente de pico com a amplitude de pulso de potencial.

A Figura 55 mostra os voltamogramas obtidos para a oxidação da DA em diferentes valores de amplitude de pulso de potencial. Observa-se um aumento linear da amplitude, onde ocorre um pequeno deslocamento no valor de potencial de pico para valores menos positivos na faixa de 5 a 40 mV e acima destes ocorre um deslocamento para potenciais mais positivos. O menor valor de $E_{p1/2}$ encontrado foi para a amplitude de 40 mV onde o processo apresenta-se mais seletivo. A amplitude selecionada para os próximos estudos foi de 40 mV.

Por fim, o último parâmetro a ser estudado foi o efeito da frequência no sinal analítico, pois ela determina a intensidade do pico e melhora a sensibilidade da análise. Foi variado os valores de frequência de 10 a 100 Hz, com o incremento da velocidade de potencial de 4 mV e a amplitude de pulso de 40 mV. Os resultados obtidos para esse estudo são apresentados na Figura 56.

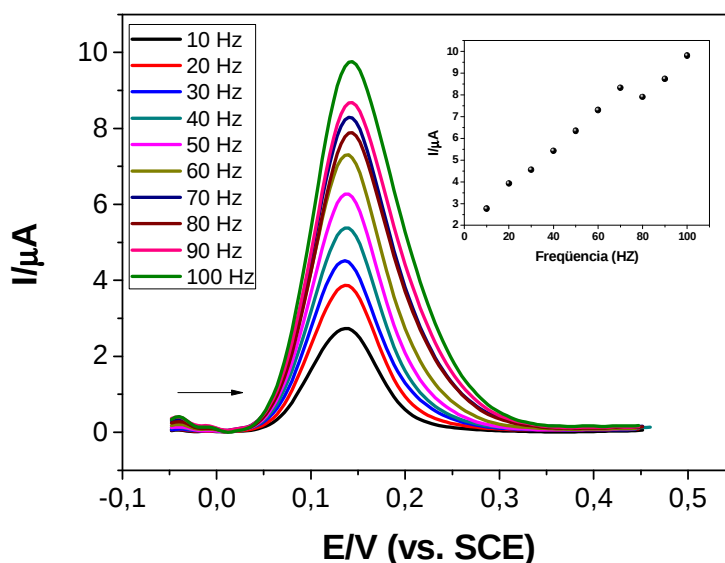


Figura 56 - Variação da frequência de aplicação dos pulsos de potencial na presença da $[DA] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$), utilizando-se o eletrodo Au-TLA. Gráfico inserido: Dependência da corrente de pico com a frequência de aplicação dos pulsos de potencial.

Observa-se um aumento de magnitude da corrente de pico com o aumento da frequência no intervalo de 10 a 70 Hz. No entanto a partir desta frequência de 70 Hz a corrente de pico deixa de ser linear, a apresenta uma nova inclinação na faixa de 80 a 100 Hz. Ocorreu um leve deslocamento dos potenciais de pico para valores mais positivos a partir da frequência de 60 Hz, portanto optou-se em trabalhar neste valor, pois o potencial de pico encontra-se em um valor mais negativo e a sua corrente de pico apresenta um bom sinal analítico não sofrendo alargamento e nem distorção de pico.

Para a dopamina o aumento da frequência de aplicação de pulsos de potencial não promoveu um aumento linear da corrente de pico em função da raiz quadrada da frequência. Este comportamento é característico de sistemas quase-reversíveis, de acordo com os critérios de diagnóstico da técnica [159].

Com a finalidade de verificar a reversibilidade do comportamento eletroquímico da dopamina observado pela técnica de voltametria cíclica, utilizou-se

a técnica de voltametria de onda quadrada para comprovar este efeito. Foi realizado um voltamograma de onda quadrada em tampão PBS contendo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de dopamina, utilizando-se os parâmetros anteriormente otimizados. Na Figura 57 está apresentada a separação das componentes de corrente.

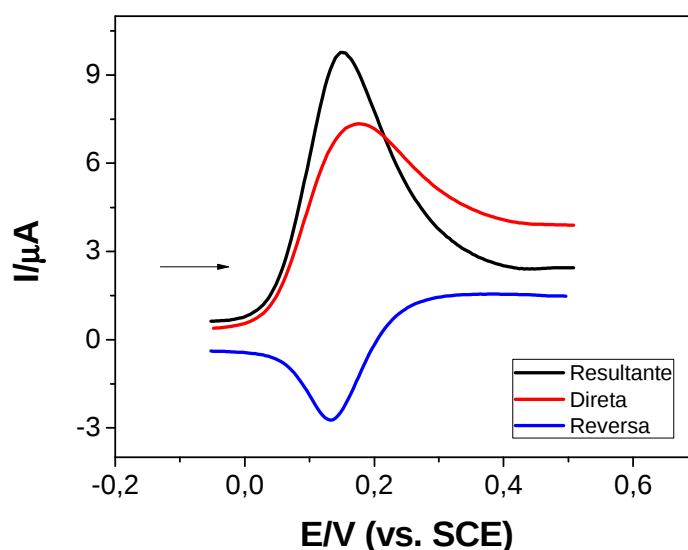


Figura 57 - Voltamogramas de onda quadrada do eletrodo Au-TLA na presença de $[DA] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, $f = 60 \text{ s}^{-1}$ e pH 7,0 com a separação das componentes de corrente direta, reversa e resultante

O pico de oxidação da DA mostrou boa definição nas curvas, apresentando separação das componentes de corrente direta, reversa e resultante. Também pode ser observado que a corrente resultante é maior que a corrente direta, enquanto a corrente reversa apresenta um pico de menor intensidade. Esse comportamento é esperado para um sistema quase-reversível, onde a corrente direta apresenta um sinal 50% maior que a corrente reversa [122].

Após otimização das melhores condições de trabalho e dos parâmetros que envolvem a técnica, a curva analítica foi construída. Realizaram-se medidas voltamétricas no intervalo de -0,1 a 0,5 V versus SCE em diferentes concentrações

de DA, de $1,07 \times 10^{-7}$ a $6,6 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ em tampão PBS, empregando o eletrodo Au-TLA, conforme Figura 58.

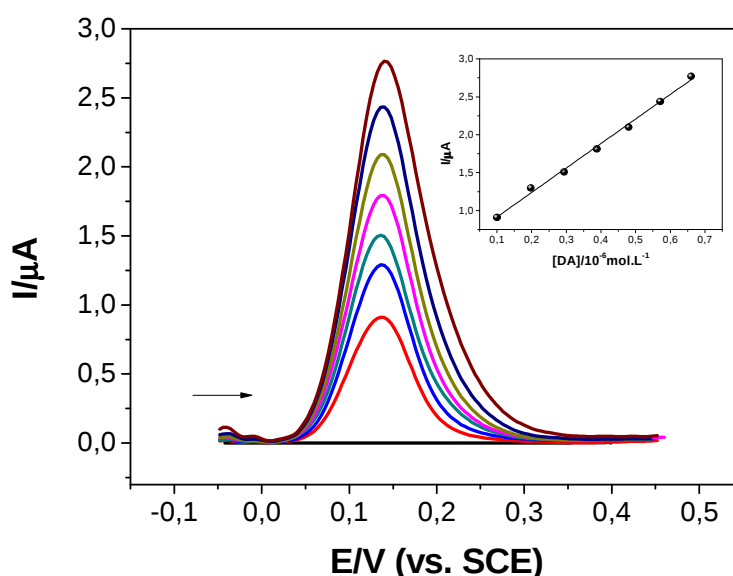


Figura 58 – Voltamogramas de onda quadrada do eletrodo Au-TLA na presença de DA em diferentes concentrações ($1,07 \times 10^{-7}$, $1,98 \times 10^{-7}$, $2,94 \times 10^{-7}$, $3,88 \times 10^{-7}$, $4,80 \times 10^{-7}$, $5,7 \times 10^{-7}$, $6,6 \times 10^{-7}$ mol. L⁻¹). Parâmetros utilizados: $\Delta E_s = 4$ mV, $a = 40$ mV e $f = 60$ Hz.

A curva de calibração obtida por regressão linear para o eletrodo na presença de DA e sua respectiva equação da reta, coeficiente de correlação (r), sensibilidade, limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), são mostrados na Tabela 18.

Para a determinação do limite de detecção utilizou-se o desvio padrão da média aritmética das correntes obtidas de dez voltamogramas de brancos, no mesmo potencial do pico de oxidação da dopamina, segundo a equação 8. O limite de quantificação (LQ) foi calculado a partir da média aritmética de 10 voltamogramas do branco, seguindo os mesmos critérios do LD, conforme a equação 9.

Tabela 18 – Parâmetros analíticos obtidos pela técnica de voltametria de onda quadrada em meio a DA na faixa de concentração de $1,07 \times 10^{-7}$ a $6,6 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

Equação da reta	r	Sensibilidade $\mu\text{A/mol L}^{-1}$	LD (limite de detecção)	LQ (limite de quantificação)
$Y = 0,591 + 3,233x$	0,9948	3,233	$4,77 \times 10^{-8}$ mol L ⁻¹	$1,59 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹

O valor calculado para o limite de detecção da dopamina ($4,77 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada foi menor e mais sensível comparado a VC ($1,42 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹). No entanto a VC apresentou melhor coeficiente de correlação (0,9994) comparada a VOQ.

O valor de LD corresponde a menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato. Na prática, isto significa que esta é a menor concentração do analito que pode ser diferenciada do ruído do aparelho com segurança [160]. Portanto conforme os dados obtidos, a VOQ apresentou um LD menor comparada a técnica VC. Isso representa que o eletrodo Au-TLA proporciona melhor sensibilidade e melhores condições para aplicação como sensor, quando utiliza a técnica de VOQ.

4.6.5 Estudo da detecção de DA na presença de AA

A DA e o AA coexistem no fluído extracelular do sistema nervoso central e no soro, os quais possuem potenciais de oxidação similares em eletrodos sólidos convencionais. Quando se utiliza o eletrodo de ouro sem modificação para determinação do ácido ascórbico (AA) e da dopamina (DA), os potenciais de pico de oxidação do destas espécies são muito próximos uns dos outros e, portanto, torna-se difícil separar estes compostos nestas condições.

Ao utilizar a Au-TLA, à princípio este problema pode ser minimizado, uma vez que o filme de ácido tioláctico ($pK_a = 4,5$), em pH 7,0 está em sua forma aniônica na superfície do eletrodo de trabalho, podendo atrair moléculas de DA, que estão principalmente na sua forma catiônica neste pH ($pK_a = 8,9$). Por outro lado, nestas mesmas condições a molécula de AA está na forma aniônica ($pK_a = 4,2$), assim como o ácido tioláctico, podendo sofrer uma repulsão eletrostática pela monocamada, impossibilitando a sua chegada à superfície do eletrodo.

A Figura 59 mostra uma comparação entre o voltamograma cíclico do Au-TLA na presença da DA e outro na presença do AA.

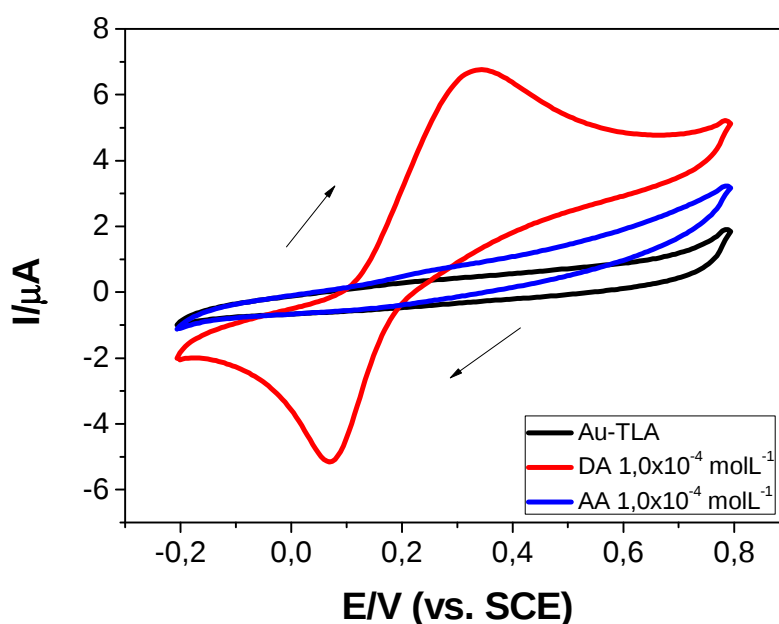


Figura 59 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo Au-TLA em solução Tampão PBS 0,1mol L⁻¹ em pH 7,0, velocidade de varredura 100 mV s⁻¹, na presença de AA e DA.

Analisando estes voltamogramas pode-se concluir que a presença de AA não interfere significativamente na determinação de dopamina, pois o voltamograma do branco (resposta do eletrólito) não apresentou diferença significativa na sua resposta eletroquímica quando adicionado o AA, na concentração de 1×10^{-4} mol L⁻¹.

Os resultados mostraram que o eletrodo Au-TLA é um eficiente sensor para a detecção da DA e não apresenta resposta relevante para o AA, o que desperta interesse na investigação da seletividade e sensibilidade do eletrodo para a determinação da DA sem a interferência do AA.

A separação das respostas eletroquímicas dessas espécies é um desafio devido aos seus sinais sobrepostos, quando utiliza-se a técnica de voltametria cíclica. Para obter correntes de pico bem definidas e em alta velocidade de varredura detectou a DA em meio de AA através da técnica de voltametria de onda quadrada, segundo a Figura 60.

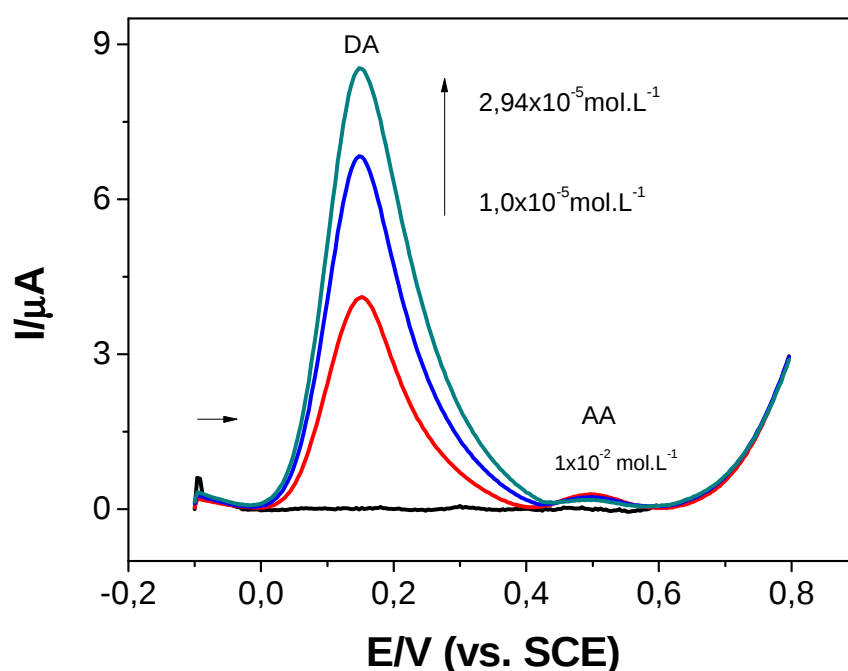


Figura 60 – Voltamogramas de onda quadrada da DA (na faixa de $1,0$ a $2,94 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) na presença de AA ($1,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ - concentração fixa). Parâmetros utilizados: $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $f = 60 \text{ Hz}$.

Os voltamogramas de onda quadrada obtidos para o eletrodo Au-TLA demonstraram a separação das respostas eletroquímicas do AA e DA quando adicionados simultaneamente. Foram observados dois picos de oxidação, em 150

mV e 490 mV (de menor intensidade) relacionados com as reações redox de DA e AA, respectivamente. Esses resultados possibilitam a detecção da DA sem interferência do AA, uma vez que oxidam em potenciais diferentes, com uma separação de pico de 340 mV, esses valores estão de acordo com a literatura. [104, 155].

O ácido ascórbico sofreu um grande deslocamento de potencial de oxidação comparado ao seu comportamento na literatura [155], no qual o pico característico do AA é encontrado em potenciais mais negativos que os da DA. Esse fato ocorre devido às repulsões sofridas pelo AA e a monocamada de ácido tioláctico que estão carregadas negativamente, tornando o processo cinético mais lento.

5.0 CONCLUSÃO

Neste trabalho, verificou-se a influência do tipo de SAM utilizada na confecção do eletrodo de ouro modificado. Os eletrodos modificados com monocamadas auto-organizadas do ácido 3-mercaptopropiônico, ácido mercaptoundecanóico, ácido tioláctico e da cistamina foram caracterizados por métodos eletroquímicos. Os eletrodos Au-MPA e o Au-TLA obtiveram melhor recobrimento da superfície no tempo de imersão de 3 horas, enquanto o Au-MUA e o Au-CYS necessitaram de maior tempo de imersão, de 24 horas, devido o MUA ser uma molécula de cadeia longa e a CYS devido a sua imobilização envolver a quebra da ligação S-S.

As SAMs de cadeias curtas apresentaram uma área de eletrodo de aproximadamente 60% de superfície ativa em relação ao eletrodo de ouro sem modificação, enquanto a molécula de MUA reduz essa área para 38%, devido a sua cadeia longa, o que a torna livre de defeitos e *pinholes* mensuráveis.

Uma relação importante foi observada nos estudos de dessorção redutiva das SAMs por meio dos valores de excesso superficial obtidos, os quais foram da ordem de 10^{-8} a 10^{-10} mol.cm² onde foi possível comprovar a existência das monocamadas. Não foram observadas perdas de respostas durante as determinações e os eletrodos se mostraram reprodutíveis em todos os casos. Apesar da renovação da superfície, estes apresentaram relativa estabilidade na escala de tempo dos experimentos realizados.

Através da técnica de EIE, pode-se comprovar que para o eletrodo de ouro sem modificação e do Au-CYS, o processo de transferência de elétrons ocorre de maneira rápida, diferentemente, no Au-MPA, Au-MUA e no Au-TLA, onde o processo torna-se mais lento.

Estes eletrodos foram utilizados para detecção do fármaco dopamina na presença do ácido ascórbico através da voltametria cíclica. O processo redox da molécula de dopamina, sobre todos os eletrodos modificados com SAMs, foi quase-reversível. No entanto, dentre os sistemas estudados, a SAM Au-TLA foi a que apresentou o par de picos redox mais bem definido, com um ΔE_p de 260 mV, além da DA oxidar em um potencial menos positivo em relação aos demais eletrodos. Este resultado foi bastante surpreendente uma vez que o ácido tioláctico não é muito aplicado em sensores nos trabalhos descritos da literatura.

A partir de estudos de pH na presença de DA, observou-se que a melhor faixa para se detectar este analito sobre a Au-TLA sem a interferência do AA é em pH 7,0 uma vez que o filme de ácido tioláctico ($pK_a = 4,5$), neste pH encontra-se em sua forma aniônica na superfície do Au, podendo atrair moléculas de DA, que estão principalmente na sua forma catiônica neste pH ($pK_a = 8,9$). Por outro lado, nestas mesmas condições a molécula de AA está na forma aniônica ($pK_a = 4,2$), assim como o ácido tioláctico, podendo sofrer uma repulsão eletrostática pela monocamada, impossibilitando a sua chegada à superfície do eletrodo.

Medidas de voltametria de onda quadrada utilizando-se o Au-TLA, possibilitaram a determinação de DA com limites de detecção na ordem de $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. A partir desta técnica, pode ser observado que este eletrodo apresentou um comportamento seletivo, distinguindo os picos de oxidação para DA ($E_{pa} = 150 \text{ mV}$) e AA ($E_{pa} = 490 \text{ mV}$), com uma separação de potencial de 340 mV. Tais resultados indicam que o Au-TLA pode ser aplicado como um possível sensor para a determinação simultânea dessas espécies.

Finalmente, a possibilidade de se vislumbrar as propriedades da superfície modificada é muito importante, pois se torna possível prever ou até mesmo estimar

quais espécies podem ser analisadas ou quais processos de imobilização de complexos ou biomoléculas podem se tornar mais eficiente para determinada SAM.

6.0 PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos resultados obtidos, alguns pontos ainda merecem ser estudados com maior profundidade, além de permitir novas possibilidades de continuação deste trabalho:

- Estudos mais aprofundados de Espectroscopia de Impedância eletroquímica na presença do analito DA;
- Caracterização morfológica das monocamadas por Microscopia de Força Atômica (AFM) e/ou Microscopia de Tunelamento (STM).
- Aplicação deste eletrodo em amostras reais (fármacos e plasma sanguíneo);
- Modificação da superfície da superfície SAM com complexos metálicos e/ou enzimas com o intuito de aumentar a seletividade e sensibilidade dos eletrodos desenvolvidos;
- Uma das perspectivas futuras para continuação deste trabalho se concentra em explorar sua aplicação analítica, na determinação simultânea destes fármacos que possuam estruturas similares.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- [1] KATZ H. E.; HUANG J.; **Thin-film organic electronic devices**. Annual reviews of Materials Research, v. 39, n. 1, p. 714-92, 2009.
- [2] ARIGA K; NAKANISHI T.; MICHINOBU T.; **Immobilization of biomaterials to nanoassembled films (self-assembled monolayers, Langmuir-Blodgett films, and layer-by-layer assemblies) and their related functions**. Journal of Nanoscience and nanotechnology, v. 6, n. 8, p. 2278-2301, 2006.
- [3] LOWINSOHN D.; BERTOTTI M.; **Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos**. Química Nova, v. 29, v. 6, p. 1318-1325, 2006.
- [4] FREIRE R. F.; PESSOA C. A.; KUBOTA L. T.; **Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos**. Química Nova, v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003.
- [5] MOSES P. R.; MIER L.; MURRAY R. W.; **Chemically modified tin oxide electrode**. Analytical Chemistry, v. 47, n. 12, p. 1882-1886, 1975.
- [6] LANE R. F.; HUBBARD A. T.; **Electrochemistry of chemisorbed molecules. 1 reactants conneted to electrodes through olefinic substituents**. The Journal of Physical Chemistry, v. 77, n. 11, p. 1401-1410, 1973.
- [7] PEREIRA A. C.; SANTOS A. S.; KUBOTA L. T.; **Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas**. Química Nova, v. 25, n. 6, p.1012-1021, 2002.
- [8] SOUZA M. F. B.; **Eletrodos quimicamente mod ificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem**. Química Nova, v. 20, n. 2, p. 191-195, 1997.
- [9] SHAIDAROVA L. G.; BUDNIKOV G. K.; **Chemically modified electrodes based on noble metals, polymer films, or their composites in organic voltammetry**. Journal of Analytical Chemistry , v. 63, n. 10, p. 922-942, 2008.
- [10] OLIVEIRA A. R. M.; ZARBIN A. J. G; **Um procedimento simples e barato para a construção de um equipamento "dip-coating" para deposição de filmes em laboratório**. Química. Nova, v.28, n. 1, p. 141-144, 2005.
- [11] NASSAR E. J.; CIUFFI K. J.; GONÇALVES R. R.; et. al. **Filmes de titânio-silício preparados por "spin" e "dip-coating"**. Química Nova, v. 26, n. 5, p. 674-677, 2003.

-
- [12] NATSUME Y.; SAKATA H.; **Zinc oxide films prepared by sol-gel spin-coating.** Thin solid films, v. 372, p. 30-36, 2000.
- [13] SHEN C. M.; ZHANG X. G.; LI H. L.; **Influence of different deposition potentials on morphology and structure of CdSe films.** Applied surface science, v. 240, p. 34-41, 2005.
- [14] SEO J.; SCHATTLING P.; LANG T.; et al. **Covalently bonded layer-by-layer assembly of multifunctional thin films base don activated esters.** Langmuir, v. 26, n. 3, p. 1830-1836, 2010.
- [15] YANG X.; SHI J.; JOHNSON S.; et al. **Growth of ultrathin covalently attached polymer films: uniform thin films for chemical microsensors.** Langmuir, v. 14, n. 7, p. 1505-1507, 1998.
- [16] FERNANDES S. C.; MOCCELINI S. K.; SCHEEREN C. W.; et al. **Biosensor for chlorogenic acid based on an ionic liquid containing iridium nanoparticles and polyphenol oxidase.** Talanta, v. 79, p. 222-228, 2009.
- [17] CAO A.; AI H.; DING Y.; et al. **Biocompatible hybrid film of B-cyclodextrin and ionic liquids: A novel platform for electrochemical biosensing.** Sensors and Actuators B: Chemical (2010), doi 10.1016/j.snb.2011.01.22.
- [18] NIEN P. C.; CHEN P. Y.; HO K. C.; **Fabricating na amperometric cholesterol biosensor by a covalent linkage between poly(3-thiopheneacetic acid) and cholesterol oxidase.** Sensors, v. 9, p. 1794-1806, 2009.
- [19] CHEN H.; YUAN R.; CHAI Y.; et al. **Glucose biosensor base don electrodeposited platinum nanoparticles and three-dimensional porous chitosan membranes.** Biotechnology Letter, v. 32, p. 1401 – 1404, 2010.
- [20] KLONOSKI J.; MONDESIRE R.; REA L.; et al. **Enhanced detection of staphylococcal genomes in positive blood cultures using a polymeric enzyme complex.** Analytical Biochemistry, v. 396, p. 284-289, 2010.
- [21] ESTEVES A. C.; TIMMONS A. B.; TRINDADE T.; **Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos.** Química Nova, v. 27, n. 5, p. 798-806, 2004.
- [22] YADAV H. K.; SREENIVAS K.; GUPTA V.; **Study of metal/ZnO based thin film ultraviolet photodetectors: The effect of induced charges on the dynamics of photoconductivity relaxation.** Journal of applied physics, v. 107, p. 044507 1-9, 2010.

-
- [23] CAPAN I.; TARIMCI C.; CAPAN R.; **Fabrication of Langmuir-Blodgett thin films of porphyrins and investigation on their gás sensing properties.** Sensors and actuators B, v. 144, p. 126-130, 2010.
- [24] CABAJ J.; SOLODUCHO J.; NOWAKOWSKI-OLEKSY A.; **Langmuir-Blodgett film based biosensor for estimation of phenol derivatives.** Sensors and actuators B: Chemical, v. 143, p. 508-515, 2010.
- [25] LOVE J. C.; ESTROFF L. A.; KRIEBEL J. K.; **Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology.** Chemical Review, v. 105, p. 1103-1169, 2005.
- [26] FERREIRA M.; CAETANO W.; ITRI R.; **Técnicas de caracterização para investigar interações no nível molecular em filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB).** Química Nova, v. 28, n. 3, p. 502-510, 2005.
- [27] TRIVINHO-STRIXINO F.; PEREIRA E.; LOPES E. C.; **Desenvolvimento de um sistema automatizado para a fabricação de filmes automontados.** Química Nova, v. 27, n. 4, p. 661-663, 2004.
- [28] CHEN W.; MCCARRTHY J.; **Layer-by-Layer deposition: A tool for polymer surface modification.** Macromolecules, v. 30, p. 78-86, 1997.
- [29] PATERNO L. G.; MATTOSO L. H.; JR OLIVEIRA O. N.; **Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: preparação, propriedades e aplicações.** Química Nova, v. 24, v. 2, p. 228-235, 2001.
- [30] HOLLER F. J.; SKOOG D. A.; CROUCH S. R.; **Princípios de Análise Instrumental**; tradução Célio Pasquini [coordenação]; Jarbas Rodrigues Rohwedder [et. al.] – 6ª edição – Porto Alegre: Bookman, 2009, pág 734-735.
- [31] LAIBINIS P. E.; WHITESIDES G. M.; ALLARA D. L.; **Comparison of the structures and wetting properties of self-assembled monolayers of n-alkanethiols on the coinage metal surfaces, Cu, Ag, Au.** Journal of American Chemical Society, v. 113, p. 7152-7169, 1991.
- [32] ULMANN, A. **Formation and structure of self-assembled monolayers.** Chemical Reviews, v. 96, n. 4, p. 1533-1554, 1996.
- [33] BIGELOW W. C.; PICKET D. L.; ZISMAN W.; **Oleophobic monolayers .1. films adsorbed from solution in non-polar liquids.** Journal of Colloid Science, v. 1, n. 6, p. 513-538, 1946.

-
- [34] ZISMAN W. A.; SHAFRIN E. G.; **Hydrophobic monolayers adsorbed from aqueous solutions**. Journal of Colloid Science, v. 4, n. 6, p. 571-590, 1949.
- [35] NUZZO R. G.; ALLARA D. L. **Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold**. Journal American Chemistry Society, vol. 105, p. 4481-4483, 1983.
- [36] GOODING J. J.; MEARNS F.; YANG W.; Liu J. **Self-assembled monolayers into the 21(st) century: Recent advances and applications**. Electroanalysis, v. 15, n. 2, p. 81-96, 2003.
- [37] THOUGHTON E. B.; BAIN C. D.; WHITESIDES G. M.; et al., **Monolayers films prepared by the spontaneous self-assembly of symmetrical and unsymmetrical dialkylproperties, and reactivity of constituent functional sulfides from solution onto gold substrates: structure, groups'**. Langmuir, v. 4, p. 365-385, 1988.
- [38] DOUBOVA L. M.; **Electron transfer though single-crystal silver electrode/ n-decanthiol monolayer/NaNO₃ solution interfaces**. Russian Journal of Electrochemistry, v. 46, n. 4, p. 450-460, 2010.
- [39] VERCELLI B.; ZOTTI G.; BERLIN A.; et al. **Polypyrrole self-assembled monolayers and electrostatically assembled multilayers on gold and platinum electrodes for molecular junctions**. Chemistry of Materials, v. 18, n. 16, p. 3754-3763, 2006.
- [40] ROSARIO-CASTRO B.; FACHINI E. R.; HERNANDEZ J.; et al. **Electrochemical and surface characterization of 4-aminothiophenol adsorption at polycrystalline platinum electrodes**. LANGMUIR, v. 22, n. 14, p. 6102-6108, 2006.
- [41] STAPLETON J. J.; DANIEL T. A.; UPPILI S.; et al. **Self-assembly, characterization, and chemical stability of isocyanide-bound molecular wire monolayers on gold and palladium surfaces**. LANGMUIR, v. 21, n. 24, p. 11061-11070, 2005.
- [42] SHIH J. J.; KUO K. H.; YANG C. M.; et al. **Thermal dissociation of HSCH₂CH₂OH on Cu(111)**. Surface science, v. 602, p. 3266-3271, 2008.
- [43] DENAYER J.; DELHALLE J.; MEKHALIF Z.; **Surface modification of copper with 2-dodecylpropane-1,3-dithiol: The key effect of the solvent**. Applied surface science, v. 256, p. 1426-1430, 2009.
- [44] OSAKA T.; YOSHINO M.; **New formation process of plating thin films on several substrates by means of self-assembled monolayer (SAM) process**. Electrochimica Acta, v. 53, p. 271-277, 2007.

-
- [45] ARYA S. K.; SOLANKI P. R.; SINGH R.; et al. **Application of octadecanethiol self-assembled monolayer to cholesterol biosensor based on surface plasmon resonance technique**. *Talanta*, v. 69, p. 918-926, 2006.
- [46] CODOGNOTO L.; WINTER E.; PASCHOAL J. A. R.; et al. **Electrochemical behavior at a 3,3'-dithiodipropionic acid self-assembled monolayers**. *Talanta*, v. 72, p. 427-433, 2007.
- [47] LI. D.; FENG Y.; ZHOU L.; et al. **Label-free capacitive immunosensor based on quartz crystal Au electrode for rapid and sensitive detection of Escherichia coli O157:H7**. *Analytica Chimica Acta*, v. 687, p. 89-96, 2011.
- [48] MOCCELINI S. K.; VIEIRA I. C.; LIMA F.; et al. **Determination of thiocarb using a biosensor based on alfalfa sprout peroxidase immobilized in self-assembled monolayer**. *Talanta*, v. 82, p. 164-170, 2010.
- [49] WILLIAMS A. J.; GRUPTA V. K.; **Structure and formation of self-assembled monolayers of helical poly(γ -benzyl L-glutamate) by surface Plasmon resonance and infrared spectroscopy**. *Thin Solid films*, v. 423, p. 228-234, 2003.
- [50] MENSHYKAU D.; COMPTON R. G.; **Electrodes modified with electroinactive layers: distinguishing through-film transport from pinhole (pore) diffusion**. *Langmuir*, v. 25, p. 2519-2529, 2009.
- [51] CANCINO J. C.; **Eletrodos modificados com monocamadas auto-organizadas de alcanotíóis: Uma abordagem sobre a transferência eletrônica**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- [52] BOZIC R. G.; WEST A. C.; LEVICKY R.; **Square wave voltammetric detection of 2,4,6-trinitrotoluene and 2,4-dinitrotoluene on a gold electrode modified with self-assembled monolayers**. *Sensors and Actuators B: Chemical*, V. 133, p. 509-515, 2008.
- [53] SZEFCZYK B.; FRANCO R.; GOMES J. A. N. F.; et al.; **Structure of the interface between water and self-assembled monolayers of neutral, anionic and actionic alkane thiols**. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 2009.
- [54] LEE J. Y.; SHIN. H. Y.; LEE H. J.; et. al. **A novel enzyme-immobilization method for a biofuel cell**. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, v. 59, p. 274-278, 2009.
- [55] MENDES R. K.; Carvalhal R. F.; Kubota L. T.; **Effects of different self-assembled monolayers on enzyme immobilization procedures in peroxidase-**

based biosensor development. Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 612, p. 164–172, 2008.

[56] SHEVERDANI R. K.; MEHRJARDI A. H.; **Comparative electrochemical behavior of glucose oxidase covalently immobilized on mono-, di- and tetra-carboxylic acid functional Au-thiol SAMs via anhydride-derivation route.** Sensors and Actuators B: Chemical, v. 137, p. 195-204, 2009.

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

[58] MOCCELINI S. K.; FERNANDES S. C.; CAMARGO T. P.; et al.; **Self-assembled monolayer of nickel (II) complex and thiol on gold electrode for the determination of catechin.** Talanta, v. 78, p. 1063-1068, 2009.

[59] RAO B. V. A.; IQBAL M. Y.; SREEDHAR B.; **Electrochemical and surface studies of the self-assembled monolayer of 5-methoxy-2-(octadecylthio)benzimidazole in corrosion protection of copper.** Electrochimica Acta, v. 55, n. 3, p. 620-631, 2010.

[60] MENDES R. K.; **Investigação dos efeitos dos procedimentos de imobilização em monocamadas auto-organizadas da enzima peroxidase no desenvolvimento de um biossensor.** Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de Campinas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

[61] CARVALHAL R. F.; **Desenvolvimento de sensor biomimético empregando monocamadas auto-organizadas de tióis sobre eletrodos de ouro.** Dissertação de mestrado – UNICAMP, Campinas, SP, 2005.

[62] KIKUGAWA G.; OHARA T.; KAWAGUCHI T.; et.al. **A molecular dynamics study on heat transfer characteristics at the of alkanethiolate self-assembled monolayer and organic solvent.** The Journal of Chemical Physics, v. 130, p. 740-760, 2009.

[63] MILLONE M. A. D.; HAMOUDI H.; RODRIGUEZ L.; **Self-assembly of alkanedithiols on Au(111) from solution: Effect of chain length and self-assembly conditions.** Langmuir, v. 25, n. 22, p. 12945-12953, 2009.

[64] RANIERI A.; BATTISTUZZI G.; BORSARI M.; et al.; **Thermodynamics and kinetics of the electron transfer process of spinach plastocyanin adsorbed on a modified gold electrode.** Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 626, p. 123-129, 2009.

-
- [65] PAULO T. F.; SILVA M. A. S.; DIÓGENES I. C. N.; et al.; **5-(4-pyridinyl)-1,3,4-(oxadiazole)-2-thiol on gold: SAM formation and electroactivity**. Journal of Brazilian Chemical Society, v. 19, n. 4, p. 711-719, 2008.
- [66] CAMPUZANO S.; PEDRERO M.; MONTEMAYOR C.; et al.; **Characterization of alkanethiol-self-assembled monolayers-modified gold electrodes by electrochemical impedance spectroscopy**. Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 586, p. 112-121, 2006.
- [67] DEAB M. S.; OHSAKA T.; **Molecular-level design of binary self-assembled monolayers on polycrystalline gold electrodes**. Electrochimica Acta, v. 49, p. 2189-2194, 2004.
- [68] SOUZA J. R.; PARENTE M. M.; DIOGENES I. N.; et al.; **A correlation study between the conformation of the 1,4-dithiane SAM on gold and its performance to assess the heterogeneous electron-transfer reactions**. Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 566, p. 443–449, 2004.
- [69] RAOOF J.; OJANI R.; CHEKIN F.; **Immobilization of 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid on gold electrode: application for cysteamine detection using Michael addition**. Journal of Materials Science, v. 44, p. 2688-2693, 2009.
- [70] LEE J. B.; NAMGUNG M.; LEE S. B.; et al.; **Fabrication of an electrically conductive mixed self-assembled monolayer and its application in an electrochemical immunosensor**. Ultramicroscopy, V. 108, p. 1352-1355, 2008.
- [71] TKAC J.; DAVIS J. J.; **An optimised electrode pré-treatment for SAM formation on polycrystalline gold**. Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 621, p. 117-120, 2008.
- [72] CAMPINA J. L.; MARTINS A.; SILVA F.; **A new cleaning methodology for efficient Au-SAM removal**. Electrochimica Acta, v. 53, p. 7681-7689, 2008.
- [73] DOUGLAS E. F.; DRISCOLLI P. F.; LIU D. L.; et al.; **Effect of electrode roughness on the capacitive behavior of self-assembled monolayer**. Analytical Chemistry, v. 80, n. 30, p. 7670-7677, 2008.
- [74] SCHLENOFF J. B.; Li M.; Ly H. **Stability and self-exchange in alkanethiol monolayers**. Journal American Chemical Society, v. 117, p. 12528, 1995.
- [75] NETO P. L.; PARENTE M. M. V.; MOREIRA I. S.; et al.; **AFM and hydrodynamic electrochemical characterization of the self-assembled 1,4-dithiane on gold surface**. Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 603, p. 21-26, 2007.

-
- [76] BLANCO J. M.; FLORES F.; PEREZ R.; **STM-theory: image potencial, chemistry and surface relaxation**. Progress in Surface Science, v. 81, p. 403-443, 2006.
- [77] DUBOIS C.; STELLACCI F.; **Self-assembled monolayer of short carboxyl-terminated molecules investigated with ex situ scanning tunneling microscopy**. Journal of Physical Chemistry C, V. 112, n. 19, p. 7431-7435, 2008.
- [78] SMITH R. K.; LEWIS P. A.; WEISS P. S.; **Patterning self-assembled monolayers – review**. Progress in Surface Science, v. 75, p. 1-68, 2004.
- [79] MORAES M. L.; **Filmes nanoestruturados de materiais de interesse biológico: ênfase na interação com modelos de membrana e aplicações em biossensores**. Tese de doutorado, UFSCar, São Paulo, 2008.
- [80] TARLEY C. R. T.; SOTOMAYOR M. D. P. T.; KUBOTA L. T.; **Polímeros biomiméticos em química analítica, parte 2: aplicações de MIP no desenvolvimento de sensores químicos**. Química Nova, v. 28, n. 6, p. 1087-1101, 2005.
- [81] LI W.; JIN G.; CHEN H.; KONG J.; **Highly sensitive and reproducible cyclodextrin-modified gold electrodes for probing trace lead in blood**. Talanta, v. 78, p. 717-722, 2009.
- [82] LEE M.; KIM T.; KIM K. H.; et al.; **Formation of a self-assembled phenylboronic acid monolayer and its application toward developing a surface Plasmon resonance-based monosaccharide sensor**. Analytical Biochemistry, v. 310, p. 163-170, 2002.
- [83] ZHOU J. H.; DENG C. Y.; SI S. H.; et al. **Zirconia electrodeposited on a self-assembled monolayer on a gold electrode for sensitive determination of parathion**. Microchimica Acta, v. 172, p. 207-215, 2011.
- [84] MALAMOU C. A.; PRODROMIDIS M. I.; **Performance of a faradaic impedimetric immunosensor for blood group antigen A**. Microchim Acta, v. 163, p. 251-256, 2008.
- [85] GÓMEZ V. E.; CAMPUZANO S.; PEDRERO M.; et al.; **Electrochemical immunosensor designs for the determination of Staphylococcus aureus using 3,3-dithiodipropionic acid di(N-succinimidyl ester)-modified gold electrodes**. Talanta, v. 77, p. 876-881, 2008.

[86] LIMBUT W.; KANATHARANA P.; MATTIASSON B.; et al.; **A comparative study of capacitive immunosensors based on self-assembled monolayers formed from thiourea, thioctic acid, and 3-mercaptopropionic acid.** Biosensors and Bioelectronics, v. 22, p. 233–240, 2006.

[87] MURPHY J. N.; CHENG A. L.; YU H.; et al.; **On the nature of DNA self-assembled monolayers on Au: measuring surface heterogeneity with electrochemical in situ fluorescence microscopy.** Journal American Chemical Society, v. 131, n. 11, p. 4042–4050, 2009.

[88] PHARES N.; WHITE R. J.; PLAXCO K. W.; **Improving the stability and sensing of electrochemical biosensors by employing trithiol-anchoring groups in a six-carbon self-assembled monolayer.** Analytical Chemistry, v. 81, n. 3, p. 1095-1100, 2009.

[89] SCALEA M. A.; SERRANO H. P.; GUTZ I. G. R.; **Eletrodos modificados com DNA: uma nova alternativa em eletroanálise.** Química Nova, v. 22, n.3, p. 417-424, 1999.

[90] ZHANG S.; TAN Q.; LI X.; **Recognition and detection of ssDNA using 2-mercaptobenzothiazole self-assembled monolayer modified gold electrode.** Sensors and Actuators B, v. 128, p. 529–535, 2008.

[91] CONZUELO F.; GAMELLA M.; CAMPUZANO S.; et al. **An integrated amperometric biosensor for the determination of lactose in milk and dairy products.** Journal of agricultural and food chemistry, v. 58, p. 7141-7148, 2010.

[92] SOTOMAYOR M. P. T.; KUBOTA L. T.; **Enzymeless biosensors: uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos.** Química Nova, v. 25, n. 1, p. 123-128, 2002.

[93] ARYA S. K.; SOLANKI P. R.; SINGH R. P.; et al.; **Application of octadecanethiol self-assembled monolayer to cholesterol biosensor based on surface plasmon resonance technique.** Talanta, v. 69, p. 918–926, 2006.

[94] LUCZAK T.; **Comparison of electrochemical oxidation of epinephrine in the presence of interfering ascorbic and uric acids on gold electrodes modified with S-functionalized compounds and gold nanoparticles.** Electrochimica Acta, v. 54, p. 5863-5870, 2009.

[95] CAMPUZANO S.; ESCAMILLA-GÓMEZ V.; HERRANZ M. A.; et al. **Development of amperometric biosensors using thiolated tetrathiafulvalene-derivatised self-assembled monolayer modified electrodes.** Sensors and actuators B: Chemical, v. 134, p. 974-980, 2008.

-
- [96] BEHERA S.; SAMPATH S.; RAJ C. R.; **Electrochemical functionalization of a gold electrode with redox-active self-assembled monolayer for electroanalytical application.** Journal of Physical Chemistry C, v. 112, n. 10, p. 3734-3740, 2009.
- [97] MENDES R. K.; FERREIRA D. C. M.; CARVALHAL R. F.; et al.; **Development of an electrochemical immunosensor for Phakopsora pachyrhizi detection in the early diagnosis of Soybean Rust.** Journal of Brazilian Chemical Society, v. 20, n. 4, p. 795-801, 2009.
- [98] HENNESSEY H.; AFARA N. OMANOVIC S.; et al.; **Electrochemical investigations of the interaction of C-reactive protein (CRP) with a CRP antibody chemically immobilized on a gold surface.** Analytica Chimica Acta, v. 643, p. 45-53, 2009.
- [99] DUTRA R. F.; KUBOTA L. T.; **An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotina t carboxymethyldextran-modified gold chip.** Clinica Chimica Acta, v. 376, p. 114-120, 2007.
- [100] LANA R. C.; ÁLVARES L. M. R. S.; NASCIUTTI-PRUDENTE C.; et al.; **Percepção da qualidade de vida de indivíduos com doença de Parkinson através do PDQ-39.** Revista Brasileira de fisioterapia de São Carlos, v. 11, n. 5, p. 397-402, 2007.
- [101] MENEGATTI R.; FRAGA C. A. M.; BARREIRO E.; et al.; **Esquizofrenia: quarenta anos da hipótese dopaminérgica sob a ótica da química medicinal.** Química Nova, v. 27, n. 3, p. 447-455, 2004.
- [102] CASCHERA D.; FEDERICI F.; ZANE D.; et al.; **Gold nanoparticles modified GC electrodes: electrochemical behavior dependence of different neurotransmitters and molecules of biological interest on the particles size and shape.** Journal of Nanoparticle Research, v. 11, p. 1925-1936, 2009.
- [103] WANG C. Y.; WANG Z. X.; ZHU A. P.; et al.; **Voltammetric determination of dopamine in human serum with amphiphilic chitosan modified glassy carbon electrode.** Sensors, v. 6, p. 1523-1536, 2006.
- [104] ATTA N. F.; EL-KADY M. F.; GALAL A.; **Simultaneous determination of catecholamines, uric acid and ascorbic acid at physiological levels using poly(N-methylpyrrole)/Pd-nanoclusters sensor.** Analytical Biochemistry, v. 400, p. 78-88, 2010.
- [105] CODOGNOTO L.; WINTER E.; PASCHOAL J. A. R.; et al. **Fabrication of an electrically conductive mixed self-assembled monolayer and its application in an electrochemical immunosensor.** Ultramicroscopy, v. 108, p. 1352-1355, 2008.

-
- [106] LI J.; WU X.; LE S.; **Self-assembled sulfonated β -Cyclodextrin layer on gold electrode for the selective eletroanalysis of dopamine.** Journal of Solid State Electrochemical, v. 13, p. 1811-1818, 2009.
- [107] MOCCELINI S. K.; FERNANDES S. C.; VIEIRA I. C. **Bean sprout peroxidase biosensor base don l-cysteine self-assembled monolayer for the determination of dopamine.** Sensors and actuators B: Chemical, v. 133, p. 364-369, 2008.
- [108] SOUZA D.; MACHADO S. A. S.; AVACA L. A.; **Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos.** Química Nova, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.
- [109] GUPTA V. K.; JAIN R.; RADHAPYARI K.; et al. **Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals – A review.** Analytical Biochemistry, v. 408, p. 179-196, 2011.
- [110] CHANG B.-Y.; PARK S-M. **Electrochemical Impedance Spectroscopy.** Annual Review of Analitcal Chemistry, v. 3, p. 207-229, 2010.
- [111] SHERVEDANI R.; POURBERYRAM S.; **Zirconium immobilized on gold-mercaptopropionic acid self-assembled monolayer for trace determination of phosphate in blood serum by using CV, EIS, and OSWS.** Biosensors and Bioelectronics, V. 24, p. 2199-2204, 2009.
- [112] GROOT M. T.; EVERS T. H.; MERKX M.; et al.; **Electron transfer and ligand binding to cytochrome c' immobilized on self-assembled monolayers.** Langmuir, v. 23, p. 729-736, 2007.
- [113] WANG J.; **Analytical Electrochemistry, second edition,** Wiley-VCH, New York, 2000, pág. 28.
- [114] VOGEL A. I. **Química Analítica Qualitativa** 5. ed., São Paulo: Mestre Jou, 1981. p. 665.
- [115] GARCIA-RAYA D.; MADUENO R.; SEVILLA J. M.; et al.; **Electrochemical characterization of a 1,8-octanedithiol self-assembled monolayer (ODT-SAM) on a Au(111) single crystal electrode.** Electrochimica Acta, v. 53, p. 8026-8033, 2008.
- [116] BALLAND V.; LECOMTE S.; LIMOGES B.; **Characterization of the electron transfer of a ferrocene redox probe and a histine-tagged hemoprotein specifically bound to a nitrilotriacetic-terminated self-assembled monolayer.** Langmuir, v. 25, n. 11, p. 6532-6542, 2009.

[117] CHI Y. S.; HWANG S. ; LEE B. S.; et al. **Anion exchange-promoted Ru^{3+/2+} redox switch in self-assembled monolayers of imidazolium ions on a gold electrode.** Langmuir, v. 21, p. 4268-4271, 2005.

[118] PINHEIRO S. O.; SILVA F. O. N.; CARVALHO I. M. M.; et al. **Tetraammine ruthenate complexes: cationic SAMs for cytochrome c recognition.** Journal of Brazilian Chemical Society, v. 17, n. 8, p. 1594-1599, 2006.

[119] PAULO T. F.; **5-(4-piridil)-1,3,4-(oxadiazol)-2-tiol e Na₃[Fe(CN)₅Hpyt].3H₂O: síntese, caracterização e estudos de formação de monocamadas automontadas.** Dissertação de Mestrado, UFC, 2007.

[120] WANG Q.; JIANG N.; LI N.; **Electrocatalytic response of dopamine at a thiolactic acid self-assembled gold electrode.** Microchemical Journal, v. 68, p. 77-85, 2001.

[121] BRETT C. M.; BRETT A. M. O.; **Electrochemistry, principles, methods, and applications,** Oxford University Press, New York, 1993, p. 219-222.

[122] SOUSA D.; CODOGNOTO L.; MALAGUTTI A. R.; et al. **Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: aplicações.** Química Nova, v. 27, n. 5, p. 790-797, 2004.

[123] GOGAN-TOPAL B.; OZKAN S. A.; USLU B.; **The analytical applications of square wave voltammetry on pharmaceutical analisys.** The open Chemical and Biomedical Methods Journal, v. 3, p. 56-73, 2010.

[124] SUN Y.-X.; WANG S. F.; ZHANG X. H.; et al. **Simultaneous determination of epinephrine and ascorbic acid at the electrochemical sensor of triazole SAM modified gold electrode.** Sensors and actuators B, v. 113, p. 156-161, 2006.

[125] MENDES R. K.; FERREIRA D. C. M.; CARVALHAL R. F.; et al.; **Development of an electrochemical immunosensor for Phakopsora pachyrhizi detection in the early diagnosis of Soybean Rust.** Journal of Brazilian Chemical Society, v. 20, n. 4, p. 795-801, 2009.

[126] NI D. R.; XIAO B. L.; MA Z. Y.; et al. **Corrosion properties of friction-stir processed cast NiAl bronze.** Corrosion Science, v. 52, p. 1610-1617, 2010.

[127] HENNESSEY H.; AFARA N., OMANOVIC S.; et al.; **Electrochemical investigations of the interaction of C-reactive protein (CRP) with a CRP antibody chemically immobilized on a gold surface.** Analytica Chimica Acta, v. 643, p. 45-53, 2009.

[128] GANESH V.; KUMAR S.; LAKSHMINARAYANAN V.; et al. **Self-assembled monolayers of alkoxycyanobiphenyl thiols on gold – A study of electron transfer reaction using cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy.** Journal of colloid and interface science, v. 296, p. 195-203, 2006.

[129] DAMOS F. S.; MENDES R. K.; KUBOTA L. T.; **Aplicações de QMC, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores.** Química Nova, v. 27, n.6, p. 970-979, 2004.

[130] MENDES R. K.; FREIRE R. S.; FONSECA C. P.; et al. **Characterization of Self-Assembled Thiols Monolayers on Gold Surface by Electrochemical Impedance Spectroscopy.** Journal Brazilian Chemical Society, v. 15, n. 6, p.849-855, 2004.

[131] RIBAUT C.; REYBIER K.; TORBIERO B.; et al.; **Strategy of red cells immobilization onto a gold electrode: Characterization by electrochemical impedance spectroscopy and quartz crystal microbalance.** ITBM-RBM, v. 28, p. 141-148, 2008.

[132] ULMAN A.; **Thin films – self-assembled monolayers of thiols.** Academic Press, New York, v. 24, 1998.

[133] GAO W.; XIA X. H.; XU J. J.; et al. **Three-Dimensionally ordered macroporous gold structure as an efficient matrix for solid-state electrochemiluminescence of Ru(bpy)₃²⁺/TPA system with high sensitivity.** Journal Physical Chemical C, v. 111, p. 12213-12219, 2007.

[134] TRASATTI S.; PETRI O. A.; **Real surface area measurements in electrochemistry.** Pure & Application Chemical, v. 63, n. 5, p. 711-734, 1991.

[135] AGOSTINHO S. M.; VILLAMIL R. T.; NETO A. A.; et al.; **O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo.** Química Nova, v. 27, n. 5, p. 813-817, 2004.

[136] BLANCO J. M.; FLORES F.; PEREZ R.; **STM-theory: image potential, chemistry and surface relaxation.** Progress in Surface Science, v. 81, p. 403-443, 2006.

[137] PILLAY J.; AGBOOLA B. O.; OZOEMENA K. I.; **Electrochemistry of 2-dimethylaminoethanethiol SAM on gold electrode: Interaction with SWCNT-poly(m-aminobenzene sulphonic acid), electric field-induced protonation-deprotonation, and surface pK_a.** Electrochemistry Communications, v. 11, p. 1292-1296, 2009.

[138] WANG Q.; LI N.; **Electrocatalytic response of norepinephrine at a thiolactic acid self-assembled gold electrode**. *Talanta*, v. 55, p. 1219-1225, 2001.

[139] PAN Y.; SONN G. A.; SIN M. L. Y.; et al. **Electrochemical immunosensor detection of urinary lactoferrin in clinical samples for urinary tract infection diagnosis**. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 26, p. 649-654, 2010.

[140] LI Y.; LI J.; XIA X. H.; et al. **Direct electrochemistry of cytochrome c immobilized on a novel macroporous gold film coated with a self-assembled 11-mercaptoundecanoic acid monolayer**. *Talanta*, v. 82, p. 1164-1169, 2010.

[141] SOLOMONS T. W., FRYHLE C. B.; **Química Orgânica**, vol 1, 8ª edição, LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., Rio de Janeiro, RJ, 2005.

[142] GAUSSIAN 03, Revision C., Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2004.

[143] MOLEKEL 5.3, P.H.P. Flükiger, S.; Lüthi, J.; Portmann, Weber, **Swiss Center for Scientific Computing, Manno, Switzerland**, 2000–2002.

[144] ZHANG J.; OYAMA M. **Electrocatalytic activity of three-dimensional monolayer of 3-mercaptopropionic acid assembled on gold nanoparticle arrays**. *Electrochemistry Communications*, v. 9, p. 459-464, 2007.

[145] BOLDT F. M.; BALTES N.; BORGWARTH K.; et al. **Investigation of carboxylic-functionalized and n-alkanethiol self-assembled monolayers on gold and their applications as pH-sensitive probes using scanning electrochemical microscopy**. *Surface Science*, v. 597, p. 51-64, 2005.

[146] MIRDE M.; GELIUS U.; **Self-assembled monolayers of cystamine and cysteamine on gold studied by XPS and voltammetry**. *Langmuir*, v. 15, p. 6370-6378, 1999.

-
- [147] KATZ E.; SCHLERETH D. D.; SCHMIDT H. L.; **Electrochemical study of pyrroloquinoline quinone covalently immobilized as a monolayer onto a cystamine-modified gold electrode.** Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 367, n. 1-2, p. 59-70, 1994.
- [148] KISSLING G. P.; BÜNZLI C.; FÉRMIN D. J.; **Tuning electrochemical rectification via quantum dot assemblies.** Journal American Chemical Society, v. 132, p. 16855-16861, 2010.
- [149] WIDRIG C. A.; CHUNG C.; PORTER M. C.; **The electrochemical desorption of n-alkanethiol monolayers from polycrystalline Au and Ag electrodes.** Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 310, p. 335-339, 1991.
- [150] KAKIUCHI T.; USUI H.; HOBARA D.; et al. **Voltammetric properties of the reductive desorption of alkanethiol self-assembled monolayers from a metal surface.** Langmuir, v. 18, p. 5231-5238, 2002.
- [151] GALLI, A. **Desenvolvimento e caracterização de um biossensor bioenzimático imobilizado sobre monocamadas auto-organizadas para determinação de açúcares em alimentos.** Tese de doutorado. São Carlos, São Paulo, 2009.
- [152] GIROTTO E.; PAOLI M.; **Transporte de massa em polímeros intrinsecamente condutores: Importância, técnicas e modelos teóricos.** Química Nova, v. 22, n. 3, p. 358 – 368, 1999.
- [153] LIMA-NETO P.; PARENTE M. M. V.; MOREIRA I. S.; et al. **The influence of 4-mercaptopyridine layer instability on rapid electron transfer reaction.** Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 619-620, p. 26-30, 2008
- [154] WANG Q.; DONG D.; LI N.; **Electrochemical response of dopamine at a penicillamine self-assembled gold electrode.** Bioelectrochemistry, v. 54, p. 169-175, 2001.
- [155] RAJ C. R.; TOKUDA K.; OHSAKA T.; **Electroanalytical applications of cationic self-assembled monolayers: square-wave voltammetric determination of dopamine and ascorbate.** Bioelectrochemistry, v. 53, p. 183-191, 2001.
- [156] ZHAO J.; LUO L.; YANG X.; et al.; **Determination of surface pKa of SAM using an electrochemical titration method.** Electroanalysis, v. 11, n. 15, p. 1108-1111, 1999.
- [157] FERNANDES S. C.; VIEIRA I. C.; PERALTA R. A. **Development of a biomimetic chitosan film-coated gold electrode for determination os dopamine in the presence of a ascorbic acid and uric acid.** Electrochimica Acta, v. 55, p. 7152-7157, 2010.

-
- [158] KIM J.; JEON M.; PAENG K. J.; et al. **Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of catecholamin, dopamie in serum.** *Analytica Chimica Acta*, v. 619, p. 87-93, 2008.
- [159] CABRAL M. F.; SOUZA D.; ALVES C. R.; et al. **Estudo do comportamento eletroquímico do herbicida ametrina utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada.** *Eclética Química*, v. 28, n. 2, p. 41-47, 2003.
- [160] LANÇAS F. M.; **Validação de métodos cromatográficos de análise.** São Carlos: Editora Rima, 2004.