

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL**

**A ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA
APLICADA AO ESTUDO DA INTERFACE PLATINA/LECTINA**

**Por
Roseli Rudnick Ueta**

**Tese submetida ao Departamento de Química Fundamental como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em Ciências**

Orientador: Prof. Dr. Flamarion Borges Diniz

Recife, 2002

Dedicatória,

Às minhas filhas, Vivian e Valeria,
Por ampliarem a minha definição de amor,
e desta forma me fazer uma pessoa melhor!
A Anselmo por uma vida compartilhada!
Aos meus pais, Alice e Aristides,
Pela imensa saudade deixada!

AGRADECIMENTOS

O período em que desenvolvi o trabalho de tese foi um dos mais ricos em experiências de vida! Estas experiências foram as mais variadas possíveis, envolvendo sentimentos opostos, como alegria e tristeza, realização e perda! Esse conjunto de emoções me transformou várias vezes deixando impressões definitivas em meu coração.

Gostaria de iniciar os agradecimentos a Flamarion, pela orientação neste trabalho, tarefa que demandou muito tempo e dedicação, mas acima de tudo por contar com a sua compreensão para com meus momentos de vida! E ressaltar que o seu apoio foi determinante para a conclusão deste trabalho.

Ao Departamento de Química Fundamental pela formação acadêmica e em especial na pessoa do Prof. Benício Barros Neto.

Ao Prof. Luis Bezerra de Carvalho Junior, pela conversa inspiradora que frutificou neste trabalho!

Ao grupo de Eletroquímica pela convivência agradável que nos permitiu compartilhar muito mais do que trabalho e espaço físico! E em especial aos amigos: Alziana, Elvira, Érika, Fellipe, Jailson, Lêda, Lucila, Kátia, Madalena, Rogério, Sibebe e Suzana!

À Alziana, Rogério e Sibebe pela amizade e empenho no desenvolvimento dos trabalhos de iniciação científica.

À Lucila e Jailson! Amigos de todas as horas e muitas horas! Nesta oportunidade de forma simples expressei o meu agradecimento pela sorte de tê-los como amigos!

À Madalena pela amizade, uma presença renovadora e entusiasta no laboratório e confecção das figuras deste trabalho!

Aos amigos da pós-graduação: Beate, Bruno, Élcio, Eliete, Expedito, Idália, Jucemar, Patrícia, Suzana Villanova!

Às funcionárias da biblioteca Ana e Joana pela delicadeza sempre presente no atendimento.

Aos funcionários Maurílio e Dora pelas gentilezas ao longo desses anos.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Índice

Índice de Figuras	iv
Índice de Tabelas	xi
Lista de Símbolos	xiii
Resumo	xvi
Abstract	xvii

1) INTRODUÇÃO	01
1.1) Adsorção de Proteínas	03
1.1.2) Efeitos que Influenciam a Interação Entre a Proteína e a Superfície Sólida	06
1.1.2.1) Efeito de Carga	06
1.1.2.2) Efeito Hidrofóbico	07
1.1.2.3) Efeito da Temperatura	07
1.2) Lectinas	07
1.2.1) Lectinas Leguminosas	08
1.2.1.1) Concanavalina A	09
1.2.1.2) Lentil	10
1.2.3) Interação da Lectina e o Carboidrato	11
1.2.4) Aplicações das Lectinas	12
1.2) Filme de Óxido de Platina	13
1.4) Espectroscopia de Impedância	15
1.4.1) Conceitos Básicos	16
1.4.2) Circuito Equivalente de uma Cella Eletroquímica	21
1.4.3) Representação dos Espectros de Impedância	23
1.4.4) Utilização do Programa de Circuitos Equivalentes	26
1.4.4.1) Princípios para a Utilização do EQUIVCRT	28
1.4.5) Impedância em Sistemas Biológicos	30

2) TÉCNICAS EXPERIMENTAIS.....	33
2.1) Sistema Eletroquímico	34
2.1.1) Eletrodos	34
2.1.1.1) Eletrodo de Trabalho	35
2.1.1.2) Eletrodo Auxiliar	35
2.1.1.3) Eletrodo de Referência	35
2.1.2) Preparo da superfície do eletrodo de trabalho	35
2.1.3) Solvente.....	37
2.1.4) Eletrólito suporte	37
2.1.5) Sistema Redox.....	37
2.1.6) Lectinas adsorvidas na superfície da platina	37
2.1.6) Carboidratos utilizados para testar a sensibilidade e seletividade das lectinas adsorvidas	38
2.1.7) Cella eletroquímica.....	38
2.2) Equipamentos Utilizados para a Realização dos Experimentos Eletroquímicos.....	39
2.3) Voltametria Cíclica	40
2.4) Espectroscopia de Impedância	41
2.4.1) Verificação da adsorção das lectinas	41
2.4.2) Verificação da seletividade das lectinas frente aos carboidratos.....	43
2.5) Formação da Camada de Óxido	45
2.5.1) Camada de óxido formada quimicamente	45
2.5.2) Camada de óxido formada eletroquimicamente.....	46
2.5.2.1) Parâmetros experimentais para a formação da camada de óxido ..	46
2.8) Teste de Atividade Biológica da Concanavalina A	50
3) RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
3.1) Voltametria Cíclica do Eletrodo de Platina.....	52
3.1.1) Voltametria Cíclica em Ácido Sulfúrico	52
3.1.2) Voltametria Cíclica em Ferri-ferrocianeto de Potássio.....	53
3.2) A camada de Óxido Formada Eletroquimicamente	55
3.2.1) Caracterização da Camada de Óxido pela Voltametria Cíclica.....	55
3.2.2) Caracterização da Camada de Óxido pela Espectroscopia de Impedância	58

3.2.2.1) Comparação dos Resultados Obtidos com a Voltametria Cíclica e a Impedância	59
3.2.2.2) Caracterização da Camada de Óxido pela Espectroscopia de Impedância na Frequência de 25 Hz	62
3.2.3) Circuitos Equivalentes	64
3.2.3.1) Modelo 1	64
3.2.3.2) Modelo 2	66
3.2.3.3) Modelo 3	68
3.2.3.4) Modelo 4	70
3.2.4) Cálculo da Espessura da Camada de Óxido	73
3.2.5) Como a Interface Eletrodo Solução Foi Alterada pela Presença de Óxido?	75
3.2.6) Comparativo Entre as Camadas de Óxidos Produzidas Quimicamente e Eletroquimicamente	79
3.3) Adsorção da Con A e a Camada de Óxido	82
3.3.1) O circuito Equivalente	83
3.3.2) Efeito da Quantidade de Óxido na Adsorção da Proteína	87
3.3.2) Caracterização da Adsorção da Con A	89
3.4) Especificidade e Seletividade da Con A Adsorvida	99
3.5) Caracterização da Adsorção da Lentil	102
3.5.1) Especificidade da Lentil Adsorvida	105
3.6) Desdobramentos do Trabalho com Lectinas no Laboratório de eletroquímica	107
4) CONCLUSÕES	109
4.1) Camada de Óxido de Platina	109
4.2) Adsorção de Proteína	110
4.3) Sensibilidade da Proteína Frente aos Carboidratos	112
5) Perspectivas Futuras	114
6) Referências Bibliográficas	116

Índice de Figuras

Capítulo 1

Figura 1.1: Correlação entre o aumento da concentração e a configuração da proteína adsorvida	05
Figura 1.2: Representação da localização dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} na concanavalina A e a sua interação com um carboidrato (metil-manose).....	10
Figura 1.3: a) Circuito elétrico puramente resistivo. b) Relação entre a voltagem e a corrente em um circuito resistivo. c) Mostra a mesma relação de b, porém na forma de vetores.	16
Figura 1.4: a) Circuito elétrico puramente capacitivo. b) Relação entre a voltagem e a corrente em um circuito puramente capacitivo. c) Mostra a mesma relação de b, porém na notação de vetores.	17
Figura 1.5: Representação vetorial da impedância	19
Figura 1.6: Analogia entre a interface eletrodo/solução e um capacitor elétrico.	20
Figura 1.7: (a) circuito equivalente de uma interface eletrodo/solução. (b) desdobramento de Z_f em R_s e C_s ou R_{ct} e Z_w	21
Figura 1.8: a) Gráfico Nyquist de um circuito RC em série, b) e o seu respectivo gráfico de Bode ângulo de fase, c) Gráfico Nyquist de um circuito RC em paralelo, d) e o seu respectivo gráfico de Bode ângulo de fase.	24

Figura 1.9: Gráfico Nyquist para o circuito de Randles, com os seguintes valores: $R_{\Omega}=100 \Omega$, $R_{ct}=1000 \Omega$, $C_{dl}= 1\mu F$ e $\sigma=2000 \Omega.s^{0,5}$.	25
Figura 1.10: Gráfico de Bode para o circuito de Randles: relacionando o ângulo de fase vs. log frequência. Com os seguintes valores: $R_{\Omega}=100 \Omega$, $R_{ct}=1000 \Omega$, $C_{dl}= 1\mu F$ e $\sigma=2000 \Omega.s^{0,5}$.	26
Figura 1.11: Esquema proposto para a interação antígeno-anticorpo na interface eletrodo/solução.	30

Capítulo 2

Figura 2.1: Circuito de uma cela eletroquímica composta por três eletrodos.	34
Figura 2.2: Esquema para a verificação da limpeza e reprodutibilidade da superfície do eletrodo.	36
Figura 2.3: Celas eletroquímicas: a) com capilar de Luggin-Harber; b) sem capilar de Luggin-Harber.	39
Figura 2.4: Organograma dos equipamentos utilizados para as medidas de impedância.	40
Figura 2.5: Esquema mostrando as etapas 1 e 2 anteriores à adsorção da lectina e a adsorção propriamente dita, etapa 3, e a sua posterior verificação na etapa 4.	43
Figura 2.6: Esquema mostrando a adsorção de carboidratos, sobre uma superfície com lectina (mostradas na figura 2.4) e a verificação da adsorção do carboidrato com voltametria cíclica e espectroscopia de impedância.	44

Figura 2.7: Esquema resumindo os procedimentos para a produção de uma camada de óxido quimicamente.	46
Figura 2.8: Esquema dos potenciais estabelecidos no eletrodo de trabalho para se produzir a camada de óxido eletroquimicamente. A) Limpeza do sistema eletroquímico, onda triangular de potencial utilizado na voltametria cíclica da platina em H ₂ SO ₄ 1M. B) Formação da camada de óxido.	48
Figura 2.9: Esquema explicativo das etapas de limpeza, formação e verificação da camada de óxido produzida eletroquimicamente.	49

Capítulo 3

Figura 3.1: Voltamograma cíclico do eletrodo de platina em ácido sulfúrico 1 M.	53
Figura 3.2: Voltamograma cíclico do eletrodo de platina em ferri-ferrocianeto de potássio 1mM.	54
Figura 3.3: Voltamograma cíclico do eletrodo de platina em ferri-ferrocianeto de potássio: (+) eletrodo de platina; (□) eletrodo de platina modificado com filme de óxido, 61 μC para a formação do filme.	56
Figura 3.4: Corrente de pico anódica (i_{pa}) versus carga para o eletrodo de platina em uma solução de ferri-ferrocianeto de potássio.	57
Figura 3.5: Diferença no potencial de pico (ΔE_p) versus carga para o eletrodo de platina em uma solução de ferri-ferrocianeto de potássio.	57

Figura 3.6: Gráfico Nyquist do eletrodo de platina em ferri-ferrocianeto de potássio: (+) eletrodo de platina; (□) eletrodo de platina modificada com filme de óxido, 61 μC para a formação do filme.	58
Figura 3.7: Gráfico de Bode ângulo de fase do eletrodo de platina em ferri-ferrocianeto de potássio: (+) eletrodo de platina; (□) eletrodo de platina modificada com filme de óxido, 61 μC para a formação do filme.	59
Figura 3.8: R_{ct} versus ΔE_p , R_{ct} foi obtido da equação 3.5, onde: $A=0,038 \text{ cm}^2$, ψ =valores tabelados, $D_O=D_R=1,211 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ para $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, $v=50 \text{ mV/s}$, $C^*=1\text{mM}$, $\alpha=0,5$, n , F , R e T com seus valores usuais.	62
Figura 3.9: a) Z_{re} versus carga, esses dados foram obtidos na frequência de 25 Hz dos espectros de impedância. b) Capacitância versus carga, onde a capacitância é dada por $1/Z_{im}\omega$, esses dados foram obtidos na frequência de 25 Hz dos espectros de impedância.....	63
Figura 3.10: a) modelo 1; b) ajuste entre a curva experimental de óxido com carga de 268 μC (□) e o modelo (*).	65
Figura 3.11: a) relação da R_{ct} obtida com o modelo 1 versus carga; b) relação da C_{dl} obtida com o modelo 1 versus carga.....	65
Figura 3.12: Comparação entre os valores obtidos de R_{ct} (■) com o modelo 1 e o previsto pela curva de trabalho apresentada na figura 3.8 (—).	66
Figura 3.13: a) o modelo 2; b) ajuste entre a curva experimental de óxido com carga de 268 μC (□) e o modelo 2(*).	67
Figura 3.14: a) relação da R_{ox} obtida com o modelo 2 versus carga; b) relação da C_{ox} obtida com o modelo 2 versus carga.	67

Figura 3.15: Comparação entre os valores obtidos de R_{ct} (■) e o previsto pela curva de trabalho apresentada na figura 3.8 (—).	68
Figura 3.16: a) o modelo 3, b) ajuste entre a curva experimental de óxido com carga de 268 μC () e o modelo 3(*).	69
Figura 3.17: a) relação da R_{ox} obtida com o modelo 3 versus carga; b) relação da C_{ox} obtida com o modelo 3 versus carga.	69
Figura 3.18: Comparação entre os valores obtidos de R_{ct} (■) e o previsto pela curva de trabalho apresentada na figura 3.8 (—).	70
Figura 3.19: a) o modelo 4, b) ajuste entre a curva experimental de óxido com carga de 268 μC () e o modelo 4(*).	71
Figura 3.20: a) relação da R_{ox} obtida com o modelo 4 versus carga; b) relação da C_{ox} obtida com o modelo 4 versus carga.	71
Figura 3.21: Comparação entre os valores obtidos de R_{ct} (■) e o previsto pela curva de trabalho apresentada na figura 3.8 (—).	72
Figura 3.22: Log i_{pa} versus carga, para o eletrodo de platina em uma solução de ferri-ferrocianeto de potássio. O coeficiente de correlação da reta é de 0,84.	77
Figura 3.23: Log R_{ct} versus carga, os valores de R_{ct} foram obtidos para o modelo 4.	78
Figura 3.24: Log R_{ct} versus carga, valores de R_{ct} obtidos com o modelo 4 para camadas de óxido formadas eletroquimicamente (■); valor da carga para as camadas de óxido formadas quimicamente (Δ).	79
Figura 3.25: Gráfico de Bode ângulo de fase para o eletrodo de platina em uma solução de ferri-ferrocianeto de potássio para uma camada de óxido	

formada quimicamente (—), para uma camada de óxido formada eletroquimicamente com carga 1000 μC (---) e 50 μC (-o-). 80

Figura 3.26: Resultado dos valores dos componentes elétricos obtidos com o ajuste ao modelo 4. Os valores são resultado da média de 7 experimentos para camada eletroquímica (carga média de 61 μC) e 2 experimentos para camada química. Colunas brancas para C_{ox} e R_{ox} e colunas cinzas para C_{dl} e R_{ct} . O intervalo de confiança é de 90%. 81

Figura 3.27: Desenho esquemático: a) camada de óxido formada quimicamente; b) camada de óxido formada eletroquimicamente. 82

Figura 3.28: a) Voltamograma cíclico, b) Gráfico Nyquist; para o eletrodo de platina em uma solução de ferri-ferrocianeto de potássio, (Δ) superfície sem óxido recoberta com proteína desativada; (\circ) superfície com óxido e recoberta com proteína desativada. 83

Figura 3.29: a) ajuste entre a curva experimental da adsorção da con A na forma desativada (\blacksquare) e o modelo 4 (*); b) comparação entre os valores da R_{ct} obtidos com o modelo 4 para a con A adsorvida na forma: desativada sobre óxido eletroquímico (+), desativada sobre óxido químico (Δ); ativada sobre óxido eletroquímico (*), ativada sobre óxido químico() e curva de trabalho (—). 84

Figura 3.30: Resultados da adsorção da con A ativada e desativada sobre óxido químico e eletroquímico, esses resultados são médias de 7 experimentos obtidos para os seguintes componentes do modelo 4: a) R_{ct} ; b) R_{pro} 86

Figura 3.31: Resultados obtidos para a adsorção da con A ativada e desativada sobre óxido químico e eletroquímico, esses resultados são médias de 7 experimentos obtidos para a componente C_{dl} no modelo 4. 87

Figura 3.32: Variação da R_{ct} com a carga, resultados obtidos para o eletrodo de platina em ferri-ferrocianeto de potássio utilizando o modelo 4.....	87
Figura 3.33: R_{ct} (óxido+proteína) versus carga para o eletrodo de platina exposto 30 min em con A desativada em ferri-ferrocianeto de potássio.....	88
Figura 3.34: Log R_{ct} versus espessura da camada de óxido (d), para o eletrodo de platina em ferri-ferrocianetode potássio.....	92
Figura 3.35: Desenho esquemático da transferência de elétrons através da camada de proteína e o tunelamento.	94

Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Código para descrição de circuitos do programa EQUIVCRT.....	29
Tabela 3.1: Valores calculados para a espessura da camada de óxido utilizando as expressões 3.8 e 3.7.....	75
Tabela 3.2: Valores das componentes R_{pro} , C_{pro} , R_{ct} e C_{dl} obtidos para a adsorção da con A em diversas condições experimentais utilizando o modelo 4.....	85
Tabela 3.3: Valores do percentual de área recoberta com proteína obtida a partir da carga $Q_{ads}\%$, da voltametria cíclica $R_{ct}\%$ (VC) e impedância $R_{ct}\%$ (IM).....	90
Tabela 3.4: Valores da espessura da con A utilizando a R_{ct} e aplicando a curva de trabalho mostrada na figura 3.34.....	93
Tabela 3.5: Valor da espessura da camada de con A obtida utilizando a componente R_{pro} para várias condições experimentais.....	95
Tabela 3.6: Valor da espessura da con A obtida utilizando a componente C_{pro} para várias condições experimentais.....	98
Tabela 3.7: Resultados mostrando o aumento relativo da resistência do carboidrato em relação a con A $\Delta\%R_{pro}$, para diversas condições experimentais.....	100
Tabela 3.8: Valores das componentes R_{pro} , C_{pro} , R_{ct} e C_{dl} obtidos para a adsorção da lentil em diversas condições experimentais utilizando o modelo 4.....	102

Tabela 3.9: Valor da espessura da camada de lentil obtida utilizando a componente R_{pro} para várias condições experimentais. 103

Tabela 3.10: Distância obtida para a conformação das cadeias da lentil obtida utilizando a componente C_{pro} para várias condições experimentais. 104

Tabela 3.11: Resultados mostrando o aumento relativo da resistência do carboidrato em relação a lentil $\Delta\%R_{pro}$, para diversas condições experimentais. 105

Lista de Símbolos

A	área do eletrodo (m^2)
$A_{\text{proteína}}$	área ocupada pela proteína (m^2)
C	capacitância (F)
C^*	concentração no seio da solução (mol/L)
C_{dl}	capacitância da dupla camada (F)
C_{ox}	capacitância do óxido (F)
C_{pro}	capacitância da proteína (F)
C_s	capacitância em série num circuito elétrico (F)
$d_{\text{média}}$	espessura média da camada composta por regiões recobertas com proteínas e outras com óxido (m)
$d_{\text{óxido}}$	espessura de regiões recoberta com óxido (m)
D_o e D_R	coeficientes de difusão da espécie oxidada e reduzida ($cm^2 \cdot s^{-1}$)
$d_{\text{proteína}}$	espessura de regiões recoberta com proteínas (m)
E	potencial (V)
ΔE_p	separação entre os picos catódicos e anódicos (mV)
e_T	queda do potencial através de um circuito elétrico (V)
F	constante de Faraday ($9,65 \times 10^4$ C/equiv).
i_a	corrente anódica (A)
i_c	corrente para o processo capacitivo (A)
i_f	corrente para o processo faradaico (A)
i_o	corrente de troca (A)
i_{pa}	corrente de pico anódica (A)
k_a	fator pré-exponencial, no modelo de Damjanovic, dependente da escolha do eletrodo de referência
k^o	constante heterogênea de velocidade ($cm \cdot s^{-1}$)
Da	dalton, unidade de massa muito próxima do átomo de hidrogênio
L	indutância (H)

m	parâmetro experimental determinado no modelo de Damjanovic por $(\partial E/\partial q)_i$ ($VC^{-1}m^2$)
n	número total de elétrons transferidos
q	carga (C) no modelo de Damjanovic equivalente à espessura do filme ou a largura da barreira para o tunelamento
$Q_{ads}\%$	percentual da superfície recoberta com proteína dada pela carga (%)
$Q_{(sem\ prote\text{ina})}$	carga obtida integrando-se no voltamograma cíclico a área sob os picos de ferri-ferrocianeto de potássio (C/m^2)
$Q_{(com\ prote\text{ina})}$	carga obtida integrando-se no voltamograma cíclico a área sob os picos de ferri-ferrocianeto de potássio após a adsorção da proteína (C/m^2)
R	constante dos gases ($8,31\ J.mol^{-1}.K^{-1}$)
R	resistência (Ω)
R_{car}	resistência do carboidrato somada a resistência da proteína e ainda se presente somada a resistência do óxido (Ω)
R_{ct}	resistência de transferência de elétron (Ω)
$R_{ct}\%$	percentual da superfície recoberta com proteína, dada pela resistência (%)
R_{ox}	resistência do óxido (Ω)
R_{pro}	resistência da proteína somada a resistência do óxido se presente (Ω)
$\Delta\%R_{pro}$	aumento relativo da resistência (%)
R_s	resistência em série em um circuito equivalente (Ω)
R_{Ω}	resistência ôhmica oferecida pela solução no transporte dos íons entre o eletrodo de trabalho e o de referência (Ω)
T	temperatura (K)
t	tempo (s)
X_c	reatância capacitiva, $1/C.\omega$ (Ω)
Z	impedância (Ω)
Z_f	impedância faradaica (Ω)
Z_{im}	componente capacitiva ou imaginária na medida de

	impedância (Ω)
Z_{re}	componente resistiva ou real na medida de impedância (Ω)
Z_w	impedância de Warburg que indica a resistência na transferência de massa (Ω)
α	coeficiente de transferência
β	fator de simetria que está relacionado a α
δ	parâmetro determinado experimentalmente utilizado no modelo de Damjanovic dado por $2(\partial \ln i / \partial d)$ (\AA^{-1})
ϵ	constante dielétrica do material que está na interface eletrodo/solução
ϵ_0	constante de permissividade do vácuo ($8,85 \times 10^{-12} \text{F. m}^{-1}$)
$\Delta\phi$	potencial de Galvani (V)
$\Delta\phi_e$	potencial no equilíbrio (V)
η	sobrepotencial (V)
ν	velocidade de varredura na voltametria cíclica (V.s^{-1})
θ	ângulo de fase que mostra a defasagem entre a tensão e a corrente (Hz)
σ	coeficiente de Warburg ($\Omega.s^{-1/2}$)
ρ	resistividade ($\Omega.cm$)
ω	frequência angular da onda senoidal (rad.s^{-1})
ψ	parâmetro cinético adimensional da voltametria cíclica associado a ΔE_p

Resumo

O objetivo deste trabalho foi estudar a interface platina/lectina utilizando métodos impedimétricos. Lectinas pertencem a um grupo de proteínas com especificidade a carboidratos, característica que ampliou o foco da tese também para a interação da proteína e o carboidrato.

Neste trabalho foi verificado que as lectinas, concanavalina A e lentil, adsorvem espontaneamente sobre a platina e esse processo é fortemente afetado pela presença de óxido. Essa forte adsorção, ocasionada pela modificação da superfície com um filme de óxido, foi constatada na voltametria cíclica pelo bloqueio da superfície que praticamente suprimiu os picos de óxido-redução do ferri-ferrocianeto de potássio. Na espectroscopia de impedância houve um aumento de pelo menos 10 vezes na componente resistiva do sistema.

A adsorção da proteína foi explicada por um modelo que prevê uma camada contínua, porém, permeável. Nesse modelo o parâmetro definido como resistência da proteína informa a quantidade de proteína adsorvida. Os resultados mostraram que em uma superfície sem óxido a adsorção está associada à formação de uma monocamada e sobre uma superfície modificada com óxido a adsorção foi associada à formação de multicamadas de proteína. O valor encontrado para uma monocamada de concanavalina A foi de 28 Å e para a lentil de 20 Å, não se observando uma diferença significativa entre as forma ativada e desativada das mesmas. Na formação de multicamadas, o valor da espessura para a forma ativada da concanavalina A é de 108 Å e para desativada de 277 Å, para a lentil foram respectivamente de 84 Å e 239 Å. Neste caso, a diferença obtida entre a forma ativada e desativada foi atribuída à presença dos sais de ativação, cálcio e manganês, que proporcionam uma estrutura mais compacta à proteína ativada. O parâmetro associado à capacitância da proteína pôde ser relacionado à conformação da mesma, os resultados mostraram que sobre uma superfície com óxido a proteína adsorve em uma conformação mais compacta.

A sensibilidade da concanavalina A, adsorvida sobre uma superfície com óxido, foi verificada frente à glicose, glicogênio e galactose e observou-se que esta é mais sensível a glicose, açúcar para o qual é específica e menos sensível a galactose, açúcar para o qual não é específica. Esse resultado mostra que a proteína retém sua especificidade e seletividade mesmo quando adsorvida. Para a lentil, apenas foi verificada a sensibilidade frente ao glicogênio e que relativamente a con A apresentou uma sensibilidade menor.

Abstract

The aim of this work was to study the platinum/lectin interface by impedimetric methods. Lectins belong to a group of proteins specific to carbohydrates. This characteristic also amplified the focus of this thesis to the protein-carbohydrate interaction.

In this work was verified a spontaneous adsorption of the lectins, concanavalin A and lentil, and this process is strongly affected by the presence of an oxide film. Cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy yielded measurable response to this strong adsorption, improved by the presence of the oxide film. The first technique shows a decrease of the peaks of ferricyanide/ferrocyanide and the second a 10 fold increase in the resistive component.

The model to explain the protein adsorption was that of a continuous, but permeable layer. The protein resistance, extracted from this model, indicates the amount of protein adsorbed. The results show that the protein adsorption forms a monolayer when no oxide is present and a multilayer when oxide is present. A monolayer of concanavalin A was estimated to be about 28 Å and for the lentil to be about 20 Å no distinction was made between the activated or deactivated form of the lectin. For multilayers the thickness of the concanavalin A and lentil were of 108 Å and 84 Å for the activated form and 277 Å and 239 Å for the deactivated form. The reason for the difference between the activated and deactivated form is explained due to the presence of calcium and manganese salts, which confer to the protein a higher compactness. The capacitance of the protein is related to conformational changes, in this way, protein adsorption over surfaces modified by oxide films displays a more compact conformation.

The interactions of concanavalin A with glucose, glycogen and galactose have been investigated. The protein, in this case, was adsorbed over a surface covered with an oxide film. The results show that the protein is more sensible to glucose, carbohydrate for which it is specific, and less sensible to galactose, carbohydrate for which it is not specific. In this manner, the protein retains its specificity and selectivity even when adsorbed. For the lentil, only was verified the interaction with glycogen and comparatively to concanavalin A, lentil was less sensible.

CAPÍTULO 1

1) INTRODUÇÃO

Existe um grande interesse em se conhecer mais amplamente interações de proteínas com sólidos metálicos para o desenvolvimento de materiais biocompatíveis^{1, 2}. Exemplos dessas interações são vistas em próteses ósseas³, dentárias⁴, transplantes, equipamentos na indústria alimentícia⁵ e sensores^{6, 7}. No entanto, observa-se nessas interfaces, um desgaste dos materiais por corrosão⁸, incrustação⁹ ou ainda no caso das próteses e transplantes, a rejeição^{10,11}. Esses efeitos despertaram a atenção para a necessidade de se compreender melhor a interface proteína/metal para assim se poder evitar ou pelo menos minimizar esses problemas.

Os objetivos da tese foram então estabelecidos em duas frentes: uma entender melhor a interação de uma proteína com um eletrodo sólido e a outra verificar a aplicabilidade da espectroscopia de impedância como método de detecção em sensores. Visando-se esses objetivos escolheu-se uma proteína pertencente à família das lectinas que possui especificidade a carboidratos. A

especificidade da lectina permite que a pesquisa também seja direcionada ao desenvolvimento de sensores. Nesse caso a interação lectina/carboidrato não envolve transferência de elétrons, que seria um requisito indispensável na detecção eletroquímica usual (potenciométrica ou amperométrica), por isso, utilizou-se a espectroscopia de impedância, que é uma técnica sensível a fenômenos interfaciais. Além disso, esse tipo de interação é semelhante às do tipo antígeno/anticorpo, interação que é atualmente empregada em imunoenaios realizados por dispositivos que utilizam esses princípios no ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays), técnica eficiente, no entanto cara e demorada. Esforços vêm sendo feitos na procura de um imunossensor que efetue a detecção de forma direta e contínua.

No início da investigação cogitou-se a necessidade de se imobilizar a proteína ao eletrodo por meio de um agente químico, no entanto, esse procedimento foi dispensado depois de se verificar que a lectina adsorvia espontaneamente ao eletrodo, a seguir veio a tarefa de obter-se superfícies reprodutíveis uma vez que a medida da impedância se mostrou sensível aos procedimentos do preparo da superfície. A adsorção da lectina foi verificada em ouro, carbono vítreo e platina, dentre esses metais a platina foi escolhida como superfície trabalho. Com a finalização dessas etapas e visando verificar qual o efeito na adsorção da proteína, propôs-se a modificação da superfície da platina com um filme de óxido. Verificou-se a sensibilidade e a seletividade da proteína adsorvida sobre platina e platina modificada com um filme de óxido frente ao glicogênio, glicose e galactose.

Paralelamente foi necessário desenvolver um método para interpretar os eventos que ocorriam na interface eletrodo/solução e a forma como seriam apresentados, isto é, transformar a medida da impedância, numa grandeza de fácil compreensão como, por exemplo, a medida da corrente e potencial.

No primeiro capítulo da tese serão apresentados conceitos e informações sobre a adsorção de proteínas, lectinas, filme de óxido de platina e espectroscopia de impedância. No segundo capítulo será feita a apresentação dos métodos experimentais, no terceiro capítulo a apresentação dos resultados e discussões e finalmente no quarto capítulo, as conclusões.

1.1) Adsorção de Proteínas

A adsorção de proteínas a interfaces tem resultado em numerosas aplicações, como por exemplo, no desenvolvimento de biosensores, na separação de proteínas por cromatografia, como emulsificante, na indústria farmacêutica e cosmética, no processamento de alimentos. Existem também consequências negativas desse processo, como a incrustação e/ou corrosão nos equipamentos industriais de processamento de alimentos; entupimento das membranas de diálise renais devido à afinidade superficial das proteínas, a formação de placa dentária, rejeição em próteses ósseas e em transplantes de órgãos.

Proteínas são moléculas muito grandes resultantes da combinação de aminoácidos. Os aminoácidos têm vários tipos de cadeias laterais com naturezas físico-químicas diferentes. Algumas destas cadeias laterais contêm hidrocarbonetos tais como a valina, leucina, iso-leucina, outras contêm grupos ácidos como o ácido glutâmico, ácido aspártico, e ainda outras com grupos básicos como a lisina, arginina e histidina. É, portanto uma tendência natural das proteínas se associarem com quase todas as superfícies, dada a variedade de grupos (polares e apolares) presentes em sua estrutura.

Dois aspectos importantes são investigados na adsorção de proteínas, as mudanças conformacionais originadas pela adsorção e a quantidade de proteína adsorvida¹².

A orientação e conformação das moléculas adsorvidas determinam a sua atividade biológica por isso é de grande interesse determinar a configuração da proteína adsorvida e como essas são influenciadas pela superfície. Elas podem desdobrar-se ou desnaturar-se devido à quebra de ligações internas que seguram as cadeias dos aminoácidos em uma dada conformação. A facilidade da proteína desnaturar sobre uma superfície depende das propriedades da superfície e pode ser tomada como medida das interações entre uma dada proteína e uma dada superfície. A desnaturação de proteínas é uma das causas para a maioria dos materiais não poder ser incorporado em tecidos biológicos sem causar reações indesejáveis.

A quantidade de proteína adsorvida é influenciada por vários fatores dados pelas propriedades¹³ da mesma e da superfície do substrato. As proteínas com alta estabilidade interna, chamadas proteínas “duras”, adsorvem pouco sobre superfícies hidrofílicas, a não ser por forças de atração eletrostáticas, enquanto sobre superfícies hidrofóbicas, a adsorção ocasiona mudanças estruturais. Por outro lado, proteínas com menor estabilidade interna, denominadas proteínas “moles”, tendem a adsorver em todas as superfícies, independente de forças eletrostáticas, ajustando a sua conformação a superfície.

Geralmente a espessura de uma camada adsorvida é de uma monocamada¹⁴, no entanto a estrutura detalhada da camada é complicada, depende do tipo de proteína e do tipo de superfície. As proteínas podem aderir umas sobre as outras formando multicamadas¹ de espessura ilimitada, a não ser que a adição de uma nova monocamada represente um rearranjo eletrostático muito alto. Contudo a adsorção pode induzir a mudanças conformacionais que alterem a distribuição de carga e ligações de hidrogênio. Portanto, também afetando a capacidade da proteína ligar-se a outra proteína, permitindo assim a formação de multicamadas. Isso foi verificado com proteínas bem flexíveis, mas de modo geral a formação de uma monocamada é a regra.

A maioria das proteínas globulares têm a forma de uma elipse¹⁷, o que permite dois tipos de configurações para a adsorção, uma lateral ou paralela (com o eixo mais longo da proteína voltada para a superfície) e a outra frontal ou perpendicular (com o eixo menor voltado para a superfície). Algumas vezes o tipo de configuração¹⁵ é estimado simplesmente a partir da quantidade de proteína adsorvida.

A quantidade máxima de proteína adsorvida é geralmente em torno do ponto isoelétrico¹⁶, devido a uma repulsão menor tanto internamente como lateralmente entre as moléculas adsorvidas.

Existe também uma correlação¹⁷ entre a adsorção máxima e a concentração da proteína, quanto maior a concentração em solução da proteína, maior é a adsorção mesmo que a adsorção seja irreversível. Três diferentes interpretações foram propostas para esse fato:

1) A proteína adsorve em mais de uma orientação: A molécula tende a maximizar o contato com a superfície para fixar mais firmemente saindo da forma perpendicular para a paralela, mas isso só acontece se nas proximidades não houver outra molécula. Assim em uma alta concentração a orientação favorecida é aquela perpendicular à superfície, veja a figura 1.1.

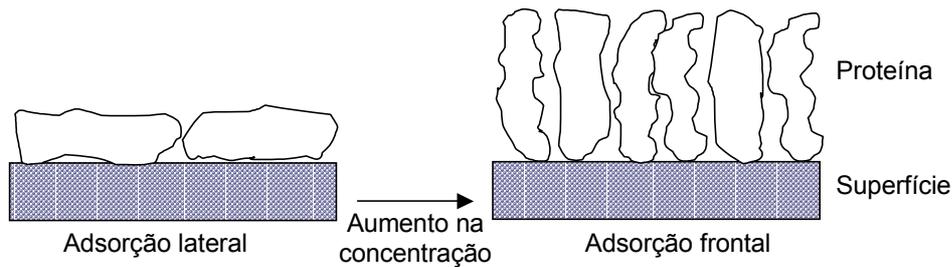


Figura 1.1: Correlação entre o aumento da concentração e a configuração da proteína adsorvida.

2) A proteína forma uma estrutura bidimensional ordenada: A proteína na superfície pode cristalizar num arranjo mais próximo e ordenado do que se depositar ao acaso. Uma concentração mais alta favorece a nucleação dos cristais enquanto em baixas concentrações de proteína estas encontram amplo espaço para se acomodar em uma configuração mais achatada.

3) A proteína pode desnaturar devido à interação com a interface, o que é essencialmente similar ao processo de reorientação da proteína. A proteína pode desnaturar tendo mais espaço pra relaxar sobre a superfície e ao mesmo tempo esse processo pode ser bloqueado pela chegada de outras moléculas à vizinhança.

1.1.2) Efeitos que Influenciam a Interação Entre a Proteína e a Superfície Sólida

1.1.2.1) Efeito de Carga

Quando a superfície adsorvente é dotada de carga¹⁶ a massa adsorvida cresce com o aumento do contraste de carga entre a superfície e a proteína. A presença de eletrólitos em solução favorece a separação dessas cargas, tanto que geralmente o aumento da força iônica ocasiona um aumento na quantidade de proteína adsorvida. A influência da concentração do eletrólito não é facilmente explicada, mas quando esse efeito é presente diz-se que a adsorção é determinada por interações internas ou entre moléculas da proteína.

Direcionando a discussão apenas para a presença de carga na proteína. Observa-se que a adsorção é maximizada na região isoelétrica¹⁸ da proteína, que pode ser explicada pela minimização da repulsão intra e intermolecular próximo à interface. A estabilidade das proteínas globulares decresce com o aumento da carga líquida na molécula e assim mudanças estruturais podem ocorrer quando a adsorção ocorre longe do ponto isoelétrico. O distanciamento do ponto isoelétrico ocasiona a redução na adsorção, o que é explicado devido a um rearranjo estrutural da proteína e também a repulsão lateral entre as proteínas adsorvidas. Apesar dessa característica ser freqüente entre as proteínas não é uma regra, como por exemplo, a ribonuclease adsorve em toda a superfície hidrofóbica independente da carga; sobre superfícies hidrofílicas somente se houver atração eletrostática.

Do ponto vista macroscópico, proteínas “moles” adsorvem em uma superfície mudando a sua estrutura para se adaptar a superfície. E proteínas “duras” adsorvem em superfícies com carga oposta com pouca mudança estrutural a não ser por uma forte interação hidrofóbica.

1.1.2.2) Efeito Hidrofóbico

O termo “interação hidrofóbica” se refere a desidratação espontânea e a subsequente agregação de componentes apolares em um meio aquoso. Essas interações são caracterizadas por um grande aumento na entropia e um efeito relativo pequeno na entalpia.

A tendência de grupos apolares, hidrofóbicos¹² de uma proteína globular, em resistir ao contato com o ambiente aquoso faz com que a proteína adquira uma conformação que proteja esses grupos desse contato. A adsorção da proteína é facilitada em superfícies isentas de água, no entanto pode ocorrer a desidratação espontânea de partes da proteína promovidas pelo ganho da entropia, e, portanto, a adsorção ocorre espontaneamente.

Foi observado que a hidrofobicidade da superfície causa mudanças estruturais mais pronunciadas na proteína. Em superfícies hidrofóbicas existe, portanto uma força atuando na proteína tentando girar (virar a direção) desses terminais para a superfície.

O caráter hidrofóbico ou hidrofílico de uma superfície pode ocasionar uma diferente orientação¹⁹ na proteína no momento de sua adsorção.

1.1.2.3) Efeito da Temperatura

A estrutura da proteína é drasticamente afetada pela temperatura²⁰. Por isso a temperatura tem uma grande influência na isoterma de adsorção. Não existe uma regra para o efeito da temperatura atuar na quantidade de proteína adsorvida, depende das mudanças estruturais sofridas pela mesma.

1.2) Lectinas

A pesquisa das lectinas^{21,22} tem o seu início desde o final do século XIX, quando em 1888-1889 Hermann Stillmark²³, estava estudando a toxicidade das sementes de *Ricinus communis* (mamona), motivado pelos problemas causados por essa planta aos animais. Ele observou que o extrato dessas sementes quando misturado ao sangue, aglutinava as células vermelhas, ou seja, a hemaglutinação. Ele demonstrou ainda, que o material que promovia essa aglutinação era uma proteína, que foi denominada de ricina.

O termo lectina se origina do latim lectus que significa selecionado, escolhido, mas antes de ser utilizado para definir um grupo de substâncias, outros termos foram empregados, como por exemplo: aglutininas. A definição²⁴ hoje para essas substâncias é que são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica que apresentam um ou mais sítios de ligação para carboidratos.

As lectinas foram isoladas de plantas, animais e microorganismos e que apesar delas possuírem muitas propriedades em comum, representam um grupo bastante diversificado de proteínas com respeito ao tamanho, composição e estrutura. Neste estudo a atenção é direcionada as lectinas provenientes das leguminosas.

1.2.1) Lectinas Leguminosas

A família das lectinas leguminosas²⁵ é a maior e mais amplamente das famílias estudada, onde 100 membros foram caracterizados, quase todos isolados de sementes.

Tipicamente as lectinas derivadas das leguminosas são constituídas por 2 ou 4 subunidades idênticas ou pelo menos quase. Cada subunidade com 25 a 30 KDa, com um sítio específico a carboidrato, dois sítios para os cátions

divalentes cálcio e manganês, esses metais são fundamentais para a ligação do carboidrato. Além disso, muitas lectinas possuem sítios hidrofóbicos²⁶ que ligam compostos não polares tais como a adenina e o ácido indolacético.

As subunidades das lectinas leguminosas são normalmente compostas por cadeias simples de polipeptídeos com cerca de 250 aminoácidos.

A concanavalina A e a lentil, são lectinas pertencentes a família das leguminosas, ambas são específicas a manose/glicose e serão apresentadas em maiores detalhes respectivamente nas seções 1.2.1.1 e 1.2.1.2.

1.2.1.1) Concanavalina A

A primeira lectina obtida de forma pura, foi isolada de extratos da *Canavalia ensiformis*²² (feijão de porco), denominada de concanavalina A (ou con A). A concanavalina A, foi isolada em 1919 por James Summer, mas somente em 1936, Summer e Howell²⁷, verificaram que ela precipitava glicogênio em solução e que sua atividade hemaglutinante era inibida pela cana de açúcar. Esse teste verifica a capacidade da lectina aglutinar eritrócitos e como essa propriedade pode ser inibida por carboidratos, no caso da con A, demonstrou-se a sua especificidade por manose/glicose.

A con A existe como um dímero, no pH 5,0 de peso molecular 55000 e composto por duas subunidades idênticas²⁸. No pH 7, passa de uma forma dimérica para uma tetramérica com um peso molecular de 110000. As subunidades têm a forma de uma elipse com as seguintes dimensões 42 x 40 x 39 Å.

A estrutura molecular²⁹ consiste de duas folhas β antiparalelas pregueadas, uma com 6 fitas, com a forma quase plana e a outra com 7 fitas, com a forma côncava. Não estão presentes α -hélices. Cerca de 50% dos resíduos se encontram nas regiões dos loops e nas voltas β que conectam as fitas. Os sítios específicos ao carboidrato e aos íons metálicos localizam-se no topo de cada subunidade. A forma côncava da folha, aquela composta por 7 fitas, fornece um sítio raso e de fácil acesso ao carboidrato. O cálcio e o

manganês estão afastados entre si em 4,25 Å, estes metais são ligados a quatro aminoácidos e 2 moléculas de água, conforme representado na figura 1.2. Os aminoácidos que coordenam o cálcio à proteína são o ácido aspártico (Asp 208) e a asparagina (Asn 14) que também formam ligações de hidrogênio com o monossacarídeo. Daí a importância desses metais, que auxiliam a posicionar os aminoácidos para receber o monossacarídeo (sem, no entanto se ligarem diretamente ao mesmo) e auxiliam a manter a integridade da subunidade.

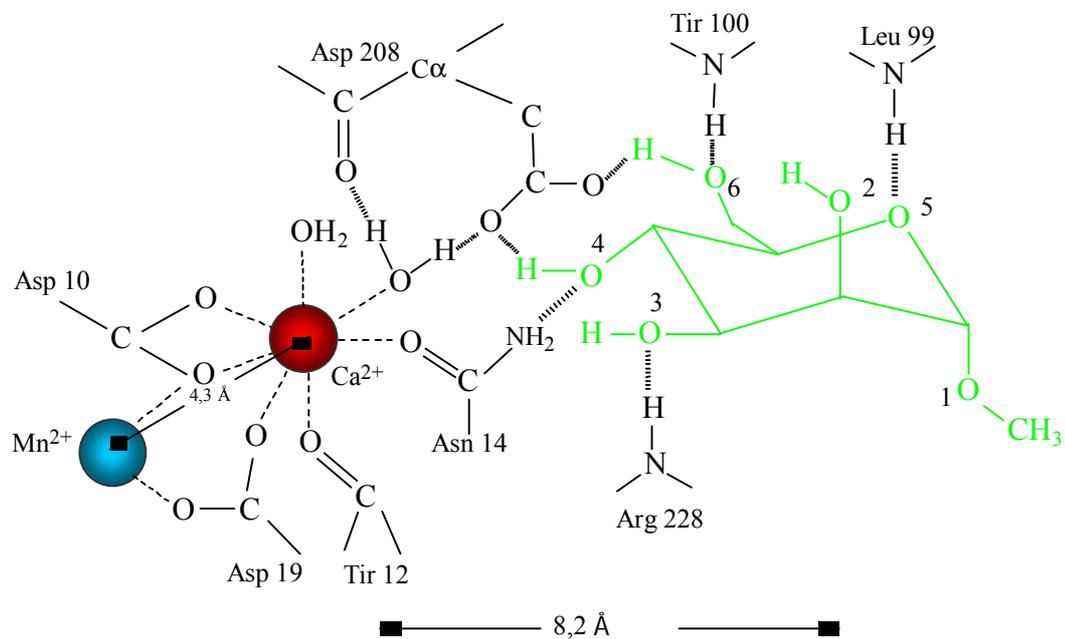


Figura 1.2: Representação da localização dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} na concanavalina A e a sua interação com um carboidrato (metil-manose).

1.2.1.2) Lentil

A lentil é obtida da leguminosa *Lens culinaris*, ou popularmente lentilha, a sua atividade hemaglutinante foi identificada em 1908 por

Lansteiner e Raubitschek³⁰. A lentil e a con A fazem parte do grupo específico a glicose/manose, embora entre elas existam algumas diferenças quanto à sensibilidade frente a esses açúcares. A con A comparada a lentil apresenta maior sensibilidade^{31,32} a glicose e manose, no entanto a inversão dessa característica foi observada com a frutose.

A lentil na forma dimérica³³ é constituída por uma cadeia α (leve) e outra β (pesada) e similarmente a con A também necessita dos íons metálicos cálcio e manganês para reter a atividade biológica. O peso molecular³⁴ gira em torno de 42000, apresenta uma estrutura compacta em pH neutro formada principalmente por folhas β .

1.2.3) Interação da Lectina e o Carboidrato

A interação³⁵ entre a lectina e o carboidrato segue um modelo do tipo chave-fechadura como ocorre para a enzima e o seu substrato. A formação do complexo envolve o deslocamento de moléculas de água associada a grupos polares da proteína com a região de alta polaridade do açúcar, com o estabelecimento de novas ligações de hidrogênio, estas últimas e os contatos de van der Waals são forças dominantes na estabilidade das ligações. As ligações de hidrogênio são formadas entre os grupos hidroxila do açúcar e os grupos NH e átomos de oxigênio da proteína.

Na con A assim como nas demais lectinas³⁶ de leguminosas existem três aminoácidos sempre presentes e invariantes para a ligação do carboidrato: um aspartato (Asp 208), uma asparagina (Asn 14) e uma Arginina (Arg 228), em outras lectinas a arginina é substituída por uma glicina, independente da especificidade. Os ácidos aspártico e a asparagina também participam na coordenação do íon cálcio, presente em todos os membros dessa família, o que explica a necessidade desse íon para a ligação do carboidrato.

Os três aminoácidos envolvidos na ligação do carboidrato estão presentes em todas as lectinas leguminosas e têm uma disposição espacial idêntica, a discriminação entre os monossacarídeos ocorre porque os

monossacarídeos (manose/glicose) são orientados de forma diferente da galactose. Por exemplo, na con A, a ligação da manose/glicose é orientada de tal forma que o ácido aspártico faça duas pontes de hidrogênio com o OH-6 e OH-4 do açúcar e a asparagina uma ligação entre o NH e o OH-4 do açúcar enquanto para uma lectina específica a galactose, o ácido aspártico faz duas pontes de hidrogênio com OH-3 e OH-4 do açúcar e a asparagina uma ligação entre o NH e o OH-3 do açúcar. Como esperado as lectinas específicas a manose/glicose não formam ligações em OH-2 justamente a hidroxila que diferencia esses dois açúcares. É claro, portanto, que os aminoácidos de contato não são necessariamente os maiores determinantes na especificidade, mas a composição e a precisa disposição dos aminoácidos que envolvem o sítio combinatório. Pequenas mudanças na estrutura do sítio podem, portanto resultar em uma grande mudança na especificidade da proteína.

1.2.4) Aplicações das Lectinas

Lectinas podem ser utilizadas para explorar superfícies celulares pela sua afinidade pela porção carboidrato das glicoproteínas e glicolipídeos projetados na célula. Glicoproteínas e glicolipídeos são moléculas complexas que estão presentes na superfície celular e que estão intimamente envolvidas em fenômenos importantes como nas interações entre bactérias, vírus e células cancerosas³⁷. No campo da glicobiologia, estas interações carboidrato-proteína têm sido foco de intenso interesse na última década, especialmente no desenvolvimento de métodos para a caracterização de estruturas complexas de carboidratos³⁸ em superfícies celulares. A interação entre uma lectina e um carboidrato é uma maneira controlada de se investigar uma superfície celular, o que pode ser uma ferramenta para se obter informações nessa área da biologia.

As lectinas são úteis como matrizes em colunas de cromatografia para a separação e caracterização de glicoproteínas, glicolipídeos e

oligossacarídeos^{39,40,41}. Estudo histoquímico de células e tecidos, rastreamento de caminhos neurais, tipagem sanguínea^{42,43}.

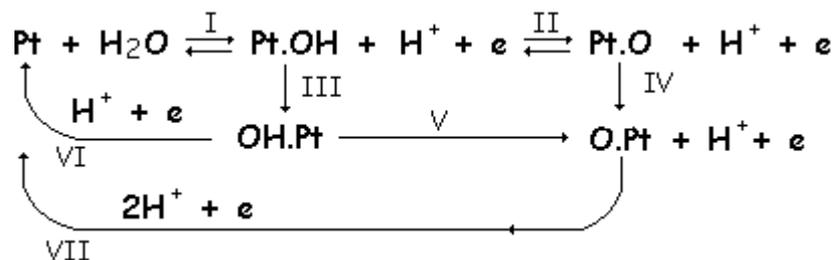
Além disso, as lectinas são excelentes modelos para examinar reações específicas que ocorrem entre proteínas e outros tipos de moléculas, como por exemplo, as ligações antígeno-anticorpo, substrato-enzima, droga-proteína^{6,39,44,45}.

1.2) Filme de Óxido de Platina

A formação de um filme de óxido sobre a platina teve um grande impacto na adsorção das lectinas estudadas. A diferença observada na afinidade dessas proteínas pela superfície motivou o estudo da interface platina/óxido de platina/proteína. Na literatura encontram-se trabalhos que relatam vantagens da adsorção de proteínas sobre óxido de titânio⁴⁶, óxido de zinco⁴⁷ e óxido de alumínio⁴⁸. É comentado que as interações em tais filmes são principalmente de origem eletrostáticas, e observou-se que nessas superfícies a adsorção é rápida, com alta estabilidade, impedindo a desnaturação da proteína.

A formação de óxidos sobre eletrodos de platina e outros metais nobres é um assunto bastante estudado devido à importância dessas superfícies para as reações catalíticas como, por exemplo, na evolução de O₂ e Cl₂, para a eletroorgânica no estudo de reações anódicas, pois esses filmes podem afetar a cinética dos processos de transferência de elétrons.

O mecanismo de formação da camada de óxido tem algumas propostas e estas variam conforme a espessura do filme e condições de formação desse mesmo filme. Para filmes finos de óxido, apresenta-se no esquema 1, um mecanismo proposto por Kozłowska, Conway e Sharp⁴⁹.

Esquema 1:

Na etapa quase reversível (I) da eletrodeposição do OH sobre a Pt pode ocorrer a formação do PtO mostrado em (II). As etapas (III) e (IV) são possibilidades da espécie O e/ou OH sofrer um rearranjo com a estrutura da Pt, esse rearranjo tanto pode ser uma reconstrução da superfície ou uma troca de posição entre as espécies O e OH com a Pt. As etapas (VI) e (VII) se referem a redução da camada de óxido. De uma forma geral filmes de óxidos formados eletroquimicamente envolvem a Pt no estado de oxidação 2^+ correspondendo à formação do PtO.

Para filmes formados a potenciais⁵⁰ mais altos (acima de 2-3 V/NHE) existe um consenso de que espécies Pt(IV) são predominantemente formadas, na forma de PtO_2 , Pt(OH)_4 ou ainda estas formas hidratadas. A potenciais mais baixos, a interpretação é mais difícil e formas como PtO_{ads} , Pt(OH)_2 , PtO e $\text{PtO.H}_2\text{O}$ podem ser formadas, mas a maioria concorda que espécies Pt^{2+} estão presentes.

A formação e redução de camadas de óxido produzidas eletroquimicamente geram uma histerese entre a corrente de formação em função do potencial e a corrente de redução, onde quanto mais positivo o potencial (e/ou o tempo) para a formação de um filme óxido, menos positivo é o potencial de redução. Este comportamento reflete o aumento da estabilidade do filme formado a potenciais oxidativos mais altos e não se aplica somente a monocamada de óxido, 2-D de "OH" ou "O", reconstruída, mas também ao filme mais extenso quase 3-D que pode ser formado a potenciais substancialmente mais elevados.

No modelo de Mott-Cabrera⁵¹ é proposto que o metal é recoberto por um filme de espécies adsorvidas contendo oxigênio e que íons e elétrons se movem independentemente no filme; os elétrons passam do metal para as

espécies adsorvidas através de um processo de tunelamento. Em consequência desse processo, um forte campo elétrico é estabelecido através da interface óxido/metal e este é responsável por “injetar” cátions metálicos da superfície metálica através do filme. O modelo consta de duas etapas: a primeira a formação de íons metálicos na interface metal/óxido; e a segunda etapa, a migração desses íons através do filme.

O primeiro mecanismo proposto (Kozłowska, Conway e Sharp) sugere que o crescimento do filme ocorre num processo de troca entre o metal e oxigênio e assim sucessivamente enquanto o segundo, de Mott-Cabrera, sugere o deslocamento do íon metálico, motivado por um campo elétrico.

Leis para explicar o crescimento desses filmes também foram propostas, mas surgiram algumas controvérsias, pois filmes com diferentes características eram obtidos inclusive com diferentes espessuras. Atualmente se tem conhecimento de que esses filmes podem ser constituídos por dois tipos de estruturas⁵²: a primeira que atinge um limite de crescimento, um filme tipo 2-D que se estende por uma a duas monocamadas; e a segunda estrutura, um filme tipo 3-D que não tem limite para o crescimento.

Damjanovic⁵³ pesquisou detalhadamente a reação de evolução de oxigênio sobre a platina e propôs a seguinte equação 1.1 para a velocidade de reação:

$$i = i_0 \exp\left[\alpha \frac{\Delta V}{d}\right] \quad \{1.1\}$$

Onde, i_0 é corrente de troca, α é o coeficiente de transferência, d é a espessura do filme e $\Delta V=(V-V_0)$ é o campo interno ao filme de óxido, V_0 é o potencial onde $d=0$.

A equação 1.1 se baseia no mecanismo de Mott-Cabrera, nesse caso, o potencial para a formação do óxido é mais alto e o grau de recobrimento da superfície é maior do que discutido no modelo de Kozłowska, Conway e Sharp. Deste modo, as espécies geradas não são tão facilmente reduzidas, pois provavelmente o grau de “reconstrução” é muito

maior e existe a possibilidade de uma completa irreversibilidade nas etapas de formação/redução do óxido.

1.4) Espectroscopia de Impedância

A espectroscopia de impedância é uma técnica conhecida por ser bastante sensível às modificações que ocorrem na interface eletrodo/solução e a adsorção de proteínas ocorre nessa interface, por isso, essa técnica foi escolhida para o monitoramento desse processo.

A impedância, de forma generalizada, é a medida de uma resistência. Observa-se desse modo que os fenômenos que ocorrem na interface eletrodo/solução serão interpretados utilizando-se elementos elétricos, tais como: resistores e capacitores. Então para se fazer uma boa conexão entre os conceitos físico-químicos e elétricos se fará uma breve revisão de alguns conceitos básicos.

1.4.1) Conceitos Básicos

Antes de se falar propriamente da espectroscopia de impedância se fará uma breve revisão do comportamento de uma tensão senoidal em circuitos elétricos contendo um resistor e/ou um capacitor.⁵⁴

Considere uma tensão do tipo:

$$e = E \sin(\omega t) \quad \{1.2\}$$

onde,

E é a amplitude da onda (Volt).

ω é a frequência angular ($\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$)

t é tempo (s).

Em um circuito elétrico contendo somente um elemento resistivo, figura 1.3,

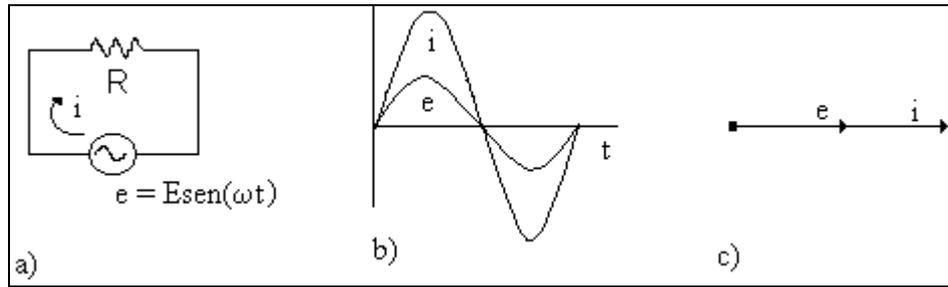


Figura 1.3: a) Circuito elétrico puramente resistivo. b) Relação entre a voltagem e a corrente em um circuito resistivo. c) Mostra a mesma relação de b, porém na forma de vetores.

a queda do potencial, e_T , através do circuito apresentado será dado por:

$$e_T = R \cdot i \quad \{1.3\}$$

Isolando a corrente e substituindo a tensão obtém-se,

$$i = E/R \text{ sen}(\omega t) \quad \{1.4\}$$

Observa-se que num circuito puramente resistivo, a tensão e a corrente estão em fase, figura 1.3b-c, diferindo apenas na amplitude por um fator de $1/R$, visto na equação 1.4.

Em um circuito elétrico contendo somente um elemento capacitivo, figura 1.4,

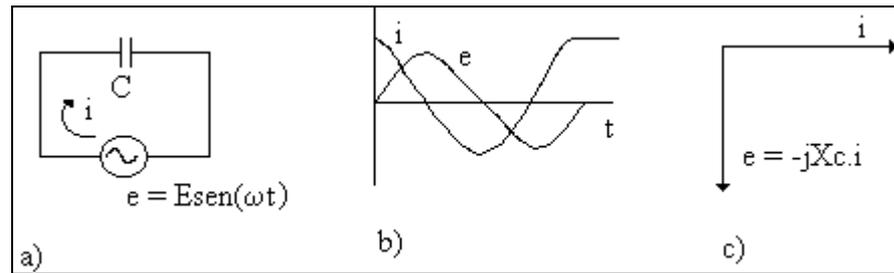


Figura 1.4: a) Circuito elétrico puramente capacitivo. b) Relação entre a voltagem e a corrente em um circuito puramente capacitivo. c) Mostra a mesma relação de b, porém na notação de vetores.

a queda de potencial no circuito da figura apresentado será dado por:

$$e_T = q/C \quad \{1.5\}$$

Para se obter a corrente, deriva-se a equação 1.5 e substitui-se a tensão:

$$i = \omega C E \cos \omega t \quad \{1.6\}$$

ou

$$i = \omega C E \text{sen}(\omega t + \pi/2) \quad \{1.7\}$$

Definindo-se $X_c = 1/\omega C$, como reatância capacitiva.

$$i = E/X_c \text{sen}(\omega t + \pi/2) \quad \{1.8\}$$

Observa-se que em um circuito puramente capacitivo a tensão e a corrente diferem na amplitude por um fator de $1/X_c$. A reatância capacitiva é um tipo de resistência, pois tem unidade de ohm, mas que difere das resistências comuns por variar com a frequência. Na equação 1.8 verifica-se que a corrente precede a voltagem por um fator de $\pi/2$, fato ilustrado na figura 4b. Para a representação vetorial, mostrada na figura 1.4c, a componente na ordenada, é multiplicada por $j = \sqrt{-1}$, também denominada de imaginária. A componente na abcissa denomina-se de real.

Em um circuito elétrico em que se combina um resistor e um capacitor em série tem-se que a queda de potencial é dada por:

$$e_T = e_R + e_C \quad \{1.9\}$$

expressando apenas a amplitude da equação acima, obtém-se:

$$E = i(R - jX_c) \quad \{1.10\}$$

ou

$$E = i.Z \quad \{1.11\}$$

Onde Z , representa a impedância⁵⁵ e é resultado da razão entre a tensão e a corrente, a representação gráfica de $Z=R - jX_c$ é mostrada na figura 1.5.

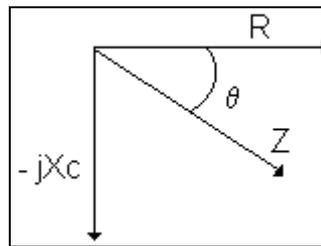


Figura 1.5: Representação vetorial da impedância

Analisando-se a figura acima se identificam as seguintes igualdades trigonométricas:

$$\theta = \tan^{-1}(X_c/R) \quad \{1.12\}$$

Onde θ é o ângulo de fase que mostra a defasagem entre a tensão e a corrente.

$$|Z| = [(R)^2 + (X_c)^2]^{0.5} \quad \{1.13\}$$

Onde $|Z|$ é a impedância total.

No modelo de Helmholtz, a interface⁵⁶ eletrodo/solução, tem sido comparada a um capacitor de placas paralelas, figura 1.6, onde uma das placas está no eletrodo e a outra na solução.

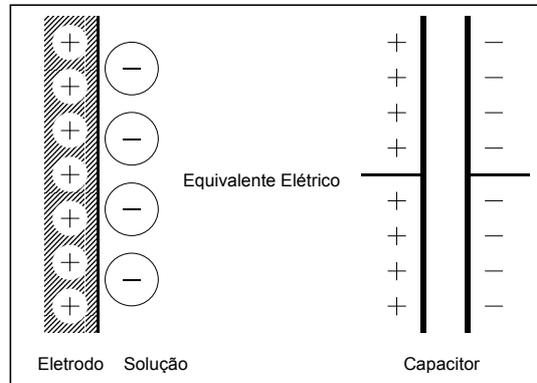


Figura 1.6: Analogia entre a interface eletrodo/solução e um capacitor elétrico.

Um capacitor é um elemento de circuito composto por duas placas condutoras separadas por um dielétrico, o seu comportamento é dado pela expressão 1.14.

$$C=q/E \quad \{1.14\}$$

Onde, C é a capacitância (Faraday), q é a carga (Coulombs) acumulada em uma das placas, E é a diferença de potencial (Volts) entre as placas.

Para um capacitor de placas paralelas contendo um dielétrico⁵⁷, a capacitância é dada por:

$$C = \frac{\epsilon \cdot \epsilon_0 \cdot A}{d} \quad \{1.15\}$$

Onde C é a capacitância em Faraday (F), ϵ_0 é a constante de permissividade do vácuo ($8,85 \times 10^{-12} \text{F} \cdot \text{m}^{-1}$), ϵ é constante dielétrica do material que está entre as placas, neste caso entre o eletrodo/solução, A é a área de cada placa, d é a distância entre as placas.

1.4.2) Circuito Equivalente de uma Cella Eletroquímica

A impedância causada por uma reação simples de óxido-redução pode ser descrita por um circuito elétrico equivalente, composto por resistores e capacitores como mostrado na figura 1.7. Essa é uma representação típica de um circuito equivalente para uma interface eletrodo/solução, o qual se denomina de circuito de Randles⁵⁸.

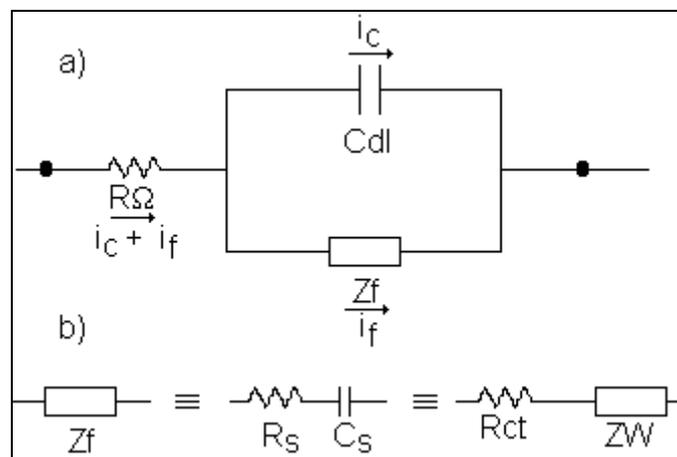


Figura 1.7: (a) circuito equivalente de uma interface eletrodo/solução. (b) desdobramento de Z_f em R_s e C_s ou R_{ct} e Z_W .

A resistência ôhmica R_Ω , é a resistência oferecida pela solução no transporte dos íons entre o eletrodo de trabalho e o de referência. No circuito acima, a resistência ôhmica R_Ω esta em série, uma vez que a corrente total (capacitiva e faradaica) do circuito passa pela solução. A introdução dos elementos em paralelo é devido à separação da corrente para o processo capacitivo (i_c) e processo faradaico (i_f). A dupla camada tem um comportamento muito semelhante a um capacitor, C_{dl} , por isso é assim representada. O processo faradaico é representado como uma impedância geral Z_f , que por sua vez pode

ser subdividida por uma resistência R_s com uma pseudocapacitância C_s em série, figura 1.7b:

A R_s e C_s são definidas como:

$$R_s = R_{ct} + \sigma/\omega^{0,5} \quad \{1.16\}$$

Onde σ é o coeficiente de Warburg

$$C_s = 1/\sigma\omega^{0,5} \quad \{1.17\}$$

A impedância faradaica pode então ser escrita como:

$$Z_f = R_s + 1/j\omega C_s \quad \{1.18\}$$

Substituindo R_s e C_s ,

$$Z_f = R_{ct} + \sigma/\omega^{0,5} + \sigma/j\omega^{0,5} \quad \{1.19\}$$

A equação 1.19 é soma de um termo resistivo, R_{ct} , que indica a facilidade na transferência do elétron, e os outros dois também resistivos, porém um tipo especial que dependente da frequência. Definem-se os dois últimos termos como a impedância de Warburg, Z_w , que indica a resistência na transferência de massa, e é definida na equação 1.20.

$$Z_W = \sigma/\omega^{0,5} + \sigma/j\omega^{0,5} \quad \{1.20\}$$

Os elementos R_Ω e C_{dl} são os que mais se aproximam dos elementos de um circuito puro. As componentes da impedância faradaica (R_s e C_s) não são ideais e variam com a frequência (ω) da excitação.

1.4.3) Representação dos Espectros de Impedância

Os espectros de impedância⁵⁹, obtidos quando se varia a frequência, são geralmente apresentados em gráficos Nyquist, estes relacionam a impedância imaginária (Z_{im}) e a real (Z_{re}). Um outro tipo de gráfico, chamado Bode, relaciona-se a impedância ou o ângulo de fase com a frequência, a vantagem desse gráfico é que a dependência com a frequência é mostrada claramente, além do espaçamento logarítmico permitir uma visualização melhor dos processos. No caso de um gráfico de Bode ângulo de fase, um resistor puro apresenta um ângulo de 0° e um capacitor puro de 90° e a impedância de Warburg, 45° , lembrando que esse ângulo é a defasagem entre a tensão e a corrente.

Na figura 1.8a-b, apresenta-se exemplo de um circuito RC em série e na figura 1.8c-d um circuito RC em paralelo, mostrando o aspecto dos respectivos gráficos Nyquist e de Bode ângulo de fase.

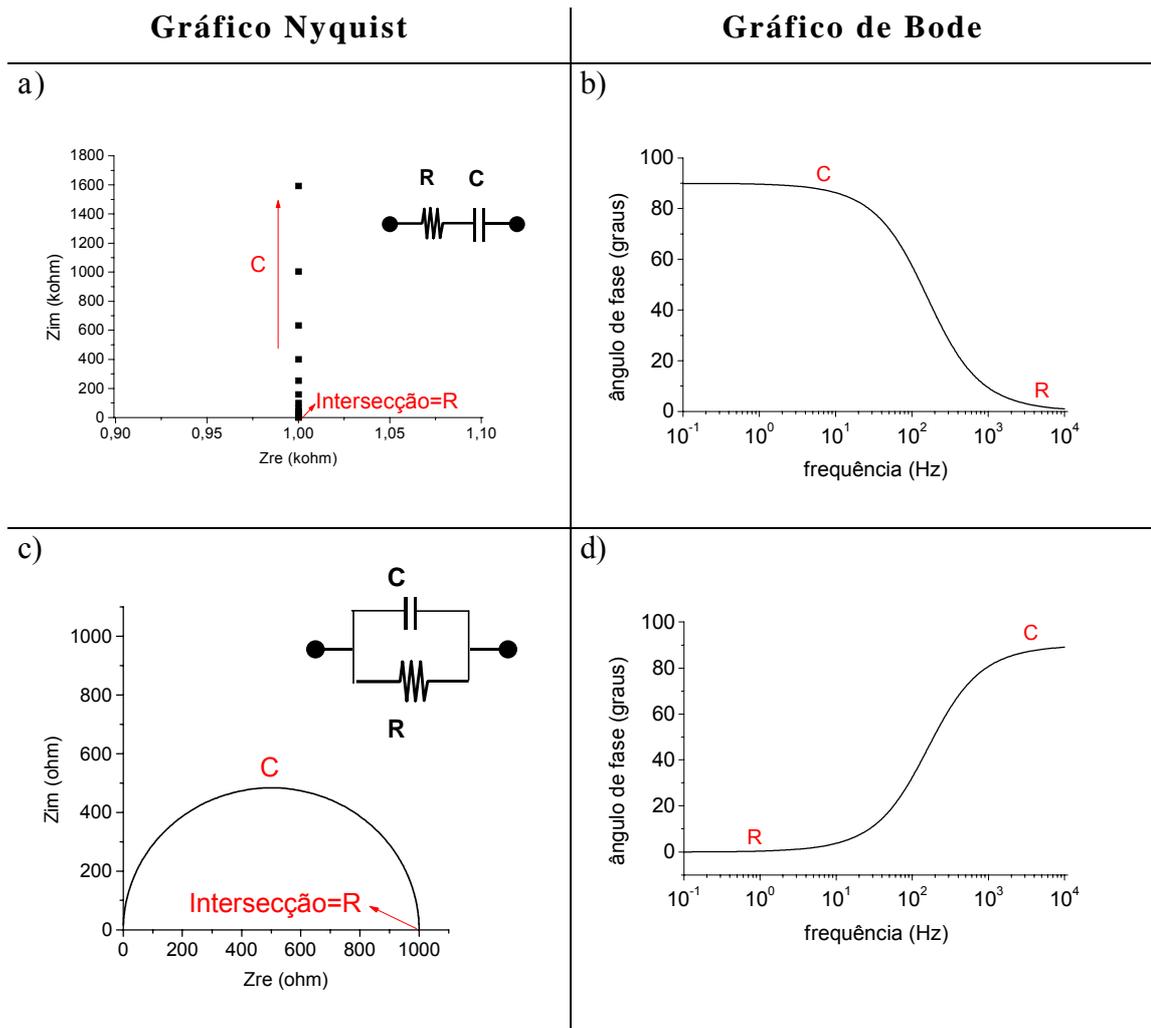


Figura 1.8: a) Gráfico Nyquist de um circuito RC em série, b) e o seu respectivo gráfico de Bode ângulo de fase, c) Gráfico Nyquist de um circuito RC em paralelo, d) e o seu respectivo gráfico de Bode ângulo de fase.

A figura 1.8 acima mostra o comportamento de elementos de circuito puros, nas figuras 1.9 apresenta-se os gráficos para o circuito de Randles, que é uma representação típica de uma interface eletrodo/solução, onde além da resistência e da capacitância também se apresenta a impedância de Warburg.

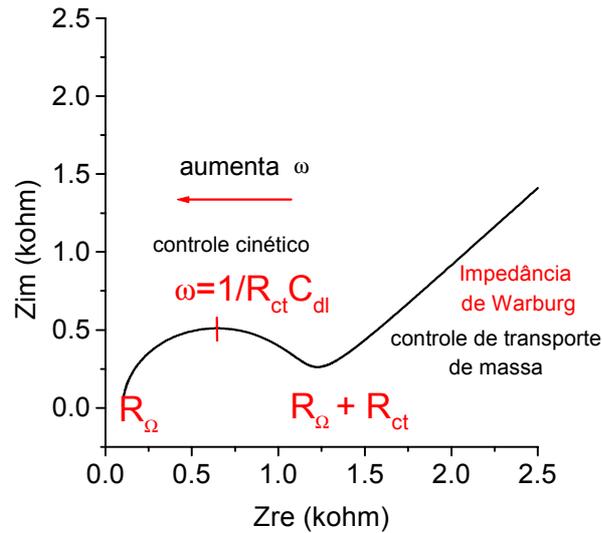


Figura 1.9: Gráfico Nyquist para o circuito de Randles, com os seguintes valores: $R_{\Omega}=100 \Omega$, $R_{ct}=1000 \Omega$, $C_{dl}=1 \mu\text{F}$ e $\sigma=2000 \Omega \cdot \text{s}^{0,5}$.

A análise do gráfico Nyquist mostrado na figura 1.9 evidencia duas regiões distintas, uma de controle cinético, na alta frequência e outra de controle de transporte de massa, na baixa frequência. A primeira região é formada por um semi-círculo, cujo diâmetro é dado pelos valores de R_{Ω} e R_{ct} . A descrição do semi-círculo começa com um deslocamento no eixo x, devido a R_{Ω} , e passa por um máximo que é igual a $\omega=1/R_{ct} \cdot C_{dl}$. Na parte linear do gráfico ou na região de controle de transporte de massa se observa a impedância de Warburg. A inclinação da reta é igual a 1, se somente tiver a influência de Z_W .

Na figura 1.10, apresenta-se o gráfico Bode ângulo de fase, também para o circuito de Randles.

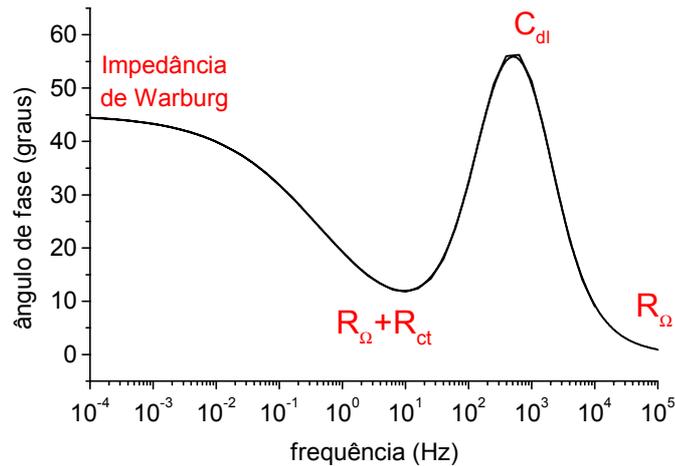


Figura 1.10: Gráfico de Bode para o circuito de Randles: relacionando o ângulo de fase vs. log frequência. Com os seguintes valores: $R_{\Omega}=100 \Omega$, $R_{ct}=1000 \Omega$, $C_{dl}=1 \mu\text{F}$ e $\sigma=2000 \Omega \cdot \text{s}^{0,5}$.

Na figura 1.10, o ângulo de fase para os componentes resistivos se aproxima de 0° , os capacitivos de 90° e para a impedância de Warburg de 45° . Nesse caso, por exemplo, a C_{dl} não atinge o valor de 90° , porque outros componentes também estão atuando nesse mesmo intervalo de frequência abaixando o valor do ângulo, o mesmo acontece para a R_{ct} , que apenas se aproxima de 0° .

1.4.4) Utilização do Programa de Circuitos Equivalentes

A espectroscopia de impedância é bastante usada no estudo de sistemas eletroquímicos, as curvas obtidas são geralmente analisadas com um modelo de circuito elétrico, um circuito equivalente, onde os vários elementos de circuito são relacionados a respectivos processos como a resistência na

transferência de elétrons, capacitância da dupla camada ou a resistência de Warburg.

Os elementos de um circuito equivalente representam os vários processos envolvidos no transporte de massa e carga. Os gráficos são bastante simples para elementos como a resistência e a capacitância. Os diagramas mostram características distintas que podem ser facilmente relacionadas a processos físicos específicos e a análise do circuito se torna bastante simples. Contudo, essa análise torna-se mais difícil à medida que os processos químicos envolvidos também se tornam mais complicados solicitando modelos elétricos mais complexos.

A modelagem dos dados experimentais aos circuitos equivalentes, não seria uma tarefa simples se tivesse que ser feito manualmente para cada um dos elementos, mas programas escritos para essa finalidade facilitaram enormemente essa análise. O programa^{60,61}, EQUIVCRT.PAS, escrito por Bernard A. Boukamp foi utilizado para modelar os dados experimentais, este ajusta simultaneamente todos os parâmetros do circuito equivalente. A técnica emprega o ajuste não linear de mínimos quadrados (NLLSF), o parâmetro S, dá a noção da qualidade do ajuste, 1.21.

$$S = \sum_i W_i \left[(Zre_i - Zre(\omega_i))^2 \right] - \left[(Zim_i - Zim(\omega_i))^2 \right] \quad \{1.21\}$$

Onde Zre_i e Zim_i , são os parâmetros experimentais, $Zre(\omega_i)$ e $Zim(\omega_i)$ são os parâmetros calculados pelo programa segundo o modelo escolhido, $W_i = 1/|Z_i|^2$ é o peso das medidas.

1.4.4.1) Princípios para a Utilização do EQUIVCRT

Para a utilização do EQUIVCRT⁶², é necessário que se conheça algumas regras para que o programa possa entender corretamente a descrição de um circuito elétrico. Tais como:

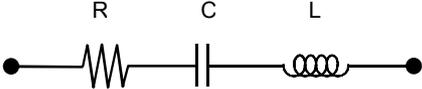
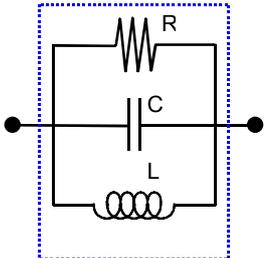
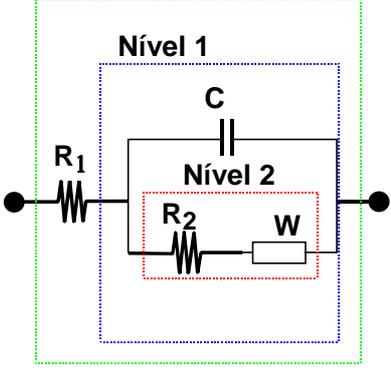
1) Elemento simples: é um elemento com dois terminais e está relacionado com um processo simples, como por exemplo, a resistência da solução R_{Ω} , a capacitância da dupla camada C_{dl} . Esses elementos não podem ser transformados em elementos elétricos mais simples. Os símbolos para os elementos simples são: R, resistência, C, capacitância, L, indutância e W, impedância de Warburg.

2) Elemento complexo: é definido como uma caixa com dois terminais contendo elementos em série e/ou paralelo, esses elementos podem ser simples ou complexos.

A ordem de um circuito complexo é dada pelo número de caixas que contém o elemento complexo.

Os elementos que estão em um nível par são elementos em série, quando estão em um nível ímpar são elementos em paralelo. No nível zero sempre os elementos (simples ou complexos) estão em série, no nível seguinte em paralelo, e desta maneira alternando até que apenas restem elementos simples, exemplos do código para a descrição de circuitos são mostrados na tabela 1.1:

Tabela 1.1: Código para descrição de circuitos do programa EQUIVCRT.

Circuito	Código para Descrição do Circuito
	<p>Um circuito em série de elementos simples:</p> <p>RCL</p>
	<p>Um circuito em paralelo de elementos simples:</p> <p>(RCL)</p>
<p>Nível 0</p> 	<p>Um circuito com elementos complexos:</p> <p>$R_1(C(R_2W))$</p>

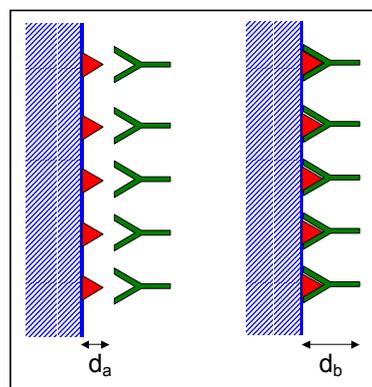
Portanto, seguindo essas, convenções dadas pelo programa, é fácil escrever um circuito equivalente e obter os seus valores.

1.4.5) Impedância em Sistemas Biológicos

A medida de impedância é uma técnica sensível a variações que ocorrem na capacitância da dupla camada, C_{dl} , esse parâmetro é fortemente influenciado por espécies que adsorvem na interface eletrodo/solução. Por isso a medida da capacitância também pode ser utilizada para monitorar a adsorção de proteínas e estas não precisam ser eletroativas, o que é uma vantagem no estudo de complexos imunológicos. Além da sensibilidade da técnica, esta permite uma análise contínua e sem utilizar reagentes marcados. Outra vantagem, é que o sistema sob investigação não sofre o impacto da aplicação de um potencial externo o que poderia modificar as condições do sistema. O sinal aplicado é de pequena amplitude a-c e pode ser realizado no potencial de repouso entre a molécula biológica e o metal, preservando ao máximo as condições naturais do processo.

A capacitância, vide equação 1.15, é diretamente relacionada a camada dielétrica, modificações na espessura (d) ou na sua constante dielétrica (ϵ) irão refletir em modificações na capacitância.

Em alguns trabalhos onde se monitora a interação antígeno-anticorpo^{63,64} com medidas de capacitância, esse processo é representado por um modelo elétrico bastante simples: considerou-se que a capacitância medida (C_t) era a soma das capacitâncias do antígeno (C_a) e do anticorpo (C_b), dada por 1.22:



$$\frac{1}{C_t} = \frac{1}{C_a} + \frac{1}{C_b} \quad \{1.22\}$$

Figura 1.11: Esquema proposto para a interação antígeno-anticorpo na interface eletrodo/solução.

A representação qualitativa da interação antígeno/anticorpo é facilmente visualizada com o modelo da figura 1.11, onde se observa um aumento da espessura “d” devido à interação antígeno-anticorpo, no entanto quantitativamente esse modelo se mostra deficiente. Entre as explicações apresentadas está a simplicidade do modelo, onde não foram consideradas, por exemplo, o fato das proteínas não recobrirem uniformemente a superfície do eletrodo ou ainda fatores como a rugosidade, impurezas e filmes de óxidos influenciarem a resposta impedimétrica.

A adsorção pode ocasionar a corrosão de equipamentos metálicos o que representa prejuízo para indústria e perigo de contaminação dos produtos. Em um estudo realizado com a albumina de soro bovino⁶⁵ sobre aço inox se monitorou o valor da R_{ct} , que nesse caso representa a medida direta da velocidade de corrosão. Esse parâmetro diminuía à medida que aumentava a quantidade de proteína adsorvida na superfície, o que representa a medida direta da dissolução do metal. Essas informações podem ser utilizadas para se otimizar as melhores condições para se evitar a corrosão dos metais em contato com proteínas.

Os defeitos no recobrimento de superfície com uma membrana lipídica⁶⁶ ou polimérica^{67,68}, que podem ser utilizadas em sensores, criam regiões de contato direto do metal com a solução, nesses locais a condutividade é alta. Isso resulta em uma capacitância e resistência devido a presenças desses defeitos e que desse modo pode-se avaliar a eficiência no recobrimento. A análise impedimétrica pode ser aplicada para observar a deposição de membranas e se obter informações estruturais com a avaliação da capacitância e a resistência.

A obtenção da constante da velocidade de transferência de elétrons, k^0 , que esta relacionada a R_{ct} , também pode ser obtida por medidas de impedância. Foi observado que a k^0 da reação de óxido-redução para o ferri-ferrocianeto de potássio diminui com a adsorção de um peptídeo⁶⁹, portanto essa molécula dificulta a transferência de elétrons. A adsorção é verificada com um aumento da resistência no gráfico Nyquist.

A medida da capacitância da dupla camada também pode ser usada para determinar a cinética⁷⁰ da adsorção da proteína na superfície do eletrodo. Um dos modos mais simples utilizados para descrever esse processo é uma reação

em duas etapas: a primeira relativa à adsorção irreversível da proteína e a outra associada à modificação na estrutura das moléculas adsorvidas. O decréscimo do valor da C_{dl} é associado à adsorção da proteína. Essa variação na C_{dl} também foi associada ao rearranjo da proteína sobre o eletrodo. Esse fato, por exemplo, não pode ser acompanhado com uma balança de quartzo, pois essa mudança conformacional não implica em mudança na massa, portanto essa mudança não pôde ser verificada com essa técnica. Em outro trabalho se verificou que de acordo com a concentração⁷¹ da proteína se observava mudanças na orientação da proteína adsorvida.

Em alguns trabalhos a capacitância também foi utilizada para se obter informação a respeito da conformação e/ou orientação⁷¹ das proteínas. Esse é um aspecto relevante no processo de adsorção, por exemplo, para os sensores a imobilização⁷² da proteína deve ocorrer com uma orientação que preserve os sítios específicos livres.

A medida impedimétrica, como visto acima, é uma ferramenta utilizada para se estudar adsorção de proteínas, oferecendo informações de orientação, conformação e cinética das mesmas.

CAPÍTULO 2

2) TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

Para a obtenção das medidas de impedância foram fundamentais as etapas de compreensão dos princípios teóricos da técnica e manuseio dos equipamentos, para então se iniciar o trabalho experimental. Neste percurso tornou-se evidente a importância do tratamento da superfície do eletrodo para que os resultados fossem reprodutíveis. Além disso, também se verificou que a forma da cela eletroquímica, cabos e conexões metálicas têm influência marcante na qualidade dos dados.

2.1) Sistema Eletroquímico

O sistema eletroquímico é composto pelo solvente, eletrólito suporte, eletrodos e a cela eletroquímica. Para facilitar a discussão dos resultados apresenta-se de uma forma geral a especificação e o tratamento recebido conforme o experimento realizado.

2.1.1) Eletrodos

Os experimentos eletroquímicos utilizam um sistema composto por três eletrodos, figura 2.1, o eletrodo de trabalho, auxiliar e o de referência. No primeiro ocorre a reação de interesse o segundo mantém o fluxo elétrico e o terceiro estabelece o potencial de referência.

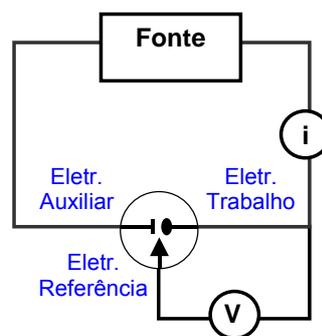


Figura 2.1: Circuito de uma cela eletroquímica composta por três eletrodos

2.1.1.1) Eletrodo de Trabalho

O eletrodo de trabalho utilizado nos experimentos tem as seguintes especificações:

Eletrodo de platina – disco de 2,2 mm diâmetro

Modelo MF 2013 - BAS (Bioanalytical Systems)

2.1.1.2) Eletrodo Auxiliar

O eletrodo auxiliar utilizado nos experimentos de espectroscopia de impedância e voltametria cíclica era constituído de uma placa de platina com as dimensões de 1,0cm x 3,0cm x 0,01cm.

Para os experimentos destinados a produção eletroquímica da camada de óxido em ácido sulfúrico, o eletrodo auxiliar utilizado foi um fio de platina.

O tratamento de limpeza desses eletrodos consiste de uma imersão em ácido nítrico concentrado por 5 minutos e enxágüe em água.

2.1.1.3) Eletrodo de Referência

A limpeza do eletrodo de referência, Ag/AgCl/KCl saturada, é efetuada somente com enxágüe em água, e o eletrodo é armazenado em uma solução saturada de KCl.

2.1.2) Preparo da superfície do eletrodo de trabalho

O tratamento da superfície do eletrodo é fundamental na reprodutibilidade dos resultados uma vez que a técnica prevê a medida da capacitância da dupla camada. Portanto deve-se ter um cuidado rigoroso no

polimento do eletrodo e na retirada do material de polimento (alumina), lembrando que todos os procedimentos devem ser repetidos igualmente para todos os experimentos a fim de que a superfície seja sempre a mesma.

O tratamento de limpeza recebido por esse eletrodo consistiu de polimento com alumina $0.05\ \mu$ por 5 minutos, enxágüe em água, imersão em ultra-som com água, por 7 minutos. Após a esse tratamento o eletrodo foi colocado ainda molhado no meio eletrolítico.

Destaca-se que a reprodutibilidade dos experimentos não é uma tarefa fácil tanto no que diz respeito a preparação da superfície de platina como nas etapas seguintes de produção da camada de óxido e adsorção da proteína, e que apesar dos experimentos terem sido cuidadosamente repetidos se observava dificuldade na sua reprodução.

Na figura 2.2 apresenta-se um esquema mostrando as etapas de polimento do eletrodo e a verificação da limpeza e reprodutibilidade da superfície com a realização da voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

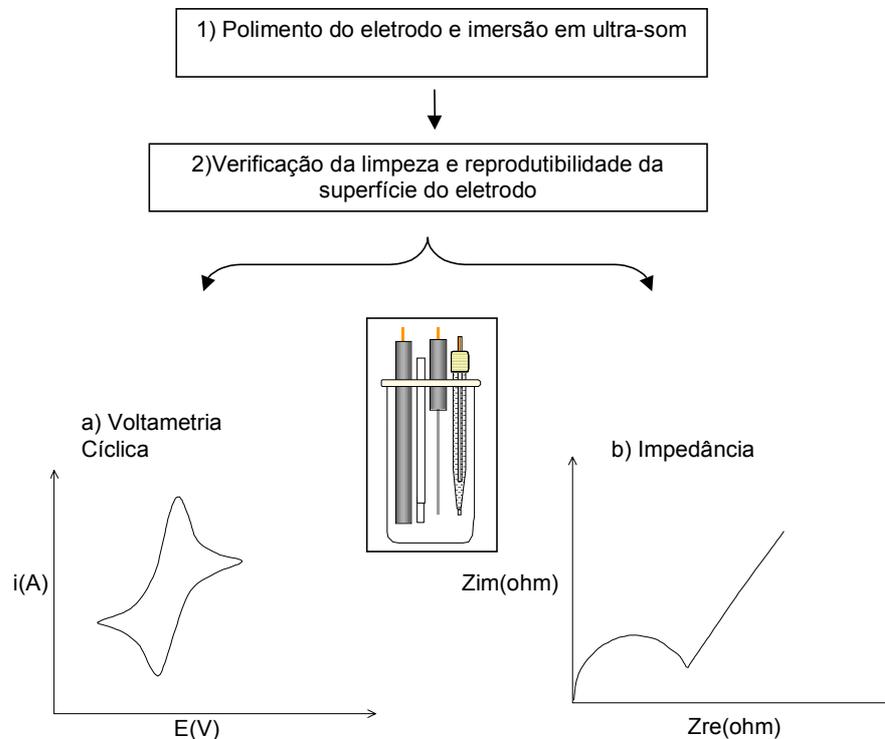


Figura 2.2: Esquema para a verificação da limpeza e reprodutibilidade da superfície do eletrodo

2.1.3) Solvente

A água foi utilizada como solvente em todos os experimentos descritos. Esta água é obtida pelo sistema de purificação MilliQ-plus com uma resistividade de 18 M Ω .cm. Esta mesma água foi utilizada para lavagem dos eletrodos e materiais.

2.1.4) Eletrólito suporte

O cloreto de sódio foi utilizado como eletrólito suporte numa concentração de 0,15 M. Esta concentração é a mesma de uma solução fisiológica adequada para testes com a molécula bioativa a ser empregada.

2.1.5) Sistema Redox

O par redox utilizado foi o ferri-ferrocianeto de potássio – K₃[Fe(CN)₆] e K₄[Fe(CN)₆] (Vetec) na concentração de 1 mM. A presença do sistema redox tem a função de indicar um possível bloqueio da superfície do eletrodo de trabalho, uma vez que estas espécies apresentam picos de corrente anódico/catódico bem definidos.

2.1.6) Lectinas adsorvidas na superfície da platina

A concanavalina A (Sigma – tipo IV) e a lentil (Sigma) foram preparadas numa concentração de 0,01 mg/mL em cloreto de sódio. As

lectinas podem estar na forma ativada ou desativada conforme a adição ou não dos cátions Ca^{2+} e Mn^{2+} de ativação. O termo desativada, neste caso, se refere à proteína em contato com uma solução em que não houve a adição de sais de cálcio e manganês, o que, no entanto não significa que a proteína não possua os referidos sais na sua estrutura.

- a) Lectina na forma ativada: em NaCl 0,15 M, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck) e $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba) ambos a 3 mM
- b) Lectina na forma desativada: em NaCl 0,15 M sem presença dos sais de ativação

O tempo de imersão do eletrodo de platina nessas soluções variou de 1, 5, 15 e 30 min.

2.1.6) Carboidratos utilizados para testar a sensibilidade e seletividade das lectinas adsorvidas

Os carboidratos utilizados foram glicose (Ridel-de Haën), galactose (Merck) e glicogênio (Sigma – tipo II) nas concentrações de 0,01 mg/mL em cloreto de sódio 0,15 M. Estas substâncias foram utilizadas para testar a especificidade e seletividade da con A.

2.1.7) Cella eletroquímica

A cella eletroquímica tem capacidade para 20 ml de solução, podendo apresentar compartimento para o eletrodo de referência e capilar de Luggin-Harber, figura 2.3a. A cella se adapta uma tampa de material inerte na qual se encaixam os eletrodos e o sistema de nitrogenação. A

desoxigenação da solução é efetuada por borbulhamento com nitrogênio durante 30 minutos e atmosfera inerte é mantida durante os experimentos. O nitrogênio passa por tratamento de desoxigenação (coluna preenchida com cobre metálico e aquecimento) e purificação (duas colunas com peneiras moleculares). Os experimentos efetuados com o eletrodo de platina na solução contendo ferri-ferrocianeto de potássio utilizou uma cela que não possui o capilar de Luggin-Harber, figura 2.3b.

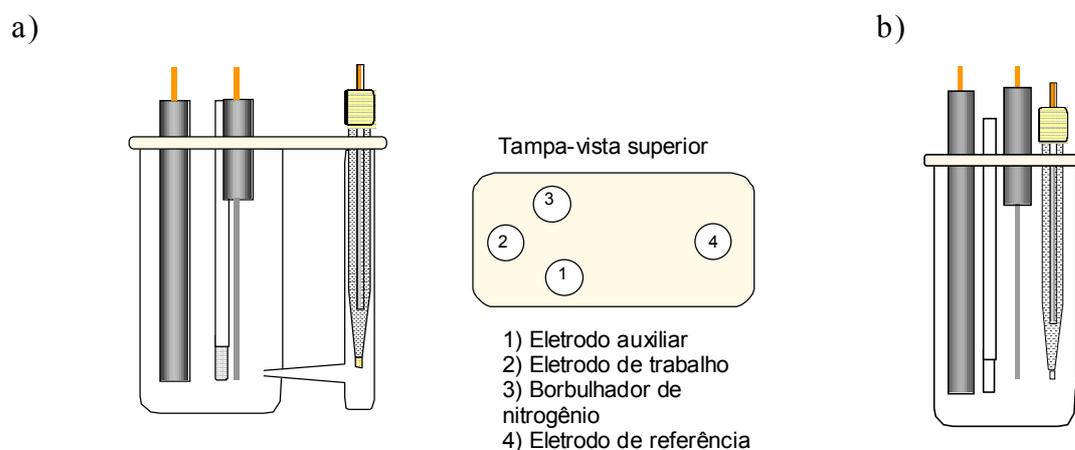


Figura 2.3: Celas eletroquímicas: a) com capilar de Luggin-Harber; b) sem capilar de Luggin-Harber

2.2) Equipamentos Utilizados para a Realização dos Experimentos Eletroquímicos

Na figura 2.4, se apresenta um organograma dos equipamentos utilizados para a realização dos experimentos de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância.

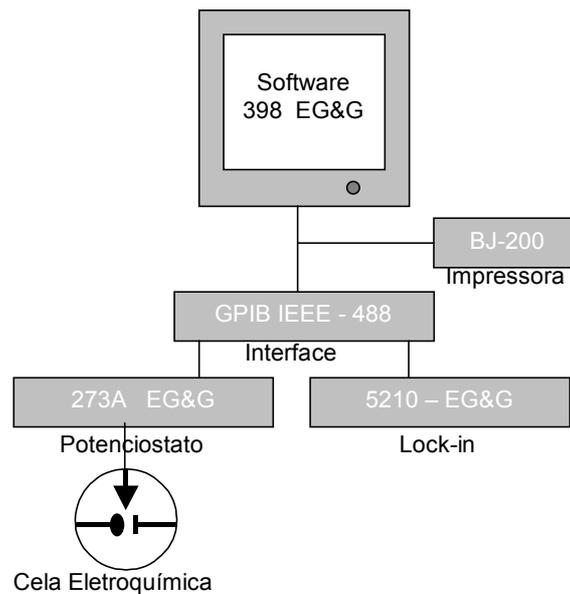


Figura 2.4: Organograma dos equipamentos utilizados para as medidas de impedância

O potenciostato e o lock-in são interfaceados pelo computador e através do software são dirigidas informações aos mesmos. O potenciostato possibilita a aplicação de um potencial dc entre o eletrodo de trabalho e o de referência, além de gerar a onda senoidal. O potenciostato gera ondas com frequências no intervalo de 100KHz a 10Hz, abaixo dessa frequência a onda é gerada pelo lock-in. O lock-in é um equipamento que compara dois sinais senoidais e gera uma resposta que é usada para se obter a diferença de fase entre os sinais e a razão entre as amplitudes dos picos.

2.3) Voltametria Cíclica

Na voltametria cíclica o potencial é ciclado linearmente a uma velocidade constante entre dois limites de potencial, registrando-se a

corrente obtida. A voltametria cíclica é realizada antes dos experimentos de impedância como recurso para se verificar se o sistema se encontra limpo e se a desoxigenação foi eficiente. Para tanto se efetuam em média 5 ciclos com uma velocidade de 50 mV/s, em uma solução de ferri-ferrocianeto de potássio e cloreto de sódio, no intervalo de 0 a 450 mV.

2.4) Espectroscopia de Impedância

Os experimentos foram realizados numa solução de ferri-ferrocianeto de potássio e cloreto de sódio, uma atmosfera de nitrogênio é mantida sobre a solução.

O intervalo de frequência de 100 KHz a 8,85 mHz, a amplitude da onda de 10 mV r.m.s, com um tempo de condicionamento do eletrodo de 30 segundos e foram coletados 5 pontos por década de frequência.

Os experimentos foram realizados no potencial de repouso de aproximadamente 0,23 V.

2.4.1) Verificação da adsorção das lectinas

Verificou-se a adsorção da con A e da lentil sobre superfícies de platina onde esta era recoberta ou não por uma camada de óxido, estas superfícies são identificadas pela seguinte notação:

- a) **Pt/lectina**: eletrodo de platina sem nenhuma modificação, apenas o polimento, imerso em solução de lectina

b) **Pt/PtO_q/lectina**: eletrodo de platina modificado com óxido produzido quimicamente e então imerso em solução de lectina.

c) **Pt/PtO_{eq}/lectina**: eletrodo de platina modificado com óxido produzido eletroquimicamente e então imerso em solução de lectina.

O tempo de imersão do eletrodo na solução contendo proteína variou de 1, 5, 15 e 30 minutos, na seqüência o eletrodo é enxaguado com água.

A modificação da superfície, devido à adsorção da lectina, foi verificada realizando-se voltametria cíclica e espectroscopia de impedância.

Para verificar se as modificações observadas tanto na voltametria cíclica e na impedância eram devido à adsorção da proteína e não devido a outras substâncias como o eletrólito suporte (NaCl 0,15 M), os sais de ativação (CaCl₂ e MgCl₂) e o glicogênio também foram efetuados experimentos onde se colocava o eletrodo de platina nestas soluções. Deste modo, o eletrodo de platina com e sem óxido também foi imerso nas substâncias acima citadas onde não se verificaram mudanças como as observadas na presença de proteína.

Na figura 2.5 apresenta-se um esquema resumido mostrando as etapas acima comentadas: de preparação e modificação do eletrodo, imersão em proteína e verificação da adsorção.

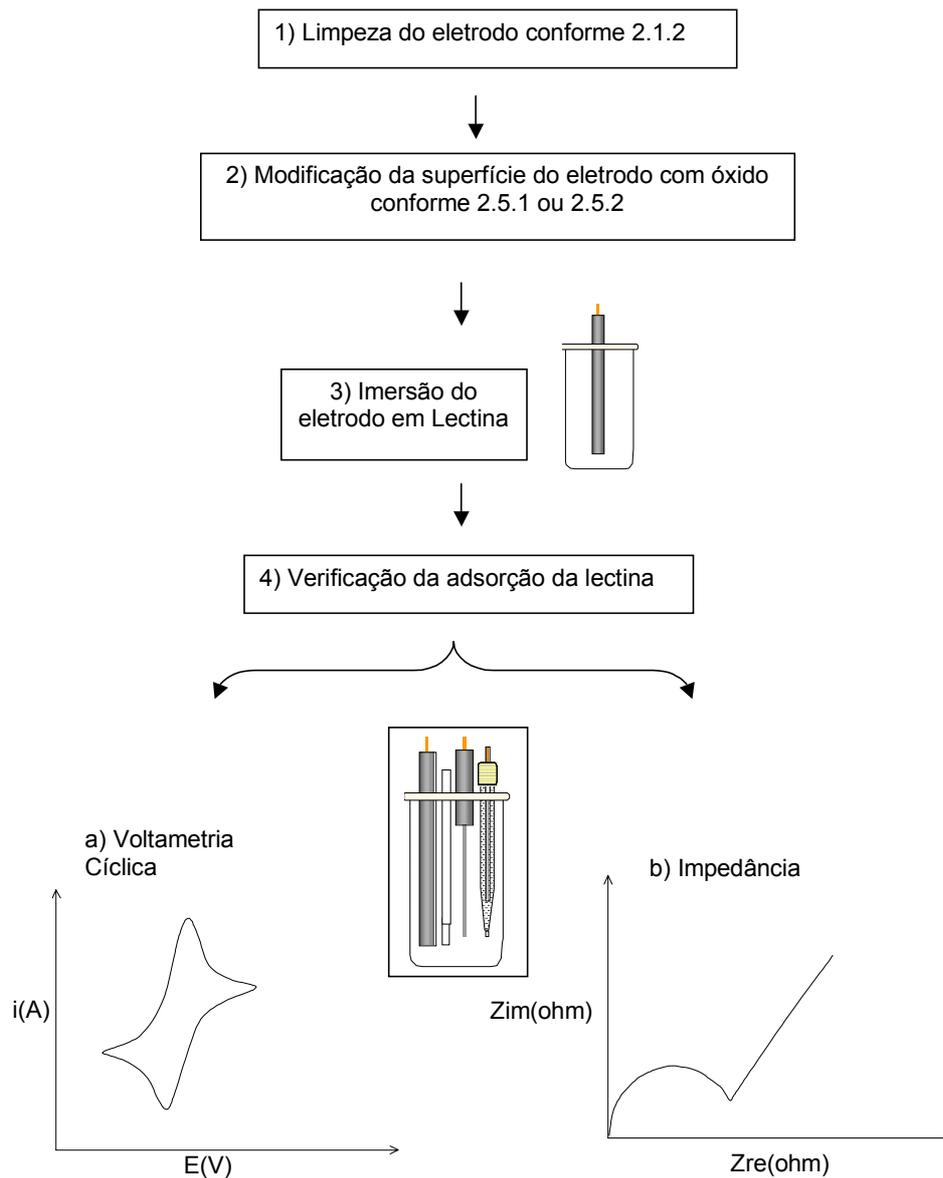


Figura 2.5: Esquema mostrando as etapas 1 e 2 anteriores à adsorção da lectina e a adsorção propriamente dita, etapa 3, e a sua posterior verificação na etapa 4.

2.4.2) Verificação da seletividade das lectinas frente aos carboidratos

A superfície modificada com a lectina conforme já descrita em 2.4.1 era testada frente a alguns açúcares, como a glicose, galactose e glicogênio. Esse

procedimento é uma continuação das etapas 1, 2, 3, 4 e 5 mostradas na figura 2.6, na sequência dá-se a imersão por 1, 5, 15 ou 30 min dessa superfície modificada com lectina em uma solução contendo um dos açúcares acima mencionados, e uma nova voltametria cíclica e espectroscopia de impedância são efetuadas. Um esquema resumido dessas etapas é mostrado na figura 2.6.

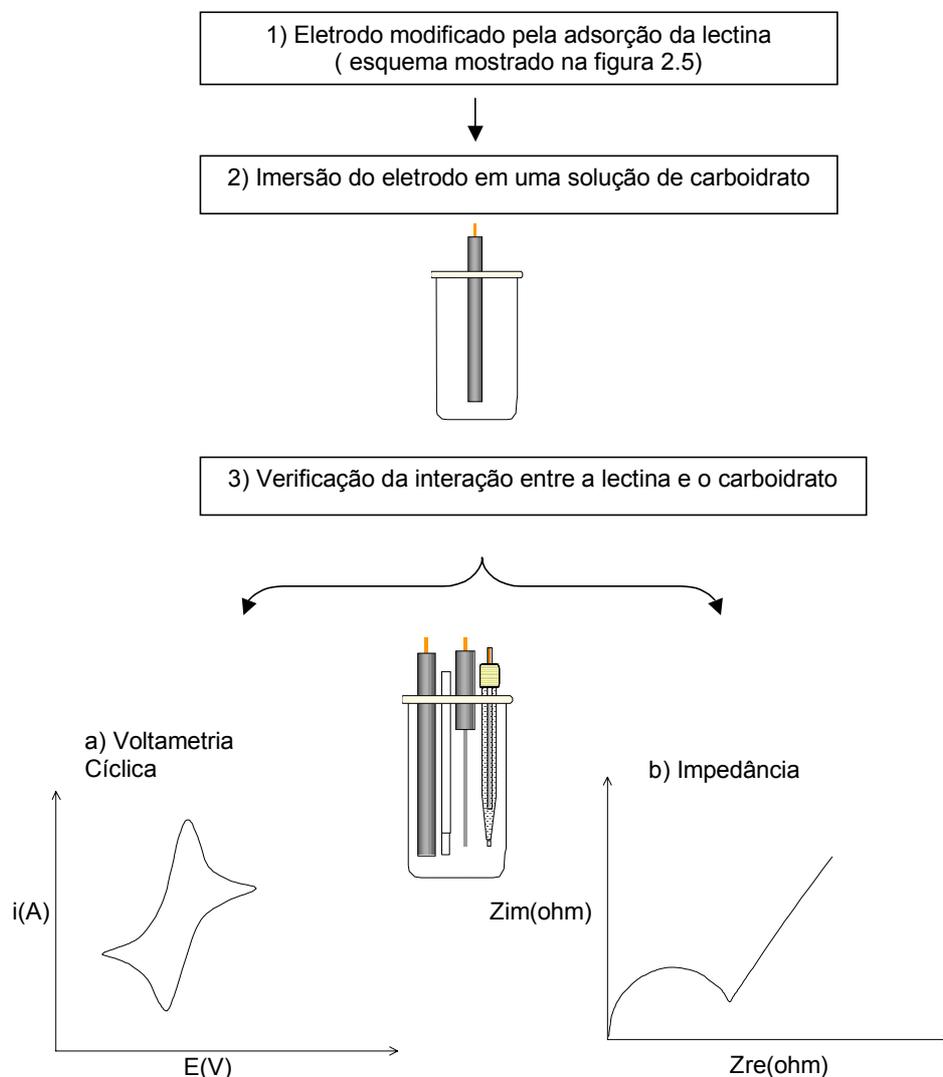


Figura 2.6: Esquema mostrando a adsorção de carboidratos, sobre uma superfície com lectina (mostradas na figura 2.5) e a verificação da adsorção do carboidrato com voltametria cíclica e espectroscopia de impedância.

2.5) Formação da Camada de Óxido

Observou-se que, a modificação da superfície do eletrodo de platina com uma camada de óxido, altera bastante a adsorção das proteínas estudadas. Inicialmente a superfície do eletrodo foi modificada quimicamente e posteriormente para se obter um maior controle desse processo produziu-se essa camada de óxido por via eletroquímica. Os procedimentos utilizados nessas práticas serão descritos a seguir:

2.5.1) Camada de óxido formada quimicamente

Após o tratamento recebido pela superfície de platina conforme descrito em 2.1.2 efetuava-se uma voltametria cíclica em ferri-ferrocianeto de potássio e uma espectroscopia de impedância. Esse procedimento era para se investigar tanto a limpeza como a reprodutibilidade do processo de preparação do eletrodo. Após essa etapa o eletrodo de platina era retirado da célula, enxaguado e imerso por 5 min em ácido nítrico concentrado (Merck) e enxaguado novamente com água. Numa etapa seguinte, ou a superfície foi investigada para verificar-se a modificação ocorrida devido o contato com o ácido nítrico ou colocada em contato com a lectina e verificando-se assim a modificação ocasionada pela proteína. No primeiro caso efetuava-se voltametria cíclica e espectroscopia de impedância no segundo caso imergia-se o eletrodo em uma solução de lectina, conforme as especificações dadas em 2.1.6, lavava-se o eletrodo com água e efetuava-se voltametria cíclica e espectroscopia de impedância, um esquema apresentando essas etapas é mostrado na figura 2.7.

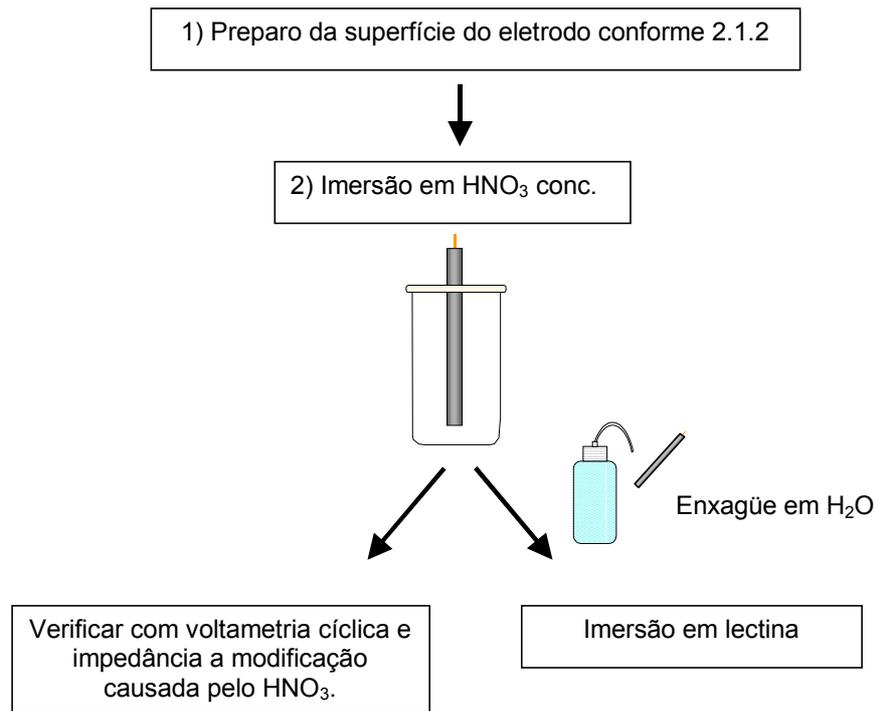


Figura 2.7: Esquema resumindo os procedimentos para a produção de uma camada de óxido quimicamente.

2.5.2) Camada de óxido formada eletroquimicamente

2.5.2.1) Parâmetros experimentais para a formação da camada de óxido

O objetivo de se produzir uma camada de óxido eletroquimicamente era se obter um maior controle e reprodutibilidade dessa camada. A tentativa de se reproduzir os resultados já obtidos com a camada formada quimicamente levou a pesquisa de ácidos menos oxidantes que o ácido nítrico, no qual a simples imersão já produzia a camada de óxido.

Os testes realizados com o ácido sulfúrico e o ácido clorídrico ambos concentrados também produziram modificações na superfície do eletrodo com a simples imersão, embora menos intensas.

Uma outra alternativa foi o ácido p-tolueno sulfônico 3,5 M, que em um primeiro teste de simples imersão não causava modificações na superfície. Passou-se então aos testes eletroquímicos, nos quais, de acordo com a voltametria cíclica obtida aplicou-se um potencial de 1,2 V por um período de 1 hora. O resultado foi satisfatório, no entanto considerou-se que por se tratar de um ácido orgânico poderia haver complicações devido à presença de material orgânico no filme de óxido.

Os testes com o ácido sulfúrico 1M iniciaram com a imersão do eletrodo de platina nessa solução para verificar se havia a produção de uma camada de óxido. Visto que nessas condições não houve a oxidação do eletrodo passou-se para a próxima etapa, na qual foram definidos os parâmetros para a produção eletroquímica da camada.

Inicialmente se pesquisou qual seria o potencial para a formação da camada de óxido. Os potenciais de oxidação estudados variaram de 1,0 V até 1,9 V, onde se observou que acima de 1,6 V há formação de bolhas sobre a superfície do eletrodo. Para diminuir o efeito da formação de bolhas e com isso dificultar a reprodutibilidade da camada de óxido, introduziu-se uma intensa agitação no sistema, não permitindo dessa maneira a fixação dessas bolhas. O potencial de 1,6V foi o escolhido para produzir todos os filmes de óxido comentados neste trabalho.

A próxima etapa foi definir a quantidade de carga que seria utilizada para a formação da camada. Foram efetuados testes com as seguintes cargas: 30mC, 20 mC, 10 mC, 5,0 mC, 4,0 mC, 2,0 mC, 1,0 mC, 500 μ C, 250 μ C e 60 μ C.

Após a formação da camada de óxido, seja em qualquer das condições de potencial e carga acima citados, finalizou-se com um procedimento para uniformizar ou estabilizar a camada. Para tal, varreu-se linearmente, a partir do potencial aplicado, no sentido catódico até um dos seguintes potenciais: 0,6 V; 0,7 V, 0,8 V; 0,9 V; 1,25 V e 1,30 V. O tempo de permanência nesses potenciais foi de 60 s, 100 s, 300 s e 600 s. Estabeleceu-se que o potencial seria varrido linearmente até 0,7V e permanecendo no mesmo por 60s.

A escolha dos melhores parâmetros, para a produção eletroquímica da camada se baseou em dois critérios: o primeiro, formar uma camada pouco espessa, ou melhor, com um comportamento impedimétrico semelhante ao

obtido com as camadas formadas quimicamente; o segundo, obter-se uma boa reprodutibilidade das mesmas.

Na figura 2.8, apresenta-se o programa de potenciais usados na formação da camada de óxido. Na figura 2.8a, inicia-se o processo de limpeza do sistema eletroquímico com uma ciclagem rápida no intervalo de $-0,12$ a $1,3$ V com duração de dois minutos a uma velocidade de 1V/s e por 6 minutos a 50 mV/s . Esses procedimentos auxiliam na obtenção de uma voltametria cíclica adequada para a formação da camada de óxido. Os experimentos foram realizados na cela eletroquímica mostrada na figura 2.3a com intenso borbulhamento de nitrogênio na solução. Após a verificação, através do voltamograma cíclico, de que o sistema se encontra limpo, inicia-se imediatamente o procedimento para a formação da camada de óxido. Esta etapa pode ser acompanhada na figura 2.8b, onde o último ciclo é terminado aproximadamente em $0,7$ V, quando se aplica o potencial de $1,6$ V, até passar $60\text{ }\mu\text{C}$ de carga (em média 4-5 segundos, esse tempo varia com a quantidade de carga oxidada), então varre-se linearmente o potencial até $0,7$ V, permanecendo-se por 60 segundos nesse potencial.

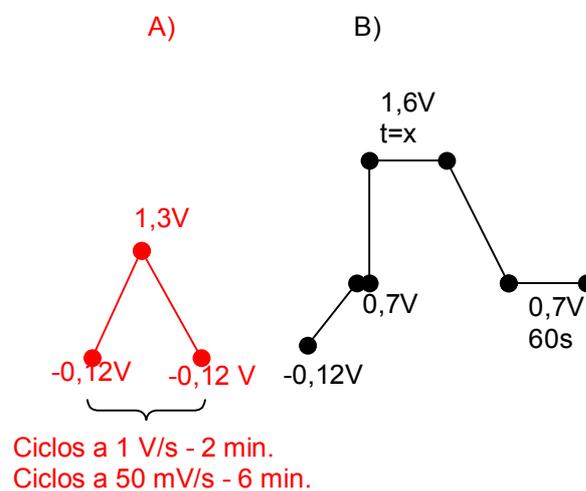
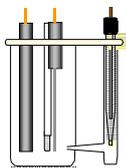


Figura 2.8: Programa dos potenciais estabelecidos no eletrodo de trabalho para se produzir a camada de óxido eletroquimicamente. A) Limpeza do sistema eletroquímico, onda triangular de potencial utilizado na voltametria cíclica da platina em H_2SO_4 1M. B) Formação da camada de óxido

Terminado o processo de formação da camada o eletrodo é lavado com água, iniciando-se agora a etapa da verificação da mesma que é composta pela realização de 3 ciclos de voltametria cíclica em ferri-ferrocianeto de potássio seguida pela espectroscopia de impedância nessa mesma solução. Um resumo das etapas de formação e verificação da camada de óxido formada eletroquimicamente é apresentado na figura 2.9.

ETAPA 1: LIMPEZA DO ELETRODO DE Pt

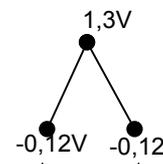
Cela de dois compartimentos com H_2SO_4 1M



Voltametria cíclica em H_2SO_4

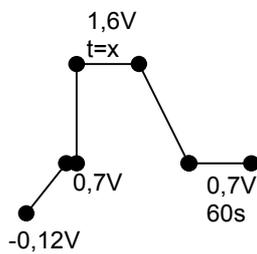


Intervalo de potencial usado na voltametria cíclica

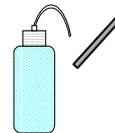


Ciclos a 1 V/s - 2 min.
Ciclos a 50 mV/s - 6 min.

ETAPA 2: FORMAÇÃO DA CAMADA DE ÓXIDO ELETROQUIMICAMENTE EM H_2SO_4



Esquema mostrando o programa de potenciais usados na formação da camada de óxido em H_2SO_4 1M, após obtenção da voltametria cíclica



ETAPA 3: VERIFICAÇÃO DA CAMADA DE ÓXIDO

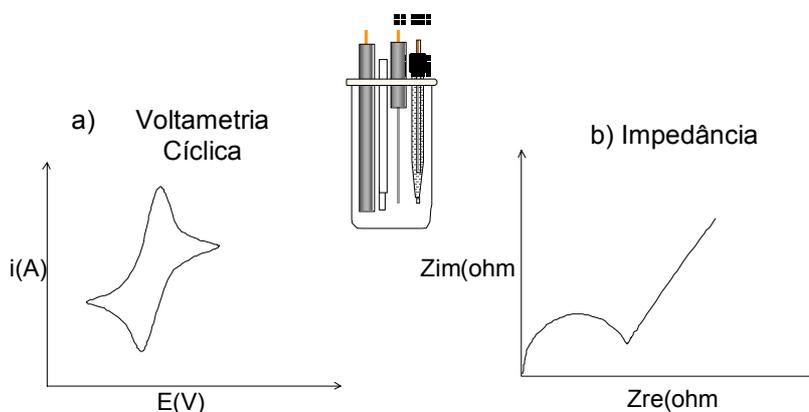


Figura 2.9: Esquema explicativo das etapas de limpeza, formação e verificação da camada de óxido produzida eletroquimicamente.

2.8) Teste de Atividade Biológica da Concanavalina A

A turbidez causada pela reação entre a con A e o glicogênio é uma indicação da atividade ligante da con A aos sacarídeos^{73,74,75}. A reação foi iniciada pela adição de 200 µg/mL de con A em 0,05 M de tampão tris-HCl (pH 7,4, 3 mM de CaCl₂, 3 mM de MnCl₂, 0,15 M NaCl) a 60 µg/mL de glicogênio em 0,05 M de tampão tris-HCl (pH 7,4). Esse teste também foi efetuado com a glicose. A turbidez foi monitorada espectrofotometricamente no comprimento de 460 nm. A reação também foi acompanhada na situação em que a con A não está na presença dos sais de ativação.

CAPÍTULO 3

3) RESULTADOS E DISCUSSÕES

As técnicas utilizadas para o estudo da interface eletrodo/proteína foram a voltametria cíclica e a espectroscopia de impedância. A associação dessas duas técnicas possibilitou o monitoramento da superfície do eletrodo e a sua modificação. Para o acompanhamento dessas modificações enfatiza-se os cuidados com a preparação das superfícies, o que inclui o polimento do eletrodo, a formação de uma camada de óxido e a adsorção da proteína.

Na discussão dos resultados são propostos circuitos elétricos equivalentes que possam traduzir as condições das interfaces platina/solução, platina/óxido, platina/óxido/con A e platina/con A. Esses circuitos são obtidos com a modelagem dos resultados experimentais e deles foram extraídos a resistência, a capacitância e parâmetros cinéticos que esclarecem a natureza de cada uma das interfaces citadas.

3.1) Voltametria Cíclica do Eletrodo de Platina

Os procedimentos experimentais, descritos em 2.1.1.1, para a preparação da superfície da platina, têm o objetivo de garantir a reprodutibilidade nas características dessa superfície. Essas características foram observadas em uma solução de ácido sulfúrico e em ferri-ferrocianeto de potássio. Nesses meios o voltamograma cíclico apresenta processo redox bem definido, onde a alteração no comportamento voltamétrico indica alguma modificação na interface eletrodo/solução. Essas modificações sinalizam a presença de contaminantes que podem alterar os resultados e, por conseguinte levar a conclusões enganosas.

A análise dos voltamogramas cíclicos da platina em ácido sulfúrico e em ferri-ferrocianeto de potássio serão discutidas em maiores detalhes na sequência deste capítulo.

3.1.1) Voltametria Cíclica em Ácido Sulfúrico

As características desses voltamogramas são bastante conhecidas e amplamente discutidas na literatura⁷⁶. De forma breve, o voltamograma da figura 1 pode ser dividido em três regiões:

I) Região do hidrogênio, localizada no intervalo de -120 a 200 mV, onde se observam os picos de adsorção e desorção do hidrogênio.

II) Região da dupla camada, localizada no intervalo de 200 a 600 mV (varredura anódica), onde não se observa nenhum processo faradaico, a corrente medida é consequência do carregamento da dupla camada.

III) Região do sistema Pt/O₂, localizado entre 600 a 1300 mV (varredura anódica), inicialmente ocorre a oxidação da superfície da platina relacionados com a adsorção de OH, a potenciais superiores ocorre a formação de monocamadas de óxido. Na varredura catódica ocorre a redução dos óxidos formados na varredura anódica.

A presença de qualquer impureza no sistema eletroquímico compromete essas reações e conseqüentemente não se obtém o resultado mostrado na figura 3.1.

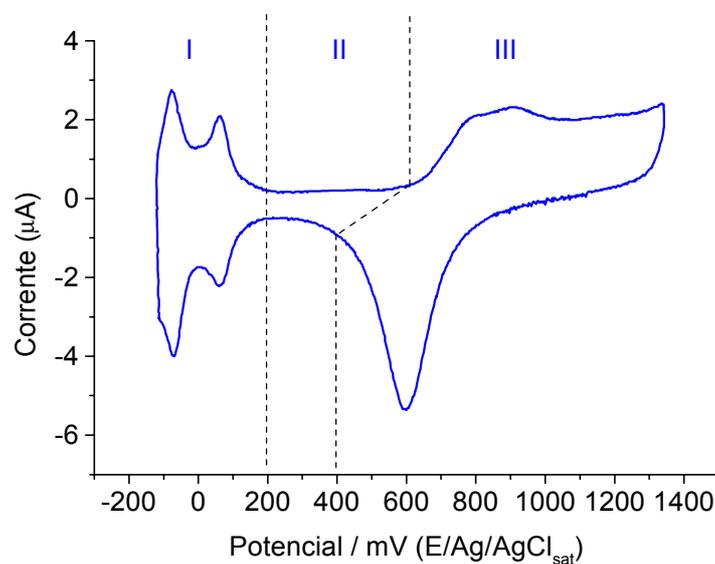


Figura 3.1: Voltamograma cíclico do eletrodo de platina em ácido sulfúrico 1 M.

3.1.2) Voltametria Cíclica em Ferri-ferrocianeto de Potássio

O voltamograma cíclico da platina em ferri-ferrocianeto de potássio mostrado na figura 3.2, apresenta os picos anódico/catódico em 260/200 mV e o potencial de repouso que se estabelece nessa interface é de 230 mV. Para sistemas como esse se deve observar uma diferença nos potenciais de pico de aproximadamente 60 mV e a razão entre as correntes anódica e catódica de aproximadamente 1.

A adição do par redox ao sistema tem as funções de estabelecer um potencial na dupla camada com espécies conhecidas e atuar como um indicador de um possível bloqueio na superfície do eletrodo. Esta última função se deve às características bem definidas desse par redox, tanto na posição dos picos anódico/catódico, como na relação proporcional desses picos. A modificação dessas características indica que o sistema apresenta alguma contaminação, o que pode, portanto, afetar o resultado dos experimentos.

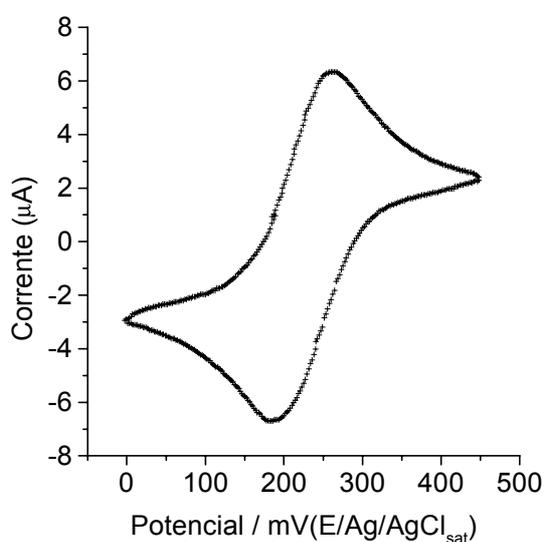


Figura 3.2: Voltamograma cíclico do eletrodo de platina em ferri-ferrocianeto de potássio 1mM.

3.2) A camada de Óxido Formada Eletroquimicamente

O filme de óxido teve um papel importante na adsorção da proteína, pois a partir de uma aparente pequena modificação da superfície obteve-se uma resposta muito intensa na adsorção. Devido a essa modificação na intensidade de adsorção da proteína fez-se necessário um controle mais rígido das condições de formação desse filme de óxido e desta forma reproduzir as mesmas características do filme.

3.2.1) Caracterização da Camada de Óxido pela Voltametria Cíclica

A camada de óxido foi produzida sobre a platina em meio ácido a um potencial constante de 1,6 V, os detalhes experimentais foram apresentados em 2.5.2.

Para a caracterização da formação do filme de óxido foram realizados experimentos de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância.

Na figura 3.3, apresenta-se o voltamograma cíclico do eletrodo de platina em ferri-ferrocianeto de potássio antes e após a modificação com o filme de óxido. Comparando-se esses voltamogramas observa-se que houve a diminuição dos picos anódico/catódico e um deslocamento nos potenciais de pico (E_p). O decréscimo nas correntes anódica/catódica indica que houve um certo bloqueio da superfície da platina, e o aumento na diferença do potencial de pico (ΔE_p) sugere uma cinética mais lenta para o processo redox.

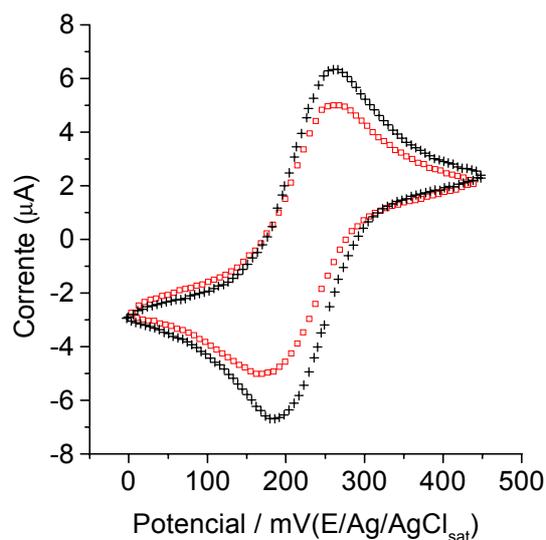


Figura 3.3: Voltamograma cíclico do eletrodo de platina em ferri-ferrocianeto de potássio: (+) eletrodo de platina; (□) eletrodo de platina modificado com filme de óxido, 61 μC para a formação do filme.

Para verificar como a camada de óxido é afetada pela carga anódica usada na produção desse filme, foram realizados experimentos utilizando-se cargas no intervalo de 50 a 1000 μC .

A variação da corrente de pico anódica (i_{pa}) em função da carga pode ser visto na figura 3.4. Nessa figura pode ser visto o decréscimo de aproximadamente 20% da corrente na região de carga de 0 a 50 μC e um decréscimo mais sutil de apenas 8,5% na região acima de 50 μC , semelhante a um decaimento exponencial da corrente com a carga.

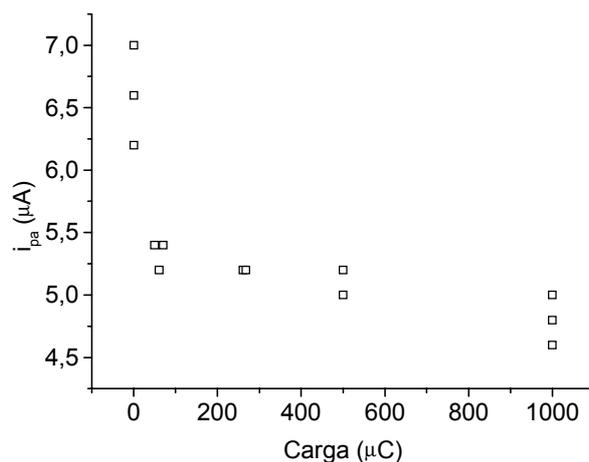


Figura 3.4: Corrente de pico anódica (i_{pa}) versus carga para o eletrodo de platina em uma solução de ferri-ferrocianeto de potássio.

Na figura 3.5, apresenta-se a variação da ΔE_p com a carga. A presença do óxido deslocou a ΔE_p de 60-70 mV do eletrodo sem óxido (carga 0) para aproximadamente 90 mV (50 a 500 μC) e para cargas de 1000 μC os valores da ΔE_p são maiores que 90 mV. Como já foi mencionado para sistemas reversíveis o ΔE_p é 60 mV, a presença do óxido desloca o sistema para um regime quase-reversível. Esse fato implica que a cinética da reação de óxido-redução do ferri-ferrocianeto de potássio sobre o eletrodo recoberto por óxido é mais lenta.

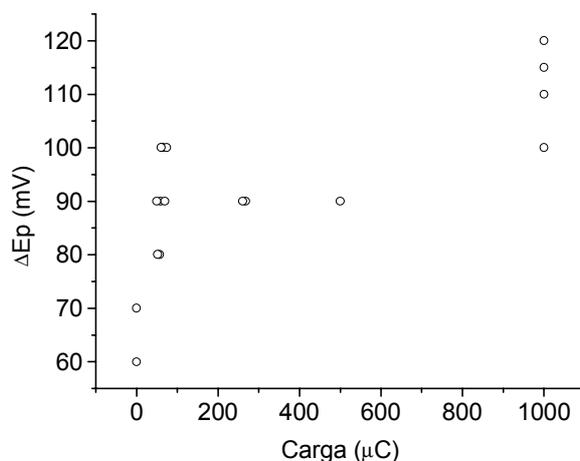


Figura 3.5: Diferença no potencial de pico (ΔE_p) versus carga para o eletrodo de platina em uma solução de ferri-ferrocianeto de potássio.

3.2.2) Caracterização da Camada de Óxido pela Espectroscopia de Impedância

A modificação da superfície de platina também foi detectada pela espectroscopia de impedância. Na figura 3.6, apresenta-se o gráfico de Nyquist para a platina e para a platina modificada pelo óxido. A curva para a platina apresenta um pequeno semicírculo que é aumentado algo em torno de 70% quando é modificada pelo óxido. Esse aumento indica que tanto Zim (componentes capacitivos) como Zre (componentes resistivos) do sistema foram significativamente mudados.

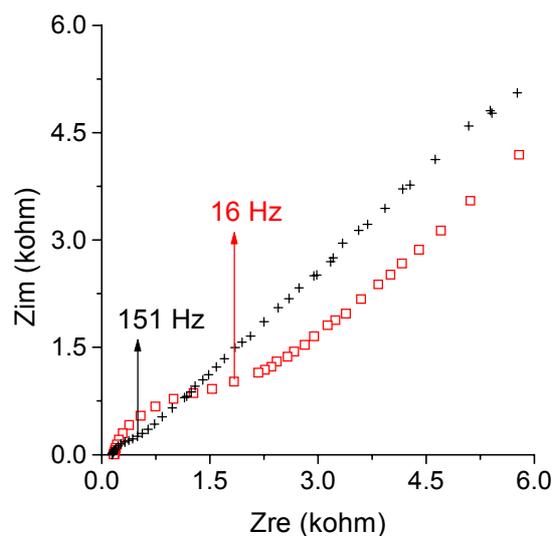


Figura 3.6: Gráfico Nyquist do eletrodo de platina em ferri-ferrocianeto de potássio: (+) eletrodo de platina; (□) eletrodo de platina modificada com filme de óxido, 61 μC para a formação do filme.

O mesmo resultado também pode ser visto num gráfico de Bode, figura 3.7, onde relaciona-se o ângulo de fase (□) e o módulo da impedância à frequência. Uma forma de associar as informações desses dois gráficos é

através da constante de tempo τ ($\tau = RC$). No gráfico da figura 3.6 o valor máximo de Z_{im} na região semicircular é dada por $\omega=1/R_{ct}C_{dl}$, portanto o inverso de τ . O eletrodo de platina modificado com o filme óxido além de aumentar o valor do módulo da impedância apresenta uma curvatura mais bem resolvida do que a platina, observe a figura 3.7, os valores de θ maiores do que 29° e em frequências menores do que 1000 Hz. O deslocamento para uma frequência mais baixa indica que o processo está ocorrendo com uma constante de tempo menor, portanto mais lenta e o aumento no ângulo de fase indica um sistema com uma maior contribuição capacitiva.

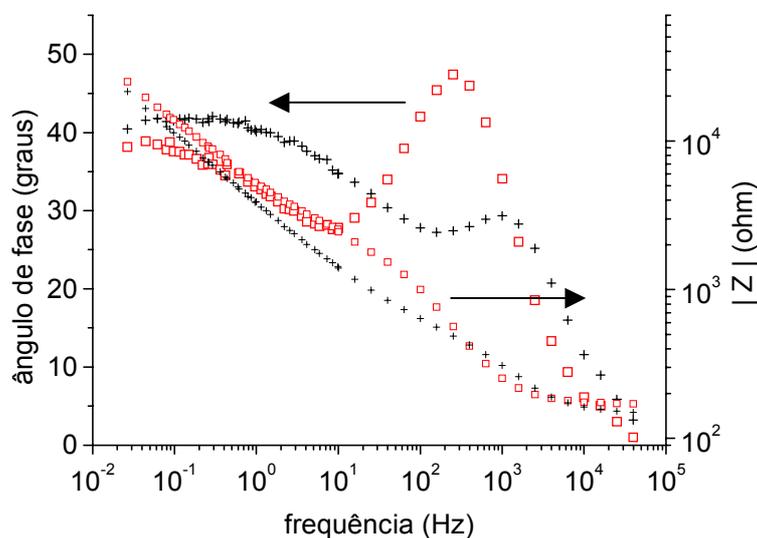


Figura 3.7: Gráfico de Bode ângulo de fase do eletrodo de platina em ferri-ferrocianeto de potássio: (+) eletrodo de platina; (□) eletrodo de platina modificada com filme de óxido, $61 \mu\text{C}$ para a formação do filme.

3.2.2.1) Comparação dos Resultados Obtidos com a Voltametria Cíclica e a Impedância

Uma inspeção nas figuras 3.3 e 3.7 mostra que o efeito da presença do óxido sobre a platina é aparentemente menos evidenciado na voltametria cíclica do que na impedância. Essa diferença na resposta entre as duas

técnicas surge porque a constante heterogênea de velocidade, k^o , que é um parâmetro cinético que indica a facilidade de uma reação ocorrer, se manifesta de uma maneira mais sutil na voltametria cíclica do que na impedância.

Nicholson⁷⁷, desenvolveu um método para se estimar a k^o a partir da voltametria cíclica relacionando um parâmetro ψ com a separação entre os picos (ΔE_p). Os valores de ψ , parâmetro cinético adimensional da voltametria cíclica, são tabelados⁵⁴ e a sua relação com a k^o é dada conforme equação 3.1.

$$k^o = \frac{\psi [D_o \pi \nu (nF / RT)]^{1/2}}{(D_o / D_R)^{\alpha/2}} \quad \{3.1\}$$

Nessa relação por exemplo, uma variação de k^o dada pela modificação da ΔE_p de 61 mV para 92 mV, implica em um decréscimo no parâmetro ψ de 20 para 0,75, portanto uma grande modificação na k^o , mais de 20 vezes, enquanto para a ΔE_p uma modificação de apenas 1,5.

Uma outra forma de expressar k^o é através da corrente de troca, i_o . A relação direta entre esses dois parâmetros cinéticos pode ser vista na equação 3.2.

$$i_o = nFAk^o C^* \quad \{3.2\}$$

Substituindo-se a equação 3.2 na equação 3.1, verifica-se que i_o também está relacionado a ψ como mostra a equação 3.3.

$$i_o = nFA \frac{\psi [D_o \pi \nu (nF / RT)]^{1/2}}{(D_o / D_R)^{\alpha/2}} C^* \quad \{3.3\}$$

Existe uma dependência linear entre o sobrepotencial, $\eta = E - E_{eq}$, e a corrente quando próximo ao potencial de equilíbrio, essa relação pode ser vista na equação 3.4.

$$i = i_o \left(\frac{nF\eta}{RT} \right) \quad \{3.4\}$$

De modo similar a lei de Ohm, o termo (η/i) , tem a dimensão de resistência e usualmente denomina-se esse termo como a resistência de transferência do elétron, R_{ct} , veja a equação 3.5.

$$R_{ct} = \frac{\eta}{i} = \frac{RT}{nFi_o} \quad \{3.5\}$$

Na equação 3.5, tem-se a relação inversa de i_o com R_{ct} , deste modo toda variação que houver na i_o tem um efeito inverso na R_{ct} enquanto na voltametria essa relação não ocorre diretamente, mas pelo intermédio do parâmetro tabelado ψ que então possibilita estimar-se i_o .

O parâmetro R_{ct} também pode ser mensurado pela impedância, nessa técnica, em um gráfico Nyquist um aumento na R_{ct} é dado pelo aumento no semicírculo, como, por exemplo, foi visto na figura 3.6.

Portanto a diminuição na cinética do processo redox devido à presença da camada do óxido é mais facilmente observada na impedância do que na voltametria cíclica. Além disso a medida da ΔE_p é mais difícil devido ao aspecto arredondado da curva onde pequenas variações implicam em erro na avaliação da i_o . Já na impedância, uma técnica mais sensível, a medida da R_{ct} dá imediatamente a relação com a cinética da reação, por exemplo, uma reação com uma cinética rápida têm uma R_{ct} pequena e vice-versa.

O confronto dos resultados obtidos com a voltametria cíclica e a impedância pode ser feito através do cálculo da R_{ct} , veja a equação 3.5. Com

essa equação pode-se prever o valor da R_{ct} , utilizando-se a estimativa de k^0 feita pela voltametria cíclica. Para o cálculo da R_{ct} , utiliza-se os valores de ΔE_p obtidos na voltametria cíclica relacionados aos respectivos ψ tabelados⁷⁷, $D_O=D_R$ ⁷⁸= $1,211 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ para $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $\alpha=0,5$. Os pontos obtidos com esses cálculos podem ser vistos na figura 3.8. A partir desses pontos se traça a curva de trabalho, dada pela linha sólida. Essa curva será útil na análise dos circuitos equivalentes em 3.2.3.

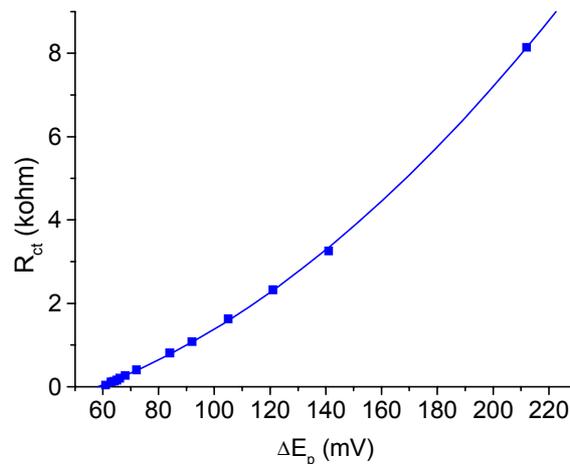


Figura 3.8: R_{ct} versus ΔE_p , R_{ct} foi obtido da equação 3.5, onde: $A=0,038 \text{ cm}^2$, ψ =valores tabelados⁷⁷, $D_O=D_R=1,211 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ para $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, $v=50 \text{ mV/s}$, $C^*=1\text{mM}$, $\alpha=0,5$, n , F , R e T com seus valores usuais.

3.2.2.2) Caracterização da Camada de Óxido pela Espectroscopia de Impedância na Frequência de 25 Hz

Para verificar qual a tendência que os dados dos espectros de impedância apresentam com a carga, coletou-se os dados de Z_{re} e Z_{im} na frequência de 25 Hz.

Na figura 3.9a observa-se que há um aumento na Z_{re} (componente resistiva do sistema) com o aumento da carga. Esse é um comportamento

esperado se o aumento da carga implicar em um aumento na quantidade de óxido sobre a superfície do eletrodo o que por sua vez ocasionaria um aumento na resistência nessa interface.

Na figura 3.9b, tem-se o resultado da variação da Zim (componente capacitiva do sistema) com o aumento da carga. Nesse caso Zim relaciona-se inversamente com a capacitância ($Z_{im} = 1/\omega C$), portanto o aumento da Zim, indica que houve um decréscimo na capacitância. Seguindo o mesmo raciocínio de que um aumento na carga resulta em um aumento na espessura da camada de óxido e que esse óxido esteja relacionado ao dielétrico de um capacitor, ocorre que um aumento na espessura do dielétrico resulta em uma diminuição no valor da capacitância.

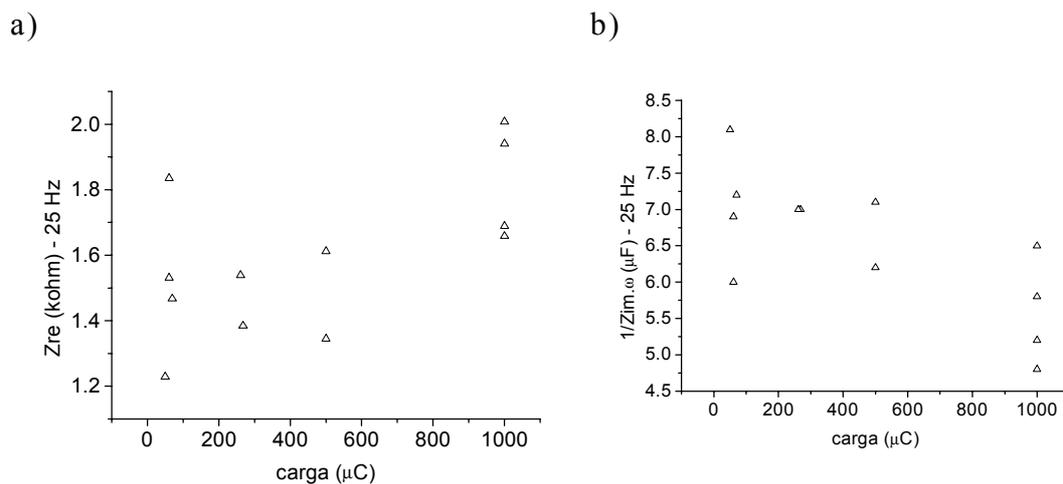


Figura 3.9: a) Zre versus carga, esses dados foram obtidos na frequência de 25 Hz dos espectros de impedância.

b) Capacitância versus carga, onde a capacitância é dada por $1/Z_{im}\omega$, esses dados foram obtidos na frequência de 25 Hz dos espectros de impedância.

Portanto Zre e Zim apresentaram um comportamento compatível com a idéia de que o aumento da carga resulta em um aumento na quantidade de óxido sobre a superfície do eletrodo.

A tendência das componentes Z_{re} aumentar com a carga e Z_{im} diminuir com a carga foi verificada em todo o intervalo de 100KHz a 80 mHz, e a medida que a frequência ia diminuindo este comportamento se tornava mais claro, os resultados foram apresentados em 25 Hz, porque nesta frequência esta tendência é melhor evidenciada.

3.2.3) Circuitos Equivalentes

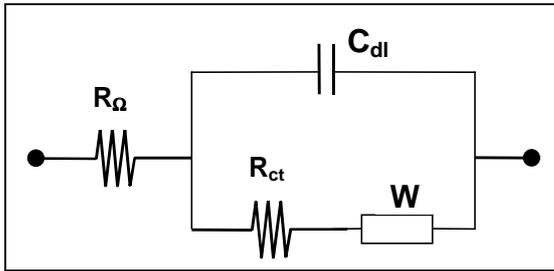
Para a análise dos resultados experimentais foram propostos vários circuitos equivalentes com possibilidades de explicar os resultados, mas para a discussão foram selecionados quatro circuitos, que serão discutidos quanto à qualidade do ajuste e o significado físico-químico dos seus elementos.

A escolha do circuito equivalente para a modelagem dos dados experimentais deve a princípio trazer as mesmas relações para a resistência e capacitância vistas nas figuras 3.9a-b.

3.2.3.1) Modelo 1

O circuito de Randles, figura 3.10a, foi o primeiro circuito a ser utilizado para modelar as curvas experimentais. Nesse circuito, definido como modelo 1, as modificações causadas pela presença do óxido são verificadas tanto na capacitância da dupla camada (C_{dl}) como na resistência da transferência do elétron (R_{ct}). Na figura 3.10b, mostra-se o resultado da modelagem entre a curva experimental e o modelo 1. Observa-se que modelo foi adequado no ajuste da alta e baixa região de frequência, no entanto falhou na região intermediária ($10^2 - 10^3$ Hz), onde o valor do ângulo de fase não é adequado.

a)



b)

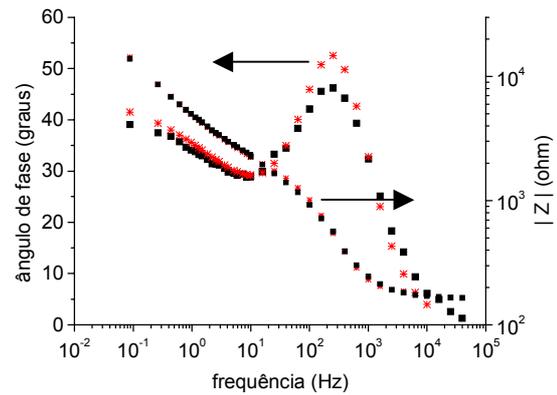
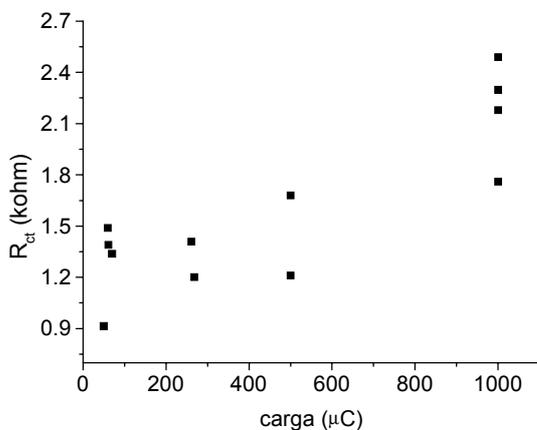


Figura 3.10: a) modelo 1; b) ajuste entre a curva experimental de óxido com carga de $268 \mu\text{C}$ (\square) e o modelo ($*$).

Com o resultado do ajuste pode-se extrair os valores da R_{ct} e C_{dl} em função da carga. Na figura 3.11a, apresenta-se o gráfico da R_{ct} versus carga, nesse gráfico é clara a tendência de aumentar a R_{ct} com o aumento da carga. Para a C_{dl} , figura 3.11b, não há uma relação clara de aumento ou diminuição com a carga. Pode-se dizer que a capacitância manteve-se praticamente constante pois a variação entre o valor máximo e mínimo foi de apenas $0,25 \mu\text{F}$.

a)



b)

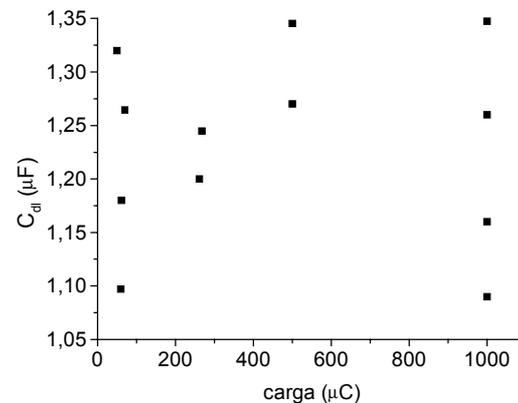


Figura 3.11: a) relação da R_{ct} obtida com o modelo 1 versus carga; b) relação da C_{dl} obtida com o modelo 1 versus carga.

Os valores encontrados para a R_{ct} , quando confrontados com a curva de trabalho, figura 3.12, encontram-se próximos à curva, situados ligeiramente acima da linha. Esse comportamento indica que a R_{ct} dada pelo ajuste é semelhante a observada na voltametria cíclica.

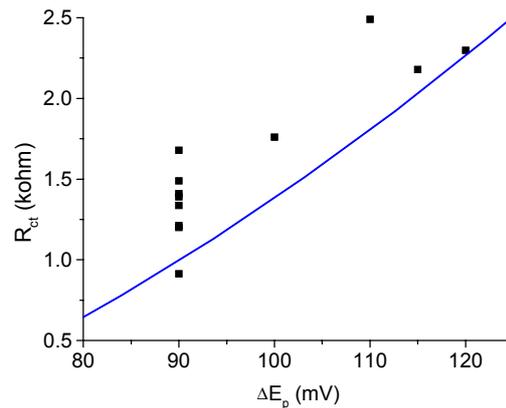
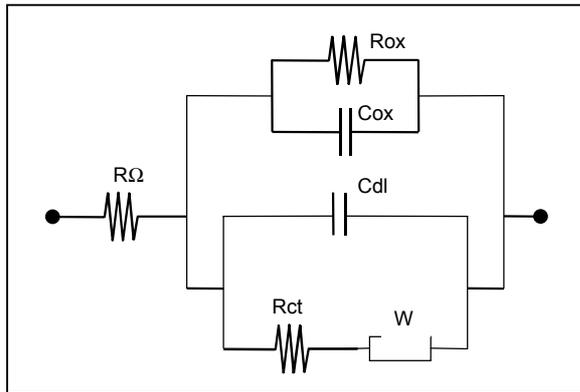


Figura 3.12: Comparação entre os valores obtidos de R_{ct} (■) com o modelo 1 e o previsto pela curva de trabalho apresentada na figura 3.8 (—).

3.2.3.2) Modelo 2

Com o objetivo de separar a contribuição da camada do óxido dos demais elementos do circuito de Randles, adicionou-se um circuito RC. Este circuito RC foi inicialmente colocado em paralelo ao circuito de Randles, como mostra a figura 3.13a, assumindo-se com esse circuito que se chamou de modelo 2, uma camada com ilhas de óxido onde a transferência de elétrons pode ocorrer pela platina ou pela camada de óxido. A adição do circuito em paralelo não melhorou a modelagem, observe a figura 3.13b, inclusive piorou o resultado na região de baixa frequência e continuou não ajustando o valor do ângulo de fase na região intermediária (10^2 - 10^3 Hz).

a)



b)

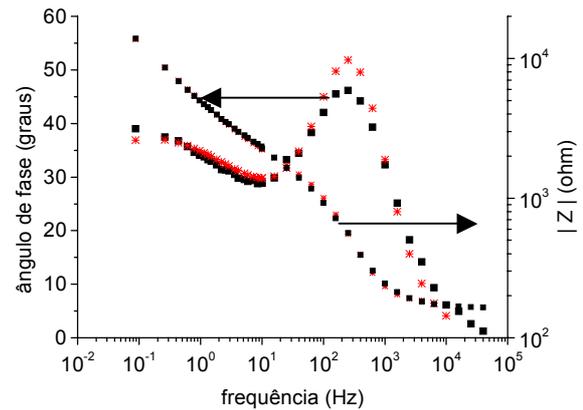
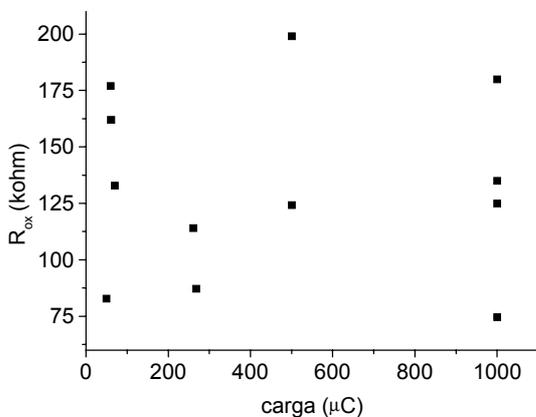


Figura 3.13: a) o modelo 2; b) ajuste entre a curva experimental de óxido com carga de $268 \mu\text{C}$ () e o modelo 2 (*).

Para complementar a análise desse modelo verificou-se qual o comportamento dos parâmetros R_{ox} e C_{ox} (o índice “ox” se refere ao óxido) frente à carga, note que agora a resistência e a capacitância são em relação ao óxido e não mais a R_{ct} e C_{dl} . Para os parâmetros R_{ox} e C_{ox} , resultado mostrado respectivamente nas figuras 3.14c-d, não se observou uma tendência clara de aumento ou diminuição em função da carga. A inclusão de um circuito em paralelo ao modelo 1 não melhorou a modelagem dos dados. A componente R_{ox} apresentou valores 100 vezes maiores dos demais modelos, e C_{ox} não apresentou nenhuma tendência definida.

a)



b)

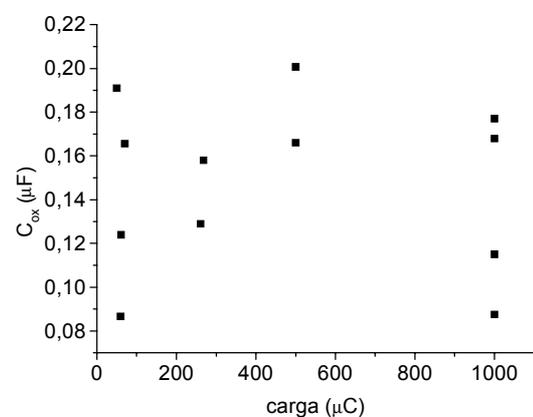


Figura 3.14: a) relação da R_{ox} obtida com o modelo 2 versus carga; b) relação da C_{ox} obtida com o modelo 2 versus carga.

A R_{ct} da mesma forma do que comentado para o modelo anterior, teve seus valores próximos à curva de trabalho, como mostra a figura 3.15.

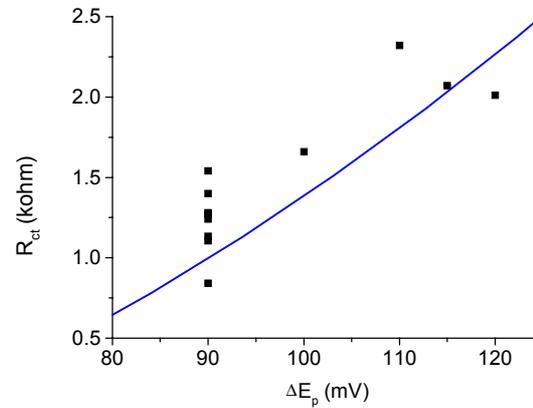
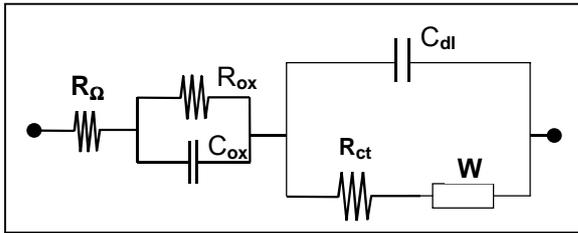


Figura 3.15: Comparação entre os valores obtidos de R_{ct} (■) e o previsto pela curva de trabalho apresentada na figura 3.8 (—).

3.2.3.3) Modelo 3

Visto que a modelagem com o circuito que assume uma camada com ilhas de óxido (fig.3.13a) não ter resultado em melhoras no ajuste já obtido com o circuito de Randles propôs-se um terceiro circuito equivalente. Nesse modelo, que se denominou modelo 3, assume-se uma camada contínua e compacta de óxido, para tal adiciona-se um circuito RC em série ao circuito de Randles, como mostra a figura 3.16a. A inclusão desse circuito melhorou o ângulo de fase na região intermediária, deficiente no modelo anterior, no entanto ainda houve um desvio da curva experimental no intervalo de $10^2 - 10^1$ Hz, esse resultado é mostrado na figura 3.16b.

a)



b)

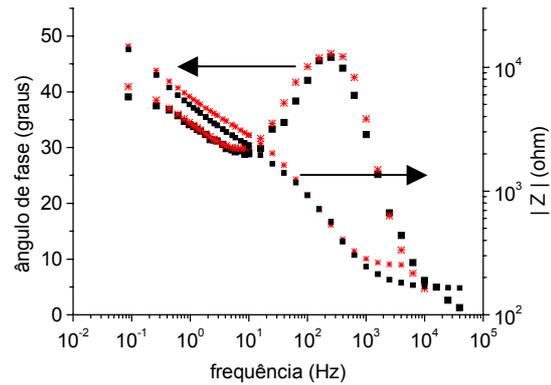
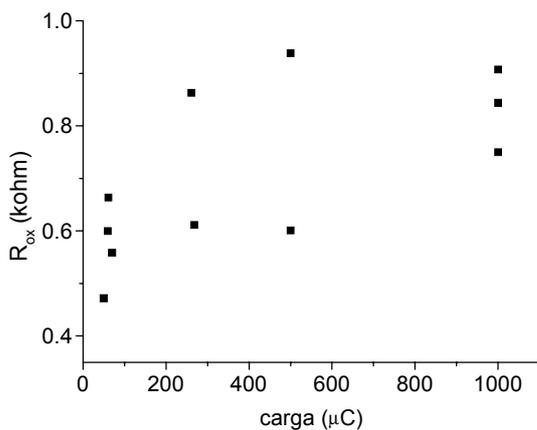


Figura 3.16: a) o modelo 3, b) ajuste entre a curva experimental de óxido com carga de $268 \mu\text{C}$ () e o modelo 3 (*).

A variação dos parâmetros R_{ox} e C_{ox} com a carga pode ser vista respectivamente na figuras 3.17a e 3.17b. A R_{ox} apresenta uma tendência de aumentar com a carga e C_{ox} diminuir com a carga. Essas tendências estão de acordo com as expectativas discutidas quando se apresentou a relação de Z_{re} e Z_{im} na frequência de 25 Hz, figuras 3.8 e 3.9.

a)



b)

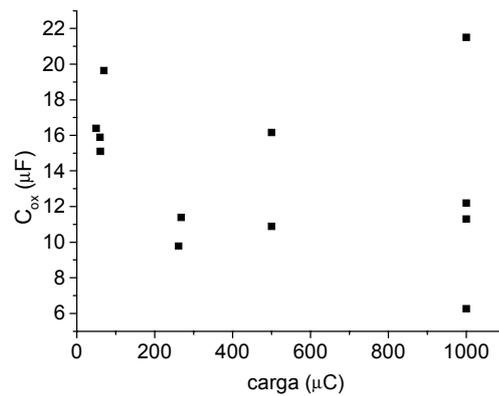


Figura 3.17: a) relação da R_{ox} obtida com o modelo 3 versus carga; b) relação da C_{ox} obtida com o modelo 3 versus carga.

Nesse modelo os valores da R_{ct} situaram-se abaixo da curva de trabalho e com pontos mais dispersos, como pode ser visto na figura 3.18.

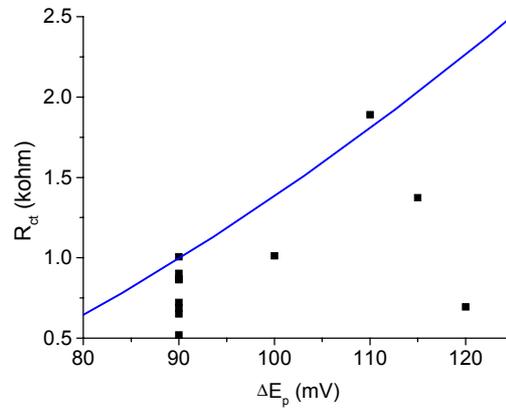
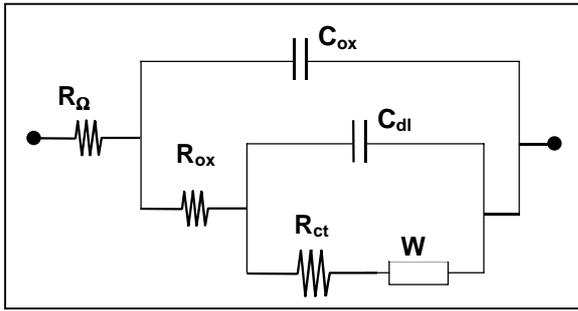


Figura 3.18: Comparação entre os valores obtidos de R_{ct} (■) e o previsto pela curva de trabalho apresentada na figura 3.8 (—).

3.2.3.4) Modelo 4

Uma outra maneira ainda de se analisar o filme óxido, seria como uma camada isolante e rugosa sobre o eletrodo. Esse circuito^{79, 80}, que se denominou modelo 4, apresenta uma capacitância em paralelo, C_{ox} , a uma resistência, R_{ox} , e ao circuito de Randles, como mostra a figura 3.19a. A utilização desse modelo resultou também no ajuste adequado do ângulo de fase havendo, no entanto, ainda uma pequena discrepância entre o modelo e a curva experimental na região de 10^2 - 10^1 Hz, esse resultado pode ser visto na figura 3.19b.

a)



b)

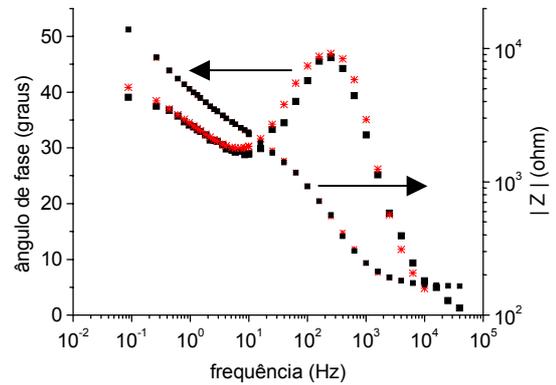
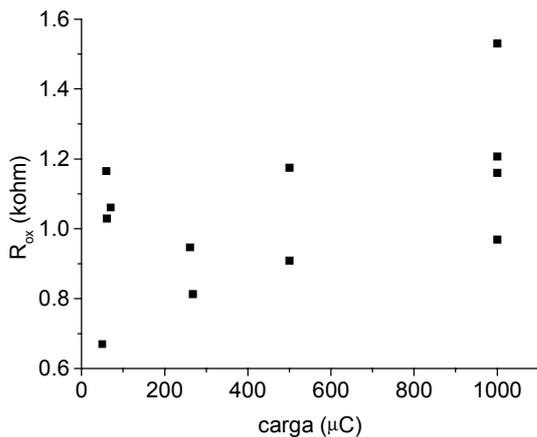


Figura 3.19: a) o modelo 4, b) ajuste entre a curva experimental de óxido com carga de $268 \mu\text{C}$ () e o modelo 4(*).

A variação da R_{ox} e C_{ox} com a carga apresentaram o comportamento previsto, de respectivamente aumentar e diminuir com a carga. Esses resultados podem ser vistos nas figuras 3.20a-b.

a)



b)

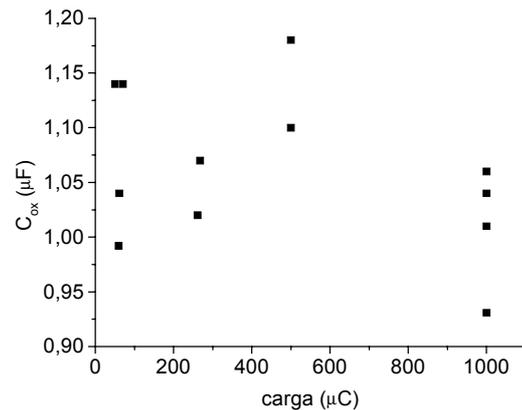


Figura 3.20: a) relação da R_{ox} obtida com o modelo 4 versus carga; b) relação da C_{ox} obtida com o modelo 4 versus carga.

Os valores da R_{ct} se localizaram próximos e um pouco abaixo da curva de trabalho, esse resultado pode ser visto na figura 3.21.

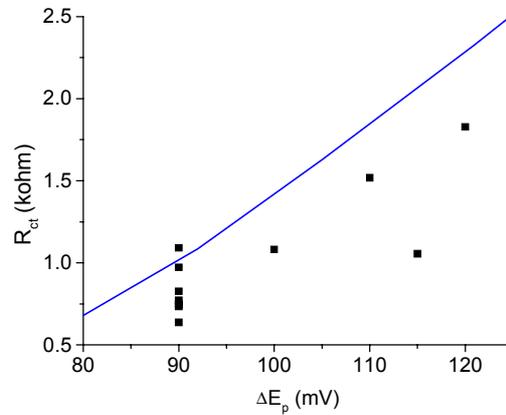


Figura 3.21: Comparação entre os valores obtidos de R_{ct} (■) e o previsto pela curva de trabalho apresentada na figura 3.8 (—).

Na escolha de um modelo para descrever a interface eletrodo/óxido/solução, descartaram-se os modelos 1 e 2 devido à má qualidade no ajuste das curvas experimentais. Os modelos 3 e 4 vistos na figuras 3.16a e 3.19a, tiveram o melhor resultado na modelagem das curvas experimentais e no comportamento qualitativo esperado para R_{ox} e C_{ox} em função da carga. A diferença entre o modelo 3 e 4 está na forma como a camada de óxido participa na interface, no primeiro modelo, como uma camada condutora e no segundo como uma camada isolante. Considerou-se o modelo 4 o mais adequado para explicar os resultados obtidos, essa decisão foi baseada em informações encontradas em literatura⁸⁷ que sustentam que filmes finos de óxido podem ser tratados como isolantes essa questão será abordada em 3.2.5 com maiores detalhes. Esse modelo também apresentou o comportamento da R_{ct} versus ΔE_p , figura 3.21, é o que mais se aproxima da curva de trabalho.

As informações dadas pela resistência e capacitância devem ser avaliadas quantitativamente para se verificar se refletem as propriedades do óxido, esse estudo é descrito em 3.2.4.

3.2.4) Cálculo da Espessura da Camada de Óxido

Na literatura encontra-se que a espessura^{81, 82} da camada de óxido produzida em condições similares as deste trabalho varia entre 6 a 7Å. Uma maneira de verificar se os valores obtidos para R_{ox} e C_{ox} , obtidos com o modelo 4, expressam as propriedades do óxido de platina é calcular a espessura da camada. Para tal aplicaram-se esses valores a expressões características de resistores e capacitores.

Na expressão 3.6, típica para descrever resistores, se observa que a resistência (R) tem uma relação direta com a espessura (d), isto é, um aumento na resistência implica também num aumento da espessura.

$$R = \rho \frac{d}{A} \quad \{3.6\}$$

Onde ρ , é a resistividade do óxido em ($\Omega.cm$)

Esse comportamento pode ser observado na figura e 3.20a, onde se relaciona R_{ox} versus a carga.

Para o cálculo da espessura da camada de óxido avaliou-se inicialmente a área real do eletrodo. Para esse procedimento analisou-se a voltametria cíclica do eletrodo de platina em meio ácido, onde a área sob os picos de adsorção e dessorção do hidrogênio é relacionada a carga de $210 \mu C.cm^{-2}$, valor usualmente dado para uma monocamada⁸³ de hidrogênio. O valor da área obtido com esse procedimento foi de $0,05 \pm 0,002 cm^2$.

Na equação 3.6, o valor da resistividade, ρ , utilizada⁸⁴ para o óxido de platina foi de $10^3 \Omega \cdot \text{cm}$, os valores obtidos para a espessura são apresentados na tabela 3.1.

A tabela 3.1 mostra que o cálculo da espessura utilizando a expressão 3.6 resulta em valores na ordem de centímetros o que é um resultado absurdo para as camadas de óxido deste trabalho. Isto pode estar relacionado a uma dificuldade na avaliação da área utilizada na expressão. O recobrimento da superfície pode apresentar pontos fracos (regiões não recobertas com óxido ou com filmes extremamente finos) que seriam os preferenciais para a transferência dos elétrons. Portanto somente na área correspondente a estes pontos é que deveria ser aplicada a expressão. Outra consideração ainda pode ser feita quanto a resistividade^{85, 86} pois outros valores foram citados para o PtO/PtO₂, como por exemplo $10^6 \Omega \cdot \text{cm}$ ou ainda $10^{-3} \Omega \cdot \text{cm}$, no entanto apenas uma resistividade com valor de $10^9 \Omega \cdot \text{cm}$ resultaria em valores semelhantes aos encontrados na literatura. A grande discrepância entre os valores divulgados para a resistividade deve-se provavelmente ao fato da preparação do óxido influenciar nessa determinação. Observe que os dados encontrados na literatura variaram nove ordens de grandeza, portanto é difícil se avaliar a espessura utilizando a expressão 3.6. Deste modo acredita-se que, R_{ox} , não expresse apenas características intrínsecas do óxido, mas também de propriedades interfaciais.

A expressão 3.7 é aplicada a capacitores de placas paralelas com um dielétrico (ϵ):

$$C = \frac{\epsilon \cdot \epsilon_0 \cdot A}{d} \quad \{3.7\}$$

Nessa equação um aumento na espessura “d” implica numa diminuição no valor da capacitância (C), esse comportamento também foi observado na figura 3.20b onde se relaciona a C_{ox} com a carga.

Os resultados dos cálculos das espessuras, utilizando-se a expressão 3.7 podem ser vistos na tabela 3.1; nesses cálculos, assumiu-se para a constante dielétrica do óxido de platina (ϵ) os valores 10 e 15. Nesse intervalo encontram-se na literatura as constantes dielétricas⁷⁸ para o óxido ferroso (14,2), óxido de tântalo (11,5), entre outros.

Tabela 3.1: Valores calculados para a espessura da camada de óxido utilizando as expressões 3.8 e 3.7.

carga	Espessura calculada com a expressão 3.6	Espessura calculada com a expressão 3.7	
		$\rho=10^3 \Omega.cm$	$\epsilon=10$
60 μC	0,049 cm	4,10 Å	6,18 Å
265 μC	0,044 cm	4,24 Å	6,37 Å
500 μC	0,052 cm	3,88 Å	5,82 Å
1000 μC	0,061 cm	4,38 Å	6,58 Å

Os valores obtidos para a espessura utilizando a capacitância (equação 3.7) são coerentes na ordem de grandeza e próximos aos valores encontrados na literatura, vide tabela 3.1, mostrando que essa componente é apropriada para análise das propriedades do óxido. A área nesse caso, não é relacionada aos pontos fracos de recobrimento, mas à área do eletrodo.

3.2.5) Como a Interface Eletrodo Solução Foi Alterada pela Presença de Óxido?

Os resultados analisados até o momento mostram que o óxido modifica a interface eletrodo/solução e que as informações dadas pela

resistência e pela capacitância estão ligadas as características interfaciais associadas à presença do óxido. No trabalho de Damjanovic⁸⁷ e colaboradores onde foram estudados processos com transferência de elétrons sobre filmes finos de óxido, eles propuseram que esse processo ocorria pelo tunelamento⁸⁸ dos elétrons através desse filme. Nesse modelo⁸⁹ a velocidade de reação decresce exponencialmente com a espessura do óxido como pode ser visto na equação 3.8:

$$i_a = k_a e^{\left(\frac{-mFq}{2RT}\right)} e^{\frac{(1-\beta)\Delta\phi F}{RT}} \quad \{3.8\}$$

i_a , corrente anódica

k_a , fator pré-exponencial dependente da escolha do eletrodo de referência

m , parâmetro experimental [$=(\text{dE}/\text{dq})_i$]

q , carga (Coulomb), equivalente à espessura do filme e a largura da barreira para o tunelamento

$\Delta\phi$, potencial de Galvani

β , fator de simetria que esta relacionado a α .

Com o objetivo de se verificar o comportamento descrito por Damjanovic para os resultados apresentados na figura 3.4 (i_{pa} versus carga), traçou-se o gráfico do logaritmo da corrente de pico anódica versus a carga utilizada para a formação da camada de óxido, figura 3.22. O resultado mostra uma queda linear da corrente em função da carga, comportamento que está de acordo com o proposto por Damjanovic, permitindo assim a continuidade da análise dos resultados utilizando a equação 3.8. É importante ressaltar ainda que com esse resultado também se pode dizer que o aumento da carga implicou num aumento da espessura da camada de óxido.

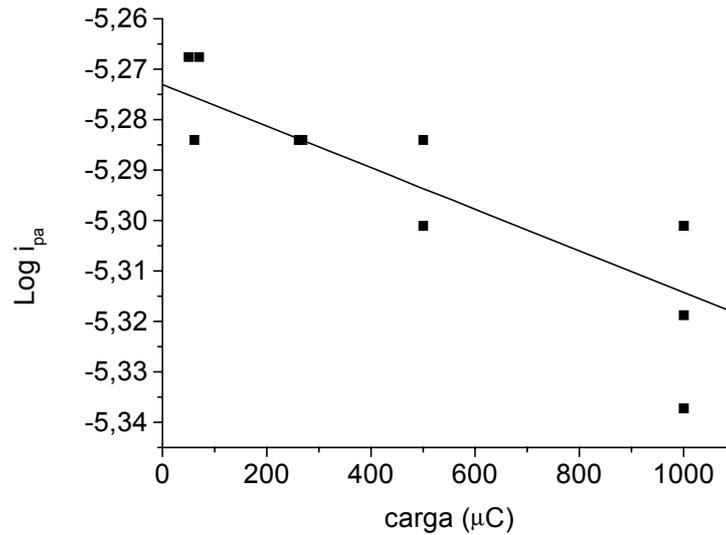


Figura 3.22: Log i_{pa} versus carga, para o eletrodo de platina em uma solução de ferri-ferrocianeto de potássio. O coeficiente de correlação da reta é de 0,84.

Reescrevendo a equação 3.8, quando $\Delta\phi = \Delta\phi_{\text{equilíbrio}}$, então tem-se que a corrente anódica é igual a corrente de troca ($i_a = i_o$):

$$i_o = k_a e^{\frac{-mFq}{RT}} e^{(1-\beta)\frac{\Delta\phi_e F}{RT}} \quad \{3.9\}$$

$\Delta\phi_e =$ potencial no equilíbrio

Substituindo i_o na equação 3.5

$$R_{ct} = \frac{RT}{nF \left[k_a e^{\frac{-mFq}{2RT}} e^{\frac{(1-\beta)\Delta\phi_e F}{RT}} \right]} \quad \{3.10\}$$

e finalmente a equação 3.10 resultando em:

$$\log R_{ct} = \log \frac{RT}{nFka} + \frac{mFq}{2RT2,303} - (1 - \beta) \frac{\Delta\phi_e F}{RT2,303} \quad \{3.11\}$$

Aplicando-se a relação da resistência de transferência do elétron e a carga, mostrada na equação 3.11, para os valores da R_{ct} encontrados com o modelo 4 obtém-se o gráfico da figura 3.23.

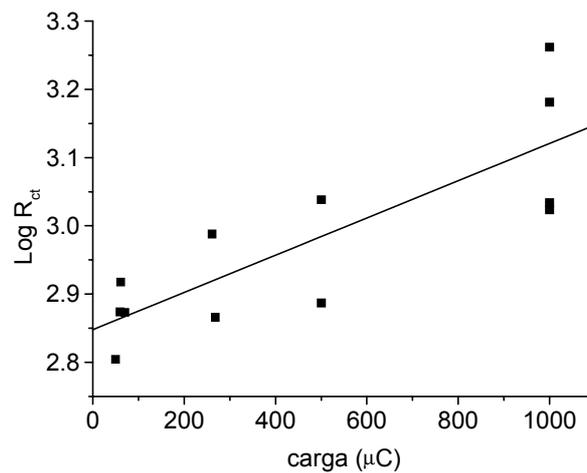


Figura 3.23: Log R_{ct} versus carga, os valores de R_{ct} foram obtidos para o modelo 4.

Verifica-se que o modelo proposto por Damjanovic e colaboradores também pôde ser aplicado aos resultados apresentados nesse trabalho, conforme pode ser visto na figura 3.23. Nessa figura observa-se que o aumento da carga na formação da camada de óxido dificulta o tunelamento dos elétrons e conseqüentemente aumenta a resistência na transferência de elétrons.

3.2.6) Comparativo Entre as Camadas de Óxidos Produzidas Quimicamente e Eletroquimicamente

Para se estabelecer um paralelo entre os resultados obtidos com camadas formadas eletroquimicamente e quimicamente há a necessidade de se associar uma carga às camadas químicas. Com esse objetivo analisa-se os dois valores da R_{ct} obtidos para a camada química e verifica-se que um desses valores se aproxima muito a uma R_{ct} para uma carga de $50 \mu\text{C}$ e o outro valor ficou mais abaixo das curva o que pressupõe uma carga inferior a $50 \mu\text{C}$ e portanto situada fora do intervalo estudado, observe a figura 3.24.

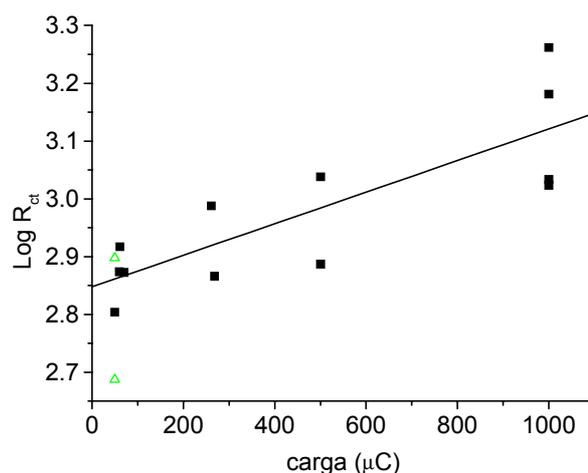


Figura 3.24: Log R_{ct} versus carga, valores de R_{ct} obtidos com o modelo 4 para camadas de óxido formadas eletroquimicamente (■); valor da carga para as camadas de óxido formadas quimicamente (Δ).

A análise dos espectros de impedância de várias camadas de óxido mostrou diferenças entre um óxido químico e um eletroquímico no que diz respeito à região onde o ângulo de fase apresenta seu ponto máximo. Na figura 3.25, observa-se que óxidos eletroquímicos com cargas de $1000 \mu\text{C}$ e

50 μC apresentam o valor máximo do ângulo de fase em frequências próximas respectivamente em 204 Hz e 289 Hz, no entanto, esse valor máximo é deslocado para uma frequência de 523 Hz quando se trata de uma camada química. Admitindo-se que a camada química tenha aproximadamente uma carga de 50 μC , observa-se que a frequência foi deslocada em pelo menos duas vezes e meia quando comparada a camada eletroquímica de mesma carga. Esses fatos mostram que existem diferenças entre essas duas camadas e que não dizem respeito somente à carga envolvida em sua formação.

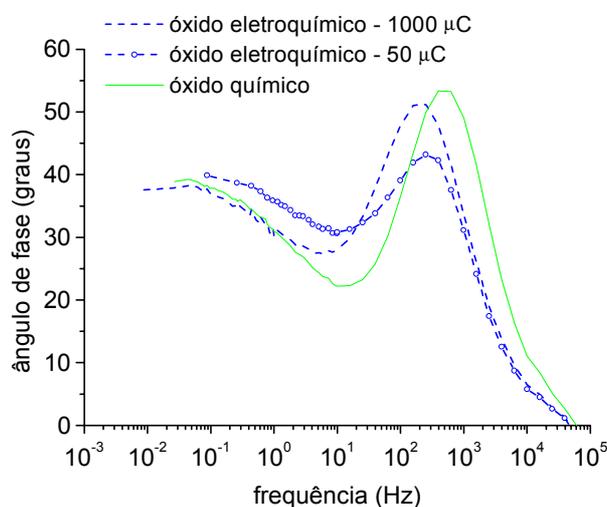


Figura 3.25: Gráfico de Bode ângulo de fase para o eletrodo de platina em uma solução de ferri-ferrocianeto de potássio para uma camada de óxido formada quimicamente (—), para uma camada de óxido formada eletroquimicamente com carga 1000 μC (---) e 50 μC (-o-).

A modelagem das curvas de espectroscopia de impedância ao modelo 4 com óxido químico e eletroquímico, pode ser apresentada num gráfico de colunas, onde cada coluna representa a média de vários experimentos. Para a construção desses gráficos utilizou-se os dados de camadas eletroquímicas formadas com uma carga média próxima, no caso de 61 μC , à camada química. Na figura 3.26a, mostra-se a variação da C_{ox} e da C_{dl} , o gráfico mostra que os valores desses componentes são maiores para o óxido

eletroquímico. Atribui-se esse fato ao óxido eletroquímico possivelmente não cobrir totalmente a área do eletrodo, crescendo de uma forma mais irregular enquanto para o óxido químico tem-se uma camada mais uniforme e compacta. Na figura 3.26b, tem-se a R_{ox} e a R_{ct} , novamente essas componentes são maiores para o óxido eletroquímico, reforçando a idéia de que esta camada seja mais rugosa e provavelmente mais espessa aumentando desse modo a resistência desse sistema. Acredita-se que o tempo envolvido na produção das camadas química e eletroquímica seja um fator de diferenciação das características apresentadas pelos componentes elétricos. Na primeira o tempo gasto para a sua produção foi de 5 minutos enquanto que na segunda foi de poucos segundos, portanto uma formação mais rápida tende a ser mais irregular, ou seja, mais rugosa. Outro fator seria a carga envolvida na formação dessas camadas, que como visto anteriormente se relacionou a espessura do filme de óxido. Deste modo, tem-se que os filmes de óxido eletroquímico utilizaram em torno de $61 \mu\text{C}$ enquanto que para a camada química, associou-se uma carga em torno de $50 \mu\text{C}$ ou menos, conseqüentemente, a primeira é mais espessa do que a segunda o que também contribui para aumentar a resistência do sistema.

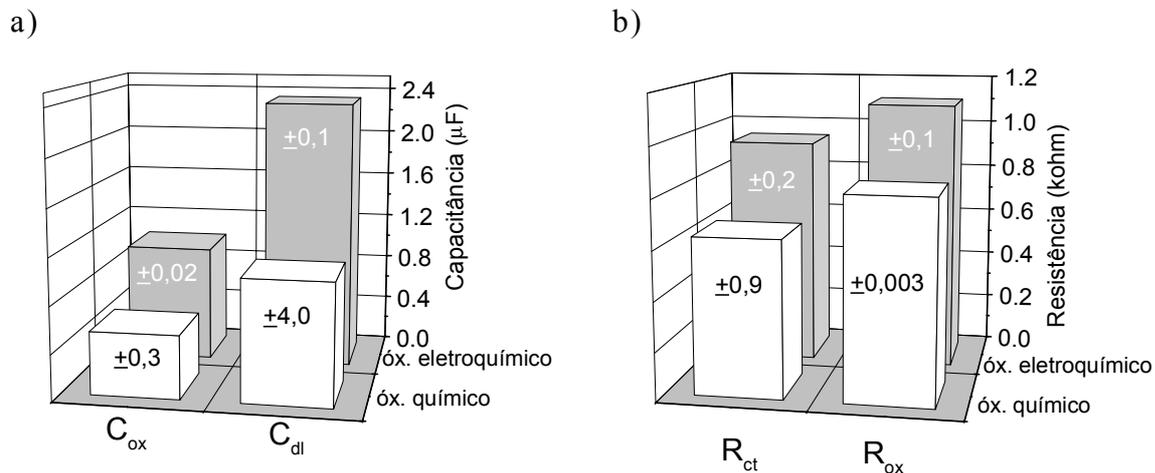


Figura 3.26: Resultado dos valores dos componentes elétricos obtidos com o ajuste ao modelo 4. Os valores são resultado da média de 7 experimentos para camada eletroquímica (carga média de $61 \mu\text{C}$) e 2 experimentos para camada química. Colunas brancas para óxido químico e colunas cinzas para óxido eletroquímico. O intervalo de confiança é de 90%.

Com base na discussão dos resultados da figura 3.27 sugere-se dois possíveis modelos para as camadas de óxido. A camada de óxido químico é contínua e menos rugosa, figura 3.27a, e a camada eletroquímica, figura 3.27b, é mais rugosa e também mais espessa.

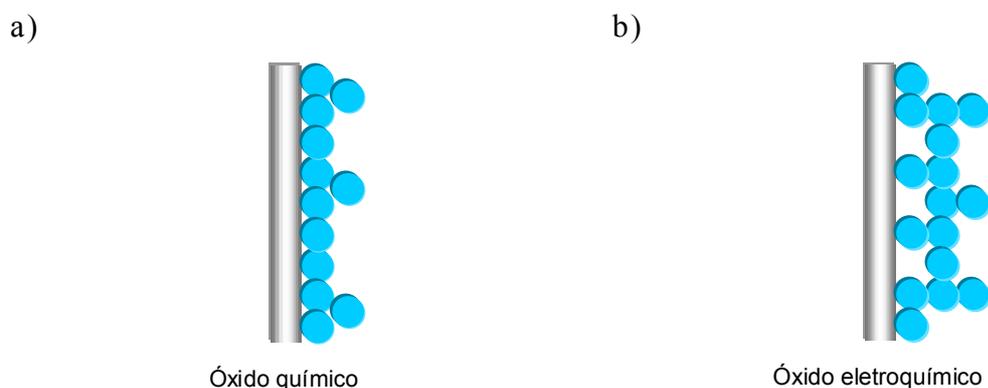


Figura 3.27: Desenho esquemático: a) camada de óxido formada quimicamente; b) camada de óxido formada eletroquimicamente.

3.3) Adsorção da Con A e a Camada de Óxido

A adsorção da con A é bastante afetada pela modificação da superfície da platina com óxido. Essa modificação foi observada inicialmente no voltamograma cíclico do eletrodo de platina em ferri-ferrocianeto de potássio, figura 3.28a, onde os picos de óxido-redução foram praticamente suprimidos devido ao bloqueio⁹⁰ da superfície com a proteína. Na impedância, figura 3.28b, também se verificou que a proteína bloqueia mais intensamente quando o óxido está presente na superfície. Observe que a R_{ct} aumentou em pelo menos 10 vezes em relação ao bloqueio de uma superfície sem óxido. Adicionalmente, a comparação entre a R_{ct} obtida para a superfície com óxido e após a adsorção da con A mostrou que essa componente aumentou aproximadamente 6 vezes. Esse aumento também é um indicativo de que a superfície foi recoberta pela proteína.

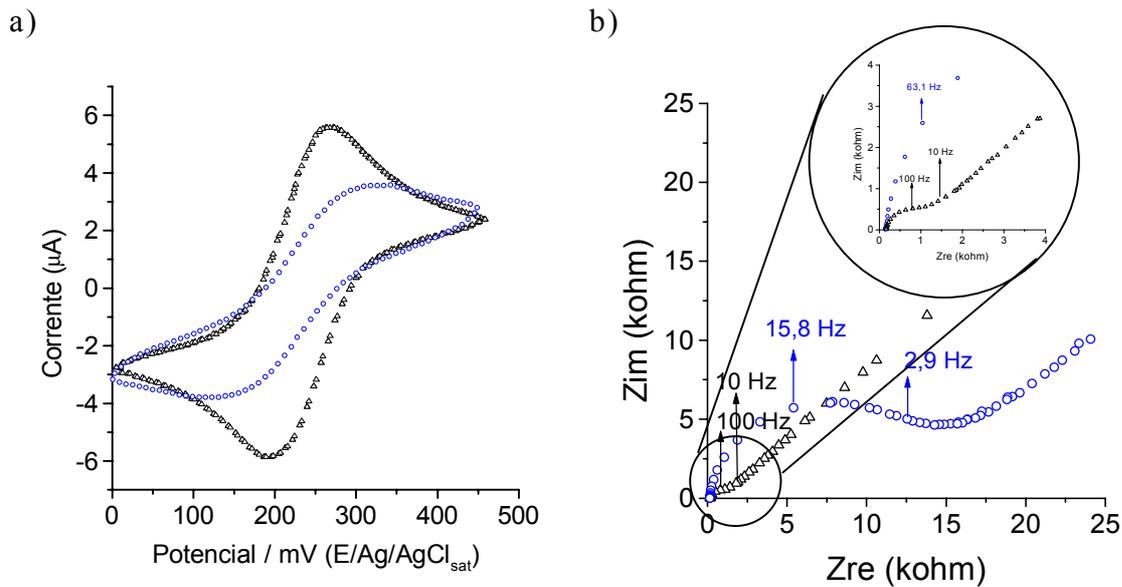


Figura 3.28: a) Voltamograma cíclico, b) Gráfico Nyquist; para o eletrodo de platina em uma solução de ferri-ferrocianeto de potássio, (Δ) superfície sem óxido recoberta com proteína desativada; (\circ) superfície com óxido e recoberta com proteína desativada.

Na literatura discute-se que geralmente as proteínas adsorvem mais facilmente sobre superfícies hidrofóbicas¹⁶, no entanto resultados obtidos para a con A mostram que a adsorção foi intensificada sobre uma superfície mais hidrofílica⁹¹. Um resultado semelhante foi obtido com a adsorção de ovalbumina sobre óxido de alumínio⁴⁸, onde inclusive se comenta que a presença do óxido evita a desnaturação da proteína.

3.3.1) O circuito Equivalente

O modelo 4, já mostrado em 3.2.3, também foi utilizado para descrever os resultados com proteínas^{92,93}, um exemplo do resultado dessa modelagem

pode ser visto na figura 3.29a. A relação da R_{ct} obtida para esse modelo e a ΔE_p é muito próxima da prevista pela curva de trabalho, veja a figura 3.29b, assegurando que o modelo esteja fornecendo valores compatíveis para uma R_{ct} . Um outro aspecto importante desse gráfico é que se observa uma clara separação das R_{ct} , que aumentam quando se passa de uma situação em que a con A está na forma ativada para a forma desativada, isso ocorrendo tanto para o óxido químico como para o eletroquímico.

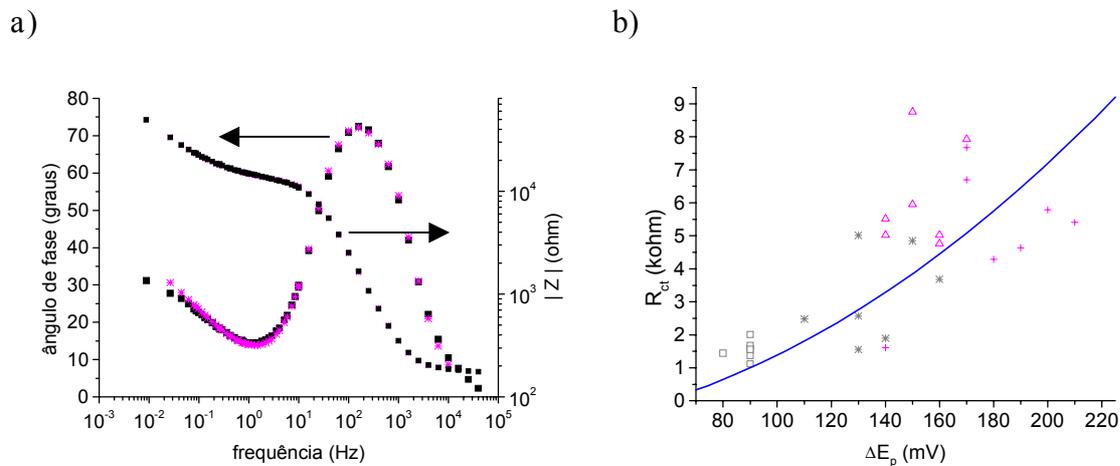


Figura 3.29: a) ajuste entre a curva experimental da adsorção da con A na forma desativada (\blacksquare) e o modelo 4 (*); b) comparação entre os valores da R_{ct} obtidos com o modelo 4 para a con A adsorvida na forma: desativada sobre óxido eletroquímico (+), desativada sobre óxido químico (Δ); ativada sobre óxido eletroquímico (*), ativada sobre óxido químico(\square) e curva de trabalho (—).

Na tabela 3.2, apresenta-se os valores obtidos com a modelagem para os parâmetros R_{pro} , C_{pro} , R_{ct} e C_{dl} , nas condições experimentais estudadas.

Tabela 3.2: Valores das componentes R_{pro} , C_{pro} , R_{ct} e C_{dl} obtidos para a adsorção da con A em diversas condições experimentais utilizando o modelo 4.

Superfície	Ativação da proteína	R_{pro} (k Ω)	C_{pro} (μ F)	R_{ct} (k Ω)	C_{dl} (μ F)
Pt	Ativ.	0,728 ^a ±0,256	0,532 ^a ±0,022	0,411 ^a ±0,212	2,19 ^a ±0,099
Pt	Desativ.	0,848 ^a ±0,427	0,554 ^a ±0,035	0,447 ^a ±0,184	2,24 ^a ±1,02
Pt\PtO _{eq}	Ativ.	4,28 ^b ±1,68	0,69 ^b ±0,078	3,15 ^b ±1,45	1,12 ^b ±0,079
Pt\PtO _q	Ativ.	2,99 ^a ±0,786	0,639 ^a ±0,029	1,87 ^a ±0,698	1,46 ^a ±1,81
Pt\PtO _{eq}	Desativ.	8,70 ^b ±3,48	0,694 ^b ±0,107	5,16 ^b ±1,80	1,92 ^b ±1,85
Pt\PtO _q	Desativ.	7,44 ^b ±1,35	0,701 ^b ±0,047	6,14 ^b ±1,46	1,25 ^b ±0,027

^a média de 5 experimentos, ^b média de 7 experimentos

Nota 1: O intervalo de confiança é de 95%;

Nota 2: a carga utilizada foi de 61 μ C para a produção de filme de óxido eletroquímico

Destaca-se que R_{pro} e C_{pro} são componentes somados a R_{ox} e C_{ox} , portanto expressam as mudanças interfaciais devido à presença do óxido, e que agora passam a expressar também as mudanças interfaciais devido à presença da proteína. No caso da superfície de platina sem óxido, apenas a contribuição da proteína. A carga utilizada para a produção do filme de óxido eletroquímico foi em torno de 61 μ C.

Os resultados obtidos com a adsorção da proteína sobre a platina sem óxido mostraram que os parâmetros R_{pro} e R_{ct} diferenciam sutilmente a forma ativada e desativada, com valores ligeiramente superiores para a última forma citada. Os valores de C_{pro} e C_{dl} foram semelhantes para as duas formas.

No entanto quando se comparam os resultados para as situações sem e com óxido, se observa um grande aumento na resistência. Esse fato já havia sido mostrado qualitativamente em 3.3, e agora se confirma comparando-se os valores desses componentes, há pelo menos um aumento de 10 vezes para a proteína desativada.

De uma forma geral, os resultados para a R_{ct} e para a R_{pro} com óxido, apresentados no gráfico 3.30a-b, são os parâmetros que diferenciam a proteína

na forma ativada e desativada, com valores resistivos mais altos para a proteína desativada. Esse comportamento é idêntico tanto para a exposição da proteína sobre uma superfície modificada com óxido químico como eletroquímico.

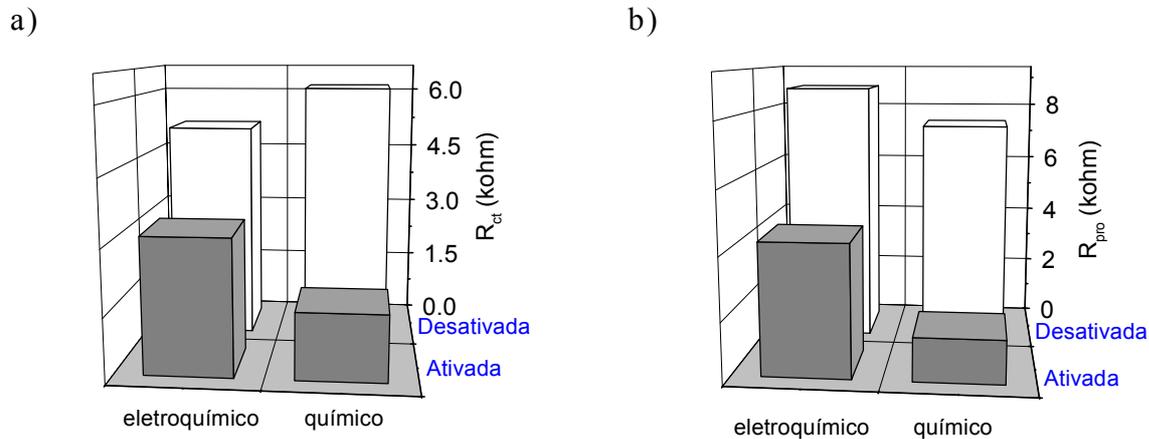


Figura 3.30: Resultados da adsorção da con A ativada e desativada sobre óxido químico e eletroquímico, esses resultados são médias de 7 experimentos obtidos para os seguintes componentes do modelo 4: a) R_{ct} ; b) R_{pro} .

A capacitância do mesmo modo que a resistência também é bastante modificada quando se comparam os resultados sem e com óxido. No caso da C_{dl} , esta diminui pelo menos uma vez tanto para a forma ativada como desativada. No caso da C_{pro} o efeito também é verificado, no entanto nesse caso há um aumento de pelo menos uma vez.

As capacitâncias C_{dl} e C_{pro} , para superfícies com óxido, apresentam resultados que não distinguem a forma ativada e desativada da con A, apresentando valores semelhantes de C_{pro} para as duas formas. A C_{dl} , figura 3.31, tem a tendência de aumentar para a forma desativada quando a adsorção ocorre sobre um óxido eletroquímico, no entanto, essa tendência inverte quando a adsorção ocorre sobre um óxido químico.

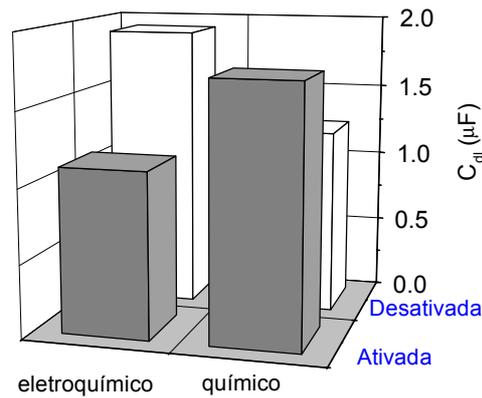


Figura 3.31: Resultados obtidos para a adsorção da com A ativada e desativada sobre óxido químico e eletroquímico, esses resultados são médias de 7 experimentos obtidos para a componente C_{dl} no modelo 4.

3.3.2) Efeito da Quantidade de Óxido na Adsorção da Proteína

As propriedades interfaciais da platina são modificadas com a presença do óxido, essa modificação pôde ser observada na R_{ct} , que aumenta com o aumento da carga para a formação do filme de óxido, veja figura 3.32. E o aumento da carga para a produção do filme de óxido, como já comentado anteriormente em 3.2.4, implica também em um aumento na quantidade de óxido sobre a superfície.

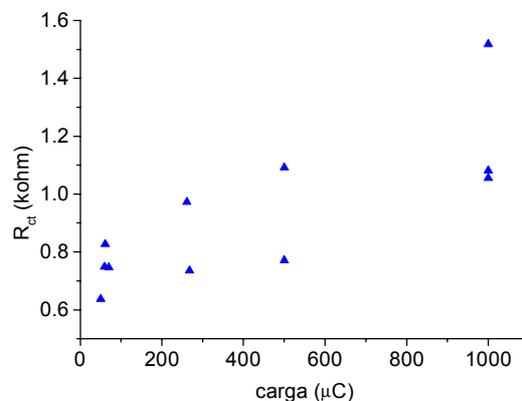


Figura 3.32: Variação da R_{ct} com a carga, resultados obtidos para o eletrodo de platina em ferri-ferrocianeto de potássio utilizando o modelo 4.

A adsorção da con A também é sensível a essa mudança interfacial provocada pelo óxido, como pode ser verificado na figura 3.33.

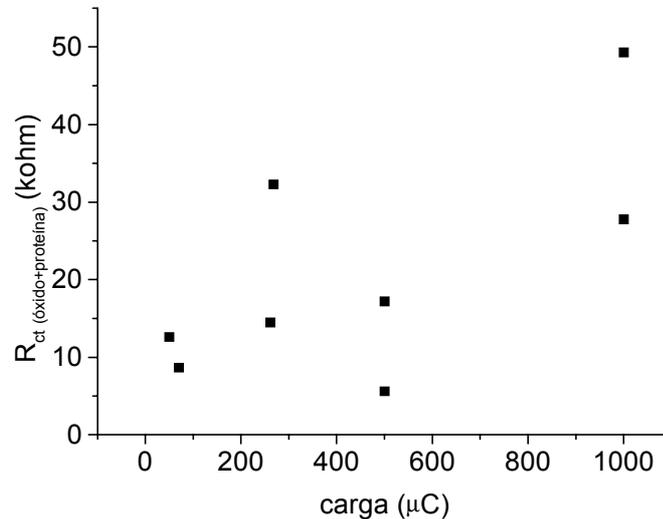


Figura 3.33: R_{ct} (óxido+proteína) versus carga para o eletrodo de platina exposto 30 min em con A desativada em ferri-ferrocianeto de potássio.

Na figura acima se observa que a R_{ct} (óxido+proteína) aumenta com o aumento da carga indicando um aumento no bloqueio da superfície do eletrodo com a proteína em função do aumento da carga. Portanto quanto mais óxido sobre a superfície do eletrodo melhor é adsorção da proteína. A comparação das figuras 3.32 e 3.33 evidencia esse efeito, mostrando que a R_{ct} (óxido+proteína) aumentou aproximadamente 10 vezes e que não é apenas um aumento proporcional devido ao óxido, uma vez que essas curvas apresentam inclinações diferentes.

3.3.2) Caracterização da Adsorção da Con A

O conhecimento da orientação e/ou conformação¹ da proteína pode auxiliar na interpretação dos resultados esclarecendo as diferenças observadas na adsorção da proteína em relação à superfície e sua forma ativada ou desativada.

Jackson et al⁹⁴, utilizaram técnicas eletroquímicas para determinar a conformação da albumina de soro bovino e do fibrinogênio sobre o titânio. A idéia foi associar à densidade de carga obtida na voltametria cíclica a quantidade de proteína adsorvida para assim ter acesso à concentração superficial da proteína. Essas proteínas, por meio dos grupos carboxilatos⁹⁵, adsorvem na superfície metálica segundo a reação 3.12:



Onde P, é a proteína; M, é o metal e n é o número de grupos carboxilatos; a adsorção da proteína ao metal esta associada à transferência de n elétrons. Assim pôde-se relacionar a densidade de carga com a quantidade de moléculas de proteína.

No caso da con A, a adsorção não envolve uma reação eletroquímica. No entanto esta proteína bloqueia a reação de transferência de elétrons do ferri-ferrocianeto de potássio, assim considerou-se a possibilidade de se avaliar a quantidade de proteína através desse bloqueio. Deste modo o mesmo princípio foi aplicado para se obter a densidade de carga (Q) para a con A. Os resultados são apresentados na tabela 2 onde o valor $Q_{ads}\%$, percentual da área recoberta com proteína dada pela densidade carga, é obtido segundo a expressão 3.13.

$$Q_{ads} \% = \left[\frac{Q_{(sem\ prote\acute{a}na)} - Q_{(com\ prote\acute{a}na)}}{Q_{(sem\ prote\acute{a}na)}} \right] \times 100 \quad \{3.13\}$$

Onde $Q_{(sem\ prote\acute{a}na)}$ é a carga obtida integrando-se no voltamograma cíclico a área sob os picos de ferri-ferrocianeto de potássio, $Q_{(com\ prote\acute{a}na)}$ é a carga obtida integrando-se no voltamograma cíclico a área sob os picos de ferri-ferrocianeto de potássio após a adsorção da proteína.

Os valores $Q_{ads} \%$, apresentados na tabela 3.3, expressam um crescente aumento no bloqueio da superfície mostrando que a transferência de elétrons ocorre com mais dificuldade em uma superfície de platina/óxido/proteína do que em platina/proteína. Mas como saber se esse valor percentual pode ser relacionado ao grau de recobrimento da superfície? Com a finalidade de esclarecer essa questão estabeleceu-se um paralelo entre os valores encontrados para o percentual de recobrimento da superfície dado pela Q e pela R_{ct} . O parâmetro R_{ct} foi escolhido porque é um dado cinético da reação que informa a facilidade ou não da mesma ocorrer e que pode ser afetado pela presença da proteína na superfície do eletrodo. Pode-se obter o valor da R_{ct} com a voltametria cíclica, utilizando-se a expressão 3.5, e também pela impedância. O cálculo do percentual da superfície recoberta com proteína, dada pela resistência $R_{ct} \%$, foi obtido utilizando uma expressão análoga a 3.13.

Tabela 3.3: Valores do percentual de área recoberta com proteína obtida a partir da carga $Q_{ads} \%$, da voltametria cíclica $R_{ct} \%$ (VC) e impedância $R_{ct} \%$ (IM).

Superfície	$Q_{ads} \%$	$R_{ct} \%$ (VC)	$R_{ct} \%$ (IM)
Pt/con A desativada	3,54	44,8	57,6
Pt/PtO_{eq}/con A ativada	18,3	57,9	48,1
Pt/PtO_{eq}/con A desativada	43,1	87,5	86,8

A análise da tabela 3.3 mostra uma diferença muito grande no grau de recobrimento dado pela $Q_{ads}\%$ e as $R_{ct}\%$ dadas pela voltametria cíclica e impedância, esses dois últimos parâmetros com valores semelhantes. Esperava-se que tanto Q quanto R_{ct} fornecessem valores parecidos para o bloqueio, no entanto concluiu-se que a quantidade de carga transferida pelo sistema Fe^{3+}/Fe^{2+} , não é um parâmetro adequado para informar o grau de bloqueio ou de recobrimento da superfície, pelo menos no que diz respeito a con A, pois embora a proteína bloqueie a superfície ela não impede a transferência dos elétrons, portanto os valores de $Q_{ads}\%$ vistos na tabela 3.3 mostram que a proteína dificulta a transferência de elétrons, mas, esses valores não indicam o grau de recobrimento. No caso dos valores obtidos para $R_{ct}\%$ os valores parecem indicar o percentual de recobrimento da superfície, no entanto, não se tem conhecimento da relação desse parâmetro com o número de moléculas adsorvidas ou a sua conformação. Essa relação não envolve interações eletroquímicas como ocorreu no trabalho com a albumina de soro bovino e o fibrinogênio⁹⁵, onde foi possível se fazer uma relação do número de moléculas com a densidade de carga porque as interações com a superfície envolviam uma reação eletroquímica.

Como já apresentado anteriormente em 3.2.5, o modelo de Damjanovic e colaboradores, foi utilizado para explicar o efeito da espessura camada de óxido sobre a velocidade de reação de oxi-redução do ferri-ferrocianeto de potássio. Sabendo-se que o tamanho da barreira para o tunelamento é influenciado pela espessura do óxido e que esse processo independe da natureza do material presente na barreira, cogitou-se a possibilidade de se utilizar o mesmo modelo para o eletrodo recoberto com proteína. Nesse caso a proteína também faria parte da barreira para o tunelamento juntamente com o óxido.

Na equação 3.11, relaciona-se a R_{ct} com a carga, essa mesma equação pode ser expressa em função da espessura⁹⁶ do óxido através da expressão 3.14.

$$\frac{mFq}{2RT} = \delta d \quad \{3.14\}$$

Onde δ é um parâmetro determinado experimentalmente.

Substituindo 3.14 na expressão 3.11 obtém-se:

$$\log R_{ct} = \log \frac{RT}{nFk_a} + \frac{\delta d}{2,303} - \frac{(1-\beta)\Delta\phi_e F}{2,303RT} \quad \{3.15\}$$

Um gráfico semelhante ao mostrado na figura 3.24 é rerepresentado em função da espessura da camada de óxido, essa espessura é calculada conforme a equação 3.7, como já comentado 3.2.4. A curva de trabalho obtida na figura 3.34, gera uma equação da reta com um inclinação δ característica para a reação do ferri-ferrocianeto de potássio, com esse procedimento pôde-se obter nesse meio o valor da espessura da camada de proteína.

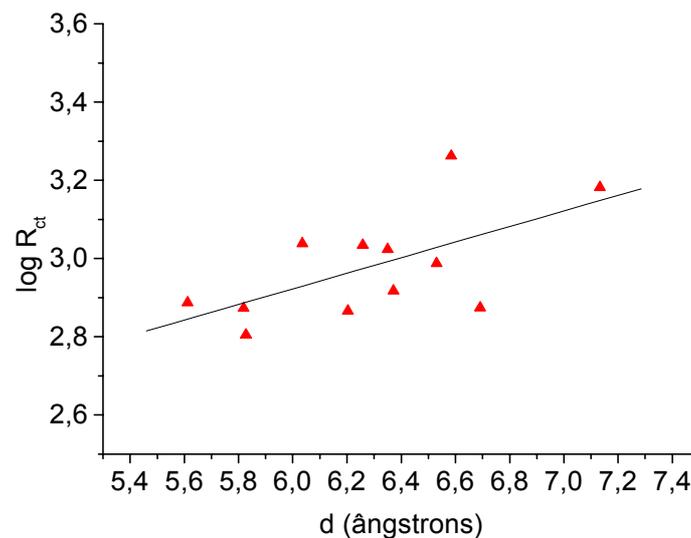


Figura 3.34: Log R_{ct} versus espessura da camada de óxido (d), para o eletrodo de platina em ferri-ferrocianetode potássio.

De acordo com a curva de trabalho mostrada na figura 3.34, a espessura obtida para a con A em cada condição experimental é relacionada na tabela 3.4.

Tabela 3.4: Valores da espessura da con A utilizando a R_{ct} e aplicando a curva de trabalho mostrada na figura 3.34.

superfície	ativação da proteína	R_{ct} (k Ω)	d (Å)
		óxido+proteína	óxido+proteína
Pt/PtO _{eq}	ativada	3,15±1,45	8,94
Pt/PtO _q	ativada	1,87±0,698	7,80
Pt/PtO _{eq}	desativada	5,16±1,80	10,2
Pt/PtO _q	desativada	6,14±1,46	10,4

Nota 1: O intervalo de confiança é de 95%

Nota 2: as médias são resultados de 7 experimentos

Uma análise geral na tabela 3.4 indica que os valores obtidos para a espessura da camada foram inferiores a dimensão da própria proteína, levando a cogitar-se a possibilidade desses valores se referirem a uma espessura média. Essa espessura média ($d_{m\acute{e}dia}$) seria a soma de regiões com proteína ($d_{prote\acute{i}na}$) e sem proteína ($d_{\acute{o}xido}$):

$$d_{m\acute{e}dia} = d_{prote\acute{i}na} \frac{A_{prote\acute{i}na}}{A} + d_{\acute{o}xido} \frac{(A - A_{prote\acute{i}na})}{A} \quad \{3.16\}$$

$$\text{Onde } d_{prote\acute{i}na} = \frac{A_{prote\acute{i}na} \cdot R_{pro}}{\rho} \quad \{3.17\}$$

A resolução da equação 3.16 fornece a área ocupada pela proteína ($A_{\text{proteína}}$), que representou o equivalente a um recobrimento variando entre 9 a 13% da área total (A). Esse percentual pequeno de recobrimento não justificaria o tunelamento através de regiões recobertas com proteína. E ainda, conforme citado em literatura¹⁰³, acredita-se que a proteína esteja recobrindo toda a área do eletrodo e ainda de acordo com o mencionado por Lundström⁹⁷, proteínas não são bons isolantes elétricos, e que a impedância é muito modificada nos pontos de contato entre a proteína e a superfície, resultando que o “recobrimento elétrico” é menor do que o “recobrimento geométrico”. Esse comentário vem de encontro com o que já se havia observado na tabela 3.3 onde o recobrimento dado pela carga (recobrimento elétrico) é muito menor daquele dado pela resistência (recobrimento geométrico). Baseados nesses comentários propõe-se que os valores dados na tabela 3.4 representam a distância máxima para o tunelamento dos elétrons. Na figura 3.35, exemplifica-se com o transporte dos íons ferrosos através da proteína até uma distância tal para que os elétrons possam tunelar, num processo análogo os íons férricos podem receber elétrons.

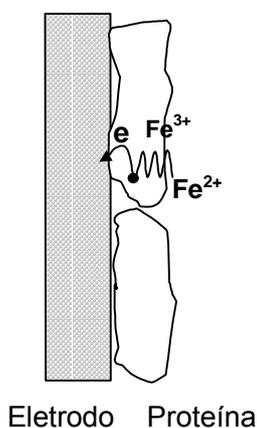


Figura 3.35: Desenho esquemático da transferência de elétrons através da camada de proteína e o tunelamento.

Uma outra maneira de se tentar calcular a espessura da camada de proteína é atribuir as componentes R_{pro} e C_{pro} as propriedades do filme

protéico deste modo esses parâmetros podem ser substituídos respectivamente nas equações 3.6 e 3.7, das quais por sua vez obtém-se a espessura.

Na tabela 3.5 apresenta-se os resultados obtidos para a espessura aplicando-se os valores de R_{pro} na equação 3.6, onde assumiu-se para a resistividade⁹⁸, ρ , o valor de $10^{-8} \Omega.cm^{-1}$.

Tabela 3.5: Valor da espessura da camada de con A obtida utilizando a componente R_{pro} para várias condições experimentais.

superfície	Ativação da proteína	R_{pro} (kohm) óxido+proteína	d (Å) ^a óxido+proteína	d (Å) óxido	d (Å) proteína
Pt	ativada	0,729 ^a ±0,256	-	-	27,7±9,73
Pt	desativada	0,848 ^a ±0,427	-	-	32,2±16,2
Pt/PtO _{eq}	ativada	4,28 ^b ±1,68	163±63,9	6,19	157±63,9
Pt/PtO _q	ativada	2,99 ^b ±0,786	114±29,9	5,45	108±8,35
Pt/PtO _{eq}	desativada	8,70 ^b ±3,48	331±132,1	6,00	325±132,1
Pt/PtO _q	desativada	7,44 ^b ±1,35	283±51,2	5,45	277±51,2

Nota: O intervalo de confiança é de 95%

^a média de 5 experimentos, ^b média de 7 experimentos

A análise da tabela 3.5 mostra que a espessura da proteína varia bastante, 5 a 10 vezes, quando se modifica a superfície de platina com óxido e ainda que esses valores são maiores quando a proteína se encontra na forma desativada. Este resultado está de acordo com o que já foi comentado qualitativamente na seção 3.3.

Os valores encontrados na literatura para uma monocamada de con A adsorvida, são similares aos valores obtidos aqui para a espessura da camada de con A sobre a superfície de platina sem óxido. De Bono et al.⁹⁹ investigaram a adsorção da con A sobre ouro, e encontraram uma espessura de 28,1 Å, Revell et al.¹⁰⁰ obtiveram uma espessura de aproximadamente 27 Å também sobre ouro, Waner et al.¹⁰¹ obtiveram uma espessura de 30 Å sobre uma superfície de mica.

Esses valores a princípio não concordam com nenhuma das dimensões propostas para um monômero, dímero ou tetrâmero da con A, De Bono et al. atribuíram esse fato à desnaturação da proteína. No entanto, em um estudo mais detalhado, Waner et al. consideraram o fato da interação proteína-substrato ocasionar um achatamento da proteína sem, no entanto desnaturá-la¹⁰¹. Além disso, mostrou que a orientação preferencial para a adsorção da forma dimérica (80 x 40 x 40 Å) ocorre lateralmente, isto é, com o eixo de maior contato entre a proteína e a superfície, essa proposta já havia sido apresentada por Afshar-Rad et al.^{102,103}, porém em um estudo menos detalhado. Ressaltaram-se os trabalhos com a forma dimérica da proteína porque o pH do meio em que se processou a adsorção foi de 5,0; propício a formação de dímeros.

Portanto conclui-se que os valores obtidos na tabela 3.5 para a espessura da camada de proteína sobre uma superfície sem óxido estão de acordo com os divulgados na literatura. Deste modo se fortalece o conceito de que R_{pro} possa ser utilizada como parâmetro para informar espessura.

Dando continuidade à análise dos resultados da tabela 3.5 e em conformidade com o que já foi discutido, amplia-se a discussão para a situação em que a platina foi modificada com um filme de óxido. Embora não se possa afirmar que neste caso a orientação da proteína seja a mesma, observa-se que há a formação de multicamadas¹⁰⁴ de proteínas. Deste modo, verifica-se que quando a proteína se encontra na forma desativada há a formação de um maior número de camadas do que quando ela está na forma ativada, isto se a adsorção ocorrer com a mesma orientação para as duas condições. Além disso, a adsorção também pode ocorrer em várias orientações^{1, 101} e assim dificultando a projeção de um número determinado de monocamadas para cada situação da con A.

Nas pesquisas onde a adsorção da con A foi verificada sobre o ouro, mica e a platina, a adsorção ocorreu através de interações não específicas, outros estudos também foram realizados explorando a adsorção específica da con A. Com esse intuito, Anzai et al.¹⁰⁵ modificaram a superfície com glicose-oxidase ou no trabalho de Ebara et al.¹⁰⁶ onde a superfície foi modificada com um glicolípido, observa-se que a orientação da con A é frontal. Considera-se a possibilidade da adsorção sobre um filme de óxido também possa ocorrer de

modo frontal, uma vez que nesse filme, a presença de hidroxilas possa mimetizar as hidroxilas de um carboidrato. Essa possibilidade é sugerida com base nos resultados que serão apresentados na seção 3.4, onde se discute a capacidade da Con A adsorvida reter a sua característica de especificidade a carboidratos. Os resultados mostram que essa habilidade é bastante diferenciada para a situação em que a proteína foi adsorvida sobre um filme de óxido, o que poderia ser justificado pela diferença na orientação.

No caso da adsorção da proteína sobre óxido químico, sempre se obteve espessuras menores, independentes da forma da proteína, provavelmente esse fato esteja relacionado à quantidade de óxido, como já discutido em 3.2.6, ser menor quando produzida dessa forma.

Uma clara diferenciação, também foi observada entre as espessuras obtidas para a proteína na forma ativada e desativada, estas são menores para a ativada, sugerindo que a presença dos cátions metálicos confere uma forma mais compacta à proteína, isso no caso de se ter o mesmo número de monocamadas para as duas formas da proteína.

A medida da capacitância é bastante sensível a modificações que ocorrem na interface eletrodo/solução^{107,108,109,110}, esse é um fato amplamente divulgado na literatura e também verificada nesse trabalho. Mas que outras informações são possíveis de se obter? Ivarson et al.¹¹¹, relacionaram as diferenças observadas devido a mudanças na orientação e conformação da albumina¹¹² e lisozina sobre a platina, óxido de titânio e óxido de zircônio. A espessura^{113,70} da proteína também foi relacionada à capacitância, no entanto sem sucesso. A falha foi atribuída ao modelo elétrico escolhido que não previa descontinuidades na camada de proteína. Esses resultados reforçam o que já havia sido comentado por Lundström⁹⁷, de que proteínas não são bons isolantes elétricos.

Neste trabalho também se tentou calcular a espessura da camada de proteína a partir da capacitância. Na tabela 3.6 apresenta-se os resultados obtidos para a espessura aplicando-se os valores de C_{pro} na equação 3.7, onde assumiu-se para a constante dielétrica da proteína^{114, 115}, ϵ , o valor de 20.

Tabela 3.6: Valor da espessura da con A obtida utilizando a componente C_{pro} para várias condições experimentais.

superfície	Ativação da proteína	C_{pro} (μF) óxido+proteína	d (\AA)
Pt	ativada	0,532 ^a ±0,022	12,6±0,510
Pt	desativada	0,554 ^a ±0,035	12,1±0,752
Pt/PtO _{eq}	ativada	0,689 ^b ±0,078	9,70±1,06
Pt/PtO _q	ativada	0,637 ^b ±0,029	10,9±0,524
Pt/PtO _{eq}	desativada	0,694 ^b ±0,107	9,65±1,46
Pt/PtO _q	desativada	0,701 ^b ±0,047	9,54±0,629

Nota 1: O intervalo de confiança é de 95%

^a média de 5 experimentos, ^b média de 7 experimentos

A comparação entre os valores obtidos na tabela 3.5 e 3.6, respectivamente obtidos com R_{pro} e C_{pro} , mostra uma diferença de pelo menos uma ordem de grandeza entre os resultados. Uma possível explicação para a diferença nos valores é de que a “espessura” obtida a partir de C_{pro} esteja relacionado à separação de cargas positivas e negativas entre as cadeias da proteína. Essas moléculas são formadas por uma seqüência de aminoácidos que podem ser carregadas positiva e/ou negativamente, e essas cadeias se organizam formando hélices- α e/ou folhas pregueadas- β , sugerindo assim que os valores dados na tabela 3.6 se referem a conformação das cadeias e não à espessura de proteína propriamente dita. Com essa premissa observou-se que quando a proteína foi adsorvida sobre uma superfície sem óxido essas distâncias são maiores, portanto as cadeias estão mais distantes ou em uma orientação diferente daquela observada quando a proteína foi adsorvida sobre uma superfície com óxido. E sempre que a proteína se encontra na forma desativada esses valores são menores, a diferença é sutil, mas presente em todas as condições experimentais. Essa diferença entre as distâncias, maiores na superfície sem óxido e menores na superfície com óxido pode também estar associada respectivamente à formação de uma monocamada e de

multicamadas. A formação de multicamadas ocasionaria uma compactação da proteína devido a uma maior aproximação entre as cadeias da mesma.

3.4) Especificidade e Seletividade da Con A Adsorvida

Um dos objetivos do trabalho também foi verificar se a proteína quando adsorvida no eletrodo permanecia com a capacidade de reconhecer carboidratos e distinguí-los.

Deste modo realizaram-se experimentos para se averiguar como a con A adsorvida interagia com as seguintes substâncias: glicogênio, glicose e galactose, lembrando que a con A não é específica a esse último carboidrato.

A reação entre antígeno-anticorpo, semelhante a lectina-carboidrato, quando é monitorada por um sensor impedimétrico se dá geralmente pelo controle da capacitância^{116, 117, 118}, contudo outros^{119, 120} componentes impedimétricos também podem ser acompanhados. Neste trabalho, a resistência foi o parâmetro que melhor caracterizou a interação lectina-carboidrato, enquanto a capacitância não se mostrou eficiente.

Na tabela 3.7, são mostrados os resultados do aumento relativo, $\Delta\%R_{pro}$, da resistência do carboidrato (R_{car}) em relação a resistência da proteína (R_{pro}), os valores são obtidos segundo a expressão 3.18. Lembrando que (R_{car}) não é apenas a resistência do carboidrato, mas também da proteína e do óxido, se presente. O mesmo ocorre para (R_{pro}) que é a resistência da proteína e do óxido quando este está presente.

$$\Delta\%R_{pro} = \frac{R_{car} - R_{pro}}{R_{pro}} \times 100 \quad \{3.18\}$$

Tabela 3.7: Resultados mostrando o aumento relativo da resistência do carboidrato em relação a con A $\Delta\%R_{pro}$, para diversas condições experimentais.

Superfície/con A/carboidrato	$\Delta\%R_{pro}$	
	ativada	desativada
Pt/con A/glicogênio	38,9 ^a ±22,3	31,0 ^b ±13,8
Pt/PtO_q/con A/glicogênio	38,9 ^c ±102	30,5 ^d ±8,13
Pt/PtO_{eq}/con A/glicogênio	75,8 ^d ±68,2	28,2 ^d ±19,6
Pt/PtO_{eq}/con A/glicose	177 ^c ±576	62,0 ^c ±28,2
Pt/PtO_{eq}/con A/galactose	28,6 ^c ±104	111 ^c ±267

Nota: O intervalo de confiança é de 90%

^a média de 4 experimentos, ^b média de 5 experimentos, ^c média de 2 experimentos,

^d média de 3 experimentos

Para verificar como a superfície onde a con A está adsorvida afeta os resultados da $\Delta\%R_{pro}$ variou-se as condições da mesma. Inicialmente apresentam-se os resultados da adsorção da con A sobre uma superfície de platina sem óxido, em seguida sobre uma superfície de platina modificada com óxido produzido quimicamente e por último sobre a platina modificada com óxido produzido eletroquimicamente. Os três primeiros valores na tabela 3.7 mostram o comportamento da con A sobre essas três superfícies interagindo com o glicogênio: nota-se que os valores mais altos são para a con A quando está ativada e sobre uma superfície de óxido produzida eletroquimicamente. Esse resultado mostra que, a ativação da proteína com os cátions metálicos, são de fato importante para o reconhecimento dos carboidratos e que a proteína reteve a sua capacidade de reconhecimento mesmo adsorvida ao eletrodo. A diferença entre os resultados obtidos sobre o óxido químico e eletroquímico mostra como essas superfícies são diferentes. A resposta da con A dobrou quando foi adsorvida sobre um filme de óxido eletroquímico. Este filme, como discutido em 3.2.6, é mais espesso e acredita-se que o mesmo seja mais rico em grupos OH, influenciando dessa maneira na orientação e conseqüentemente favorecendo também o reconhecimento dos carboidratos.

A similaridade dos resultados obtidos para a con A sobre platina sem óxido e sobre óxido químico ficaram em torno de 35% e existe uma diferença sutil entre os resultados para con A ativada e desativada, mostrando que nessas superfícies a orientação não favorece o reconhecimento do carboidrato nem quando a proteína se encontra na forma ativada.

Esses resultados mostraram que a adsorção da con A sobre uma camada de óxido produzida eletroquimicamente com uma carga de 60 μC , segundo 2.5.2.2, seria a mais indicada para se examinar a capacidade da con A distinguir carboidratos. Deste modo os três últimos valores da tabela 3.7 mostram os resultados da interação da con A com o glicogênio, a glicose e a galactose. Nesse grupo de resultados observa-se muito mais claramente a importância da ativação da proteína tanto na sensibilidade (os valores são mais altos) como na seletividade (não reconheceu a galactose, aliás foi o único valor que $\Delta R_{\text{pro}}\%$ foi mais alto para a con A na forma desativada). Ainda quanto à seletividade, observa-se que a con A foi mais sensível à glicose do que ao glicogênio, contrário ao que é divulgado na literatura. As lectinas possuem afinidade pelos monossacarídeos e pelos seus respectivos oligossacarídeos, com esses últimos é sugerido que existe uma interação múltipla²⁵, portanto maior, entre a proteína-carboidrato obtida com ligações multivalentes e uma extensão da região específica capaz de interações com mais de um monossacarídeo do respectivo oligossacarídeo. Neste trabalho, a con A está adsorvida ou imobilizada na superfície, talvez esse fato, dificulte a interação múltipla, devido à falta de liberdade de rotação da proteína assim como pela alta concentração de moléculas de proteínas próximas umas as outras, dificultando a aproximação de uma molécula grande como a do glicogênio. Isto, portanto, explicaria a contradição com os dados na literatura mencionados acima.

3.5) Caracterização da Adsorção da Lentil

Um estudo menos completo também foi efetuado com uma outra proteína denominada de lentil. A lentil é um lectina com características similares a con A, inclusive específicas aos mesmos carboidratos. Na tabela 3.8 apresentam-se os resultados obtidos com modelagem das curvas experimentais para a adsorção da lentil em várias condições experimentais.

Tabela 3.8: Valores das componentes R_{pro} , C_{pro} , R_{ct} e C_{dl} obtidos para a adsorção da lentil em diversas condições experimentais utilizando o modelo 4.

	Ativação da Proteína	R_{pro} (k Ω)	C_{pro} (μ F)	R_{ct} (k Ω)	C_{dl} (μ F)
Pt	Ativ.	0,516	0,479	0,225	1,58
Pt	Desativ.	0,619	0,474	0,442	2,59
Pt/PtO _q ^a	Ativ.	2,36 \pm 1,24	0,529 \pm 0,072	1,42 \pm 0,894	1,56 \pm 0,083
Pt/PtO _q ^b	Desativ.	6,45 \pm 2,79	0,639 \pm 0,099	4,69 \pm 2,24	1,40 \pm 0,036

Nota: O intervalo de confiança é de 95%

^a média de 4 experimentos, ^b média de 5 experimentos

A presença do óxido também afetou bastante a adsorção da lentil. A comparação entre os resultados para a adsorção sobre uma superfície sem e com óxido mostra que há um aumento na R_{pro} e na R_{ct} de pelo menos 10 vezes para o caso da lentil desativada. A capacitância também refletiu essa modificação, porém de uma forma mais discreta. A C_{pro} aumentou em 1,5 vez e a C_{dl} diminuiu em quase duas vezes, ambos parâmetro em relação a lentil desativada.

A distinção entre a lentil ativada e desativada pôde ser feita com maior facilidade para a superfície modificada com óxido, onde os valores mais elevados para R_{pro} e a R_{ct} são obtidos para a proteína desativada. Na

superfície sem óxido essa distinção é observada para a R_{ct} e C_{dl} , que também são mais elevadas para a proteína desativada.

A componente R_{pro} foi utilizada para o cálculo da espessura da camada de proteína. Para tanto se aplicou essa componente na equação 3.6, do mesmo modo como já foi efetuado para a con A, veja 3.3.2. Esses resultados podem ser vistos na tabela 3.9.

Tabela 3.9: Valor da espessura da camada de lentil obtida utilizando a componente R_{pro} para várias condições experimentais.

superfície	Ativação da proteína	R_{pro} (k Ω) óxido+proteína	d (Å) óxido+proteína	d (Å) óxido	d (Å) proteína
Pt	ativada	0,516	-	-	19,62
Pt	desativada	0,619	-	-	23,51
Pt/PtO _q	ativada	2,36 ^a ±1,24	89,6±29,7	5,45	84,1±29,7
Pt/PtO _q	desativada	6,45 ^b ±2,79	245±106	5,45	239±106

Nota: O intervalo de confiança é de 95%

^a média de 4 experimentos, ^b média de 5 experimentos

De acordo com a discussão apresentada para a con A, os valores obtidos para a espessura sobre a platina sem óxido estavam de acordo com a espessura de uma monocamada de proteína adsorvida lateralmente. Estendendo essa possibilidade para a lentil, e observando os resultados da tabela 3.9, tem-se que essa lectina apresentou valores menores para a espessura. Não se encontrou disponível na literatura as dimensões da lentil, mas sabe-se que o seu peso molecular³⁴ é menor, o que certamente já é uma indicação que suas dimensões também o são. Talvez esse fato também esteja relacionado com a diferença na estrutura, o dímero da lentil é composto por uma cadeia β e uma hélice α , enquanto a con A é apenas formada por cadeias β . Lembrando que as cadeias β são menos compactas¹²¹ do que as hélices α , o que também indicaria que a con A teria dimensões maiores do que a lentil.

As espessuras, relativamente menores para a lentil, contudo apresentaram um comportamento similar ao observado para a con A, estas semelhanças são comentadas a seguir:

- 1) valores menores para a espessura sobre a platina sem óxido, coerente com a formação de uma monocamada;
- 2) formação de multicamadas quando a lectina é adsorvida sobre a platina modificada com óxido químico;
- 3) valores menores de espessura quando a lentil se encontra na forma ativada.

Já foi comentado anteriormente que os valores dados pela componente C_{pro} se referem à conformação das cadeias da proteína e não à espessura da proteína, uma vez que no arranjo dessas cadeias pode ocorrer a separação de cargas negativas/positivas como ocorre em um capacitor. Na tabela 3.10, mostram-se os resultados obtidos para “d” utilizando C_{pro} quando essa componente é aplicada à equação 3.7.

Tabela 3.10: Distância obtida para a conformação das cadeias da lentil obtida utilizando a componente C_{pro} para várias condições experimentais.

superfície	Ativação da proteína	C_{pro} (μF) óxido+proteína	d (Å)
Pt	ativada	0,479	14,0
Pt	desativada	0,474	14,1
Pt/PtO _q	ativada	0,529 ^a ±0,072	12,6±1,85
Pt/PtO _q	desativada	0,639 ^b ±0,099	10,5±1,71

Nota: O intervalo de confiança é de 95%

^a média de 4 experimentos, ^b média de 5 experimentos

Os valores dados na tabela 3.10 são maiores daqueles apresentados nas mesmas condições para a con A, no entanto o comportamento é análogo. Para a lentil também foi observado que os valores dados para a conformação das cadeias são maiores quando a adsorção ocorre sobre uma superfície sem óxido. De modo análogo ao efetuado para a con A associa-se esse fato a diferença na formação de uma monocamada, na superfície sem óxido e multicamadas, numa superfície com óxido. Nesse último caso, as multicamadas ocasionariam um maior compactação da proteína e, portanto, as cadeias estariam mais próximas.

Quando se comparam os valores para a conformação da lentil ativada e desativada sobre uma superfície com óxido, os valores também são maiores para a lentil ativada.

3.5.1) Especificidade da Lentil Adsorvida

Para a lentil também foi verificado se a mesma retinha a sua capacidade de reconhecer carboidratos, e se essa habilidade é alterada conforme se modifica a superfície sobre a qual esta é adsorvida. Na tabela 3.11, são mostrados os resultados do aumento relativo da resistência do carboidrato (R_{car}) em relação a proteína $\Delta\%R_{pro}$, os valores são obtidos com uma expressão análoga a 3.18.

Tabela 3.11: Resultados mostrando o aumento relativo da resistência do carboidrato em relação a lentil $\Delta\%R_{pro}$, para diversas condições experimentais.

Superfície/lentil/carboidrato	$\Delta\%R_{pro}$	
	ativada	desativada
Pt/lentil/glicogênio	28,1 ^a ±5,89	35,7 ^a ±17,7
Pt/PtO _q /lentil/glicogênio	30,1 ^a ±36,6	22,6 ^b ±13,9

Nota: O intervalo de confiança é de 90%

^a média de 3 experimentos ^b média de 5 experimentos

Na tabela 3.11, observa-se que quando a lentil é adsorvida sobre a platina sem óxido, o aumento da $\Delta R_{\text{pro}}\%$, foi maior para a forma desativada, contrario aos resultados obtidos para a con A. O segundo resultado, se refere a lentil adsorvida sobre a platina modificada com óxido químico, nesse caso o comportamento foi o esperado, um aumento relativo maior para a lectina na forma ativada. De forma geral pode-se tecer os seguintes comentários:

- 1) Relativamente a con A, os valores da $\Delta R_{\text{pro}}\%$ foram menores para a lentil nas mesmas condições experimentais, com exceção do resultado da Pt/lentil-desativada.
- 2) Para a lentil, a modificação da superfície com óxido químico, aumentou a sensibilidade para a forma ativada da proteína, provavelmente esse efeito seria amplificado se a superfície fosse modificada com óxido eletroquímico.

3.6) Desdobramentos do trabalho com Lectinas no Laboratório de Eletroquímica

A pesquisa com a adsorção de lectinas sobre eletrodos metálicos se mostrou bastante frutífera uma vez que gerou uma série de questionamentos e estes por sua vez novos trabalhos. Neste contexto apresenta-se um resumo destes trabalhos e a sua contribuição para o entendimento de interfaces metais/moléculas biológicas.

Verificou-se que a urease adsorve espontaneamente em ouro e que retém a sua especificidade à uréia. Inclusive diferentes concentrações de substrato puderam ser detectadas. Nesse trabalho as mudanças ocorridas na interface devido à interação urease/uréia, foram visualizadas melhor em um gráfico de bode-ângulo de fase do que em um gráfico Nyquist. A resistência e a capacitância aumentaram com a concentração da uréia. Esse aumento inesperado na capacitância é um forte indicador de que a conformação estabelecida pela interação enzima/substrato promove uma aproximação entre as cargas da enzima/substrato¹²³.

Um outro trabalho foi o monitoramento por medidas de impedância, da adsorção das proteínas recombinantes CRA-FRA de *Trypanosoma cruzi* sobre eletrodos sólidos e verificar a interação antígeno-anticorpo utilizando o soro de pacientes chagásicos¹²⁴. Os antígenos adsorvem tanto no eletrodo de platina como ouro e nesse trabalho também se verificou um aumento na adsorção do antígeno quando o eletrodo de platina é modificado com um filme de óxido. A resistência também foi o parâmetro que melhor apresentou a interação antígeno/anticorpo, onde se observou um aumento de 72,4% quando o antígeno é exposto a um soro positivo e de 37,2% quando exposto a um soro negativo. Nesses dois trabalhos citados pode-se observar que a molécula biológica mesmo adsorvida retém a sua especificidade, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de biosensores.

O conhecimento da carga do eletrodo sobre o qual a molécula biológica é adsorvida tem um papel muito importante para a análise da orientação que molécula assume quando adsorve. Com o intuito de aprimorar as discussões

apresentadas com as lectinas se iniciou o trabalho para a determinação da carga do eletrodo de platina sem óxido¹²². Resultados já foram obtidos para o eletrodo de platina em uma solução de NaCl 1,5 mM. A continuidade desse trabalho será no sentido de se determinar a carga do eletrodo de platina modificado com um filme de óxido em uma solução de ferri-ferrocianeto de potássio.

4) Conclusões

4.1) Camada de Óxido de Platina

O filme de óxido produzido neste trabalho foi bastante fino, em torno de 6 Å, apesar da carga ter sido aumentada em 20 vezes a espessura aumentou muito pouco, mostrando que grande parte da carga está envolvida na reação de evolução de oxigênio e não propriamente na formação do filme de óxido.

A camada de óxido pôde ser descrita mais adequadamente por um modelo em que a mesma é considerada contínua e isolante sobre o eletrodo metálico (modelo 4). Entre os parâmetros extraídos desse modelo, a capacitância do óxido, (C_{ox}), foi o que melhor caracterizou a camada, possibilitando o cálculo da espessura da mesma. Com base nesse modelo, verificou-se que processo de transferência de elétrons pôde ser tratado de acordo com o proposto por Damjanovic onde este prevê o tunelamento dos

elétrons através de filmes finos de óxido. A resistência de transferência de elétrons (R_{ct}), neste caso, é relacionada à carga utilizada para a formação da camada de óxido.

O óxido formado quimicamente não apresenta as mesmas características do óxido formado eletroquimicamente. Supõe-se que esse fato esteja relacionado tanto com a quantidade de óxido, menor para o químico, como também à sua própria organização sobre a superfície.

A constante dielétrica (ϵ) do óxido, utilizada no cálculo da espessura da camada, foi estabelecida em 15, com base na variação dos valores encontrados na literatura para outros óxidos de metais de transição.

4.2) Adsorção de Proteína

As lectinas estudadas adsorvem no eletrodo de platina e bloqueiam a reação de transferência de elétrons do ferri-ferrocianeto de potássio, isto é, diminuem a constante heterogênea de velocidade, k^0 .

Tanto a adsorção da con A como a da lentil são bastante afetadas pela modificação da superfície de platina com um filme de óxido. Esse efeito é verificado tanto na voltametria cíclica (diminuição dos picos anódicos e catódicos do ferri-ferrocianeto de potássio) como na espectroscopia de impedância (aumento da componente resistiva). Ambas as técnicas registraram o bloqueio da superfície devido à presença da proteína adsorvida na mesma. A quantidade de óxido também influi na adsorção de proteína, isto é, quanto mais óxido mais e/ou melhor, a proteína adsorve.

O modelo para descrever a proteína é visto como uma camada contínua que, no entanto, não isola completamente a superfície. A resistência devido à presença da proteína (R_{pro}) está em série com a resistência do óxido (R_{ox}) e o mesmo ocorre para a capacitância da proteína (C_{pro}) que também se encontra em série com a capacitância do óxido (C_{ox}).

O melhor parâmetro para quantificar a proteína adsorvida foi a resistência da proteína (R_{pro}). A adsorção da con A sobre a platina sem óxido,

forma uma monocamada com espessura de 28 Å com orientação paralela à superfície.

A adsorção da con A sobre a platina modificada com óxido de platina resultou em uma camada com espessura de 108 Å para a forma ativada e 277 Å na forma desativada. Os resultados obtidos para a espessura da camada de con A sobre um filme de óxido eletroquímico foram de 156 Å e 318 Å respectivamente para a forma ativada e desativada. Nota-se que se obtém valores mais elevados para a espessura da camada de proteína quando o óxido é produzido eletroquimicamente, o que se atribuiu à maior quantidade de óxido que de acordo com o que já foi comentado afeta a adsorção.

Nesse momento pode-se efetuar duas comparações. A primeira existe uma grande diferença entre as espessuras obtidas sobre uma superfície sem e com óxido. Esse fato foi associado respectivamente à formação de mono e multicamadas. A segunda comparação, em uma superfície sem óxido não se observa uma diferenciação significativa entre a forma ativada e desativada da proteína. Já em uma superfície com óxido, se observa essa diferenciação, com valores maiores de espessura para a forma desativada.

As espessuras encontradas para con A nas diversas condições experimentais são maiores do que as encontradas para a lentil. Relacionou-se esse fato à estrutura da lentil, diferente da Con A, ser formada também por hélices- α e a um peso molecular menor. Deste modo, tem-se para uma superfície sem óxido a espessura em torno de 20 Å. Novamente não se observa uma diferença significativa entre a forma ativada e desativada da proteína. Para uma superfície com óxido químico a espessura obtida para a lentil ativada foi de 84 Å e para a desativada de 239 Å. Esses resultados mostram que a lentil apresentou um comportamento semelhante a con A, quando submetida às mesmas condições experimentais.

A capacitância da proteína (C_{pro}) está relacionada à conformação das cadeias da proteína, isto é, à distância entre as cadeias. Os valores para a conformação da con A sobre uma superfície sem óxido são maiores do que aquelas obtidas em uma superfície com óxido. Associa-se esse resultado à formação de multicamadas sobre a superfície com óxido que ocasionaria uma conformação mais compacta da proteína sobre a superfície e conseqüentemente também uma distância menor entre as cadeias.

Observou-se que para uma superfície com óxido, a proteína na forma ativada, apresenta valores sutilmente maiores, o que se atribuiu à presença dos cátions metálicos que conferem uma maior estabilidade e integridade à molécula.

As duas proteínas novamente apresentaram um comportamento semelhante no que diz respeito à conformação da proteína, apenas com valores levemente mais altos para a lentil.

4.3) Sensibilidade da Proteína Frente aos Carboidratos

O melhor parâmetro para informar o grau de interação entre a proteína e o carboidrato foi a resistência. Essa informação foi obtida verificando-se o aumento relativo ($\Delta R_{\text{pro}}\%$) da resistência do carboidrato (R_{car}) em relação a resistência da proteína e óxido (R_{pro}). Lembrando que (R_{car}) não é apenas a resistência do carboidrato, mas também da proteína e do óxido, se presente. O mesmo ocorre para (R_{pro}) que é a resistência da proteína e do óxido quando este está presente.

Na superfície com óxido eletroquímico, verificou-se a sensibilidade da con A frente a glicose, glicogênio e galactose. A proteína na forma ativada se mostrou mais sensível a glicose (açúcar para o qual é específica) e menos sensível a galactose (açúcar para a qual não é específica). Esse resultado é invertido quando a proteína se encontra na forma desativada. Mostrando, portanto que a ativação é importante tanto na sensibilidade como na seletividade da proteína. Complementando quanto à seletividade, esperava-se que a sensibilidade da proteína frente ao glicogênio fosse maior do que com a glicose, uma vez que existe nesses casos uma interação múltipla com esse polissacarídeo. No entanto, não foi esse o resultado. Uma possível explicação estaria no fato da vizinhança da proteína adsorvida estar ocupada por outras moléculas de proteína dificultando a interação com uma molécula maior de açúcar e dificultando também a interação múltipla.

A sensibilidade da con A frente ao glicogênio foi verificada em uma superfície sem óxido, com óxido químico e eletroquímico. O melhor resultado

foi para a proteína ativada sobre a última superfície citada. Surpreende o fato da superfície com óxido químico não ter provocado nenhuma modificação no resultado, mostrando que a quantidade e a estrutura do filme de óxido influenciam a sensibilidade da proteína. Para a forma desativada, nessas mesmas condições experimentais não se observou nenhuma modificação na sensibilidade.

A comparação dos resultados obtidos para as duas proteínas nas mesmas condições experimentais, mostra que a forma ativada da con A apresenta maior sensibilidade ao glicogênio do que a lentil. Reforçando dados na literatura que indicam diferenças no grau de afinidade por um mesmo carboidrato apesar de serem específicas aos mesmos carboidratos.

5) Perspectivas Futuras

Os resultados obtidos com o estudo impedimétrico do sistema platina/lectina trouxeram uma série de informações quanto à adsorção das lectinas. No entanto seria importante confrontar alguns resultados utilizando-se outras técnicas. Por exemplo, utilizar a elipsometria e/ou a microscopia de força atômica para confirmar as espessuras encontradas para a camada de proteína e também se a ativação da proteína altera a conformação da mesma.

A adsorção dessas lectinas foi observada em platina, porém também seria importante verificar se esse comportamento é semelhante para outros metais assim como sobre os seus óxidos.

Confirmar com auxílio da microscopia de força atômica, por exemplo, a orientação da proteína nas superfícies estudadas. Verificar se realmente existem diferenças na orientação quando a adsorção ocorre sobre a platina e sobre a platina modificada com filme de óxido.

Aprofundar a discussão e as conseqüentes conclusões quanto à presença dos metais de ativação tanto na espessura como na conformação na proteína.

Compreender melhor a interação entre o filme de óxido e a proteína e entender porque este favorece a adsorção das lectinas.

Determinar a carga do eletrodo com e sem óxido para auxiliar a interpretação dos resultados quanto à orientação da proteína. Esse tema foi abordado no trabalho de iniciação científica de Rogério T. Ribeiro¹²².

Verificar se a con A quando adsorvida sobre a platina consegue diferenciar entre a glicose e a galactose e assim também reforçar as premissas quanto à diferenciação na orientação da proteína quando a proteína é adsorvida sobre a platina modificada com filme de óxido. Esse trabalho também foi tema do trabalho de iniciação científica da aluna Sibeles R. de Oliveira¹²³.

Verificar a importância da camada de óxido na adsorção de outras proteínas. Essa possibilidade foi verificada para proteínas recombinantes tipo CRA-FRA, trabalho de iniciação científica desenvolvido por Alziana M. C. Pedrosa¹²⁴.

Estudar e concluir os resultados já obtidos com a cinética da adsorção da con A, onde numa análise prévia já se verificou uma cinética diferenciada para a condição em que a adsorção se processa sobre uma superfície com e sem filme de óxido. Nesses resultados também se diferencia claramente a condição em que a proteína está ativada e desativada.

6) Referências Bibliográficas

[¹] Nakanishi, K., Sakiyama, T. e Imamura, K., *J. Biosci. Bioeng.*, **91** (2001) 233.

[²] Thull, R., *Biomol. Eng.*, **43** (2002) 43.

[³] Combes, C., e Rey, C., *Biomaterials*, **23** (2002) 2817.

[⁴] Milleding, P., Carlen, A., Wennerberg, A. e Karlsson, S., *Biomaterials*, **22** (2001) 2445.

[⁵] Caric, M.D., Milanovic, S.D., Krstic, D.M. e Tekic, M.N., *J. Membr. Sci.*, **165** (2000) 83.

[⁶] Whelan, R.J, Wohland, T., Neumann, L., Huang, B., Kobilka, B.K. e Zare, R.N., *Anal. Chem.*, **74** (2002) 4570.

[⁷] Zayats, M., Raitman, O.A, Chegel, V.I., Kharitonov, A.B., Willner, I., *Anal. Chem.*, **74** (2002) 4763.

[⁸] Pradier, C.M., Costa, D., Rubio, C., Compere, C. Marcus, P., *Surf.Interface Anal.*, **34** (2002) 50

[⁹] Johansson, J., Yasuda, H.K., Bajpai, R.K., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **70-2** (1998) 747.

- [¹⁰] Rihova, B., *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **42** (2000) 65
- [¹¹] Sela, J., Gross, U.M., Kohavi, D., Shani, J., Dean, D.D., Boyan, B.D., Schwartz, Z., *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, **11** (2000) 423.
- [¹²] Bhaduri, V e Das, K.P., *J. Dispersion Sci. Technol.*, **20** (1999) 1097
- [¹³] Norde, W. e Favier, J.P., *Colloids Surf.*, **64** (1992) 87
- [¹⁴] Wahlgren, M. e Arnebrant, T., *TIBTECH*, **9** (1991) 201
- [¹⁵] Roscoe, S.G. e Fuller, K.L., *J. Colloid Interface Sci.*, **152** (1992) 441.
- [¹⁶] Malmsten, M., *J. Colloid Interf. Sci.*, **207** (1998) 207
- [¹⁷] Ramsden, J.J., *Chem. Soc. Reviews*, (1995) 73
- [¹⁸]. Norde, W., *Adv. Colloid Interf. Sci*, **25** (1986) 267
- [¹⁹] Ivarsson, B.A., Hegg, P.O., Lundström, K. I. e Jönsson, U., *Colloids and Surfaces*, **13** (1985) 169
- [²⁰] Ball, A. e Jones, R.A.L., *Langmuir*, **11** (1995) 3542.
- [²¹] Moreira, R.A., Cavada, B.S., Oliveira, J.T.A. e Ainouz, I.L., *Proceedings of the First Brazilian Congress on Proteins*, (1990) 71
- [²²] Sharon, N. e Lis, H., *Science*, **177** (1972) 949
- [²³] Stillmark, H., In: Kobert, R., Ed., *Arbeiten des Pharmakologischen Institutes zu Dorpat*, **3** (1889).

-
- [²⁴] Kennedy, J.F., Palva, P.M.G., Corella, M.T.S., Cavalcanti, M.S.M. e Coelho, L.C.B.B., *Carbohydr. Polymers*, **26** (1995) 219.
- [²⁵] Lis, V e Sharon, N., *Chem. Rev.*, **98** (1998) 637.
- [²⁶] Edelman, V. e Wang, J.L., *J. Biol. Chem.*, **253** (1978) 3016
- [²⁷] Summer, J.B. e Howell, S.F., *J. Bacteriol.*, **32** (1936) 227
- [²⁸] McKenzie, G.H. e Sawyer, W.H., *J. Biol. Chem.*, **248**, (1973) 549
- [²⁹] Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J. e Wyns, L., *Biochim. Biophys. Acta*, **1383** (1998) 9
- [³⁰] Landsteiner, K. e Raubitschek, H., *Zentrabl. Bakteriolog. Parasitenk. Infektionskr.*, **45** (1908) 660.
- [³¹] Young, N. M., Leon, M.A. e Takahashi, T., *J. Biol. Chem.*, **246** (1971) 1596
- [³²] Bourne, Y., Roussel, A., Frey, M., Rougé, P., Fontecilla-Camps, J-C. e Cambillau, C., *Proteins: Struct. Functions. Gen.*, **8** (1990) 365.
- [³³] Marcos, M.J., Chehín, R., Arrondo, J.L., Zhadan, G.G., Villar, E. e Shnyrov, V.L., *FEBS Letters*, **443** (1999) 192.
- [³⁴] Tichá, M., Entlicher, G., Kostir, J.V. e Kocourek, J., *Biochim. Biophys. Acta*, **221** (1970) 282
- [³⁵] Weis, W.I. e Drickamer, K., *Annu. Rev. Biochem.*, **65** (1996) 441
- [³⁶] Sharma, V. e Surolia, A., *J.Mol. Biol.* **267** (1997) 433

-
- [³⁷] Revel, D.J., Knight, J.R., Blyth, D.J., Haines, A H. e Russel, D.A., *Langmuir*, **14** (1998) 4517
- [³⁸] Saleemuddin, M. e Husain, Q., *Enzyme Microb. Technol.*, **13** (1991) 290.
- [³⁹] Sharon, N. e Lis, H., *FASEB J.*, **4** (1990) 3198
- [⁴⁰] Glavanovich, V. e Carr, P.W., *Anal. Chem.*, **66** (1994) 2584.
- [⁴¹] Gestwicki, J.E, Strong, L.E., Cairo, C.W., Bohem, F.J., Kiessling, L.L., *Chem. Biol.*, **9** (2002) 163.
- [⁴²] Wang, H., Ng, T.B., Ooi, E.C.V.E.C. e Liu, W.K., *Intern. J. Biochem. Cell Biol.*, **32** (2000) 365.
- [⁴³] Mattsson, G., Carlsson, P.O, Olausson, K., Jansson, L., *Pancreatology*, **2** (2002) 155.
- [⁴⁴] Kim, B., Cha, G.S. e Meyerhoff, M.E., *Anal. Chem.*, **62** (1990) 2663
- [⁴⁵] Koopmann, J., Hocke, V. e Gabius, H.-J., *Biol. Chem. Hope-Seyler*, **374** (1993) 1029
- [⁴⁶] Yongli, C., Xiufang, Z., Yandao, G., Nanming, Z., Tingying, Z. e Xinqi, S., *J. Colloid Interf. Sci.*, **214** (1999) 38
- [⁴⁷] Topoglidis, E., Cass, A.E.G., O'Regan, B., Durrant, J.R., *J. Electroanal.Chem.*, **517** (2001) 20
- [⁴⁸] Houen, G. e Koch, C., *J. Immunol. Methods*, **200** (1997) 99
- [⁴⁹] Conway, B.E, *Progr.Surf.Sci.*, **16** (1984) 1

[⁵⁰] Geest, M.E., Dangerfield, N.J., Harrington, D.A., *J. Electroanal. Chem.*, **420** (1997) 89

[⁵¹] Jerkiewicz, G. and Borodzinski, J.J., *Langmuir*, **9** (1993) 2202

[⁵²] Dall'Antonia, L.H., Tremiliosi-Filho, G., Jerkiewicz, G., *J. Electroanal. Chem.*, **502** (2001) 72

[⁵³] Morrison, S.R., *Electrochemistry at Semiconductor and Oxidized Metal Electrodes*, Plenum Press, New York, 1984 2^a edição. 299-333p.

[⁵⁴] Greef, R. et al., (Ed.), *Instrumental Methods in Electrochemistry*, Ellis Horwood, New York, 1990. 251-282p.

[⁵⁵] Bard, V. e Faulkner, L.R., *Electrochemical Methods – Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, New York, 1980. 718p.

[⁵⁶] Bockris, J.O'M. e Reddy, A.K.N., *Modern Electrochemistry: An Introduction to an Interdisciplinary Area*, v.2, A Plenum/Rosetta edition, New York, 1973. 623-841p.

[⁵⁷] Cass, A.E.G. (Ed.), *Biosensors: A practical Approach*, Oxford University Press, Londres, 1990. 125-152p.

[⁵⁸] Gabrielli, C., *Identification of Electrochemical Processes by Frequency Response Analysis*. Technical Report Number 004/83. 1984.120p.

[⁵⁹] Macdonald, J.R. (Ed.). *Impedance Spectroscopy: Emphasizing Solid Materials and systems*. New York, John Wiley & Sons, 1987. 346p.

[⁶⁰] Boukamp, B.A., *Solid State Ionics*, **18-19** (1986) 136

[⁶¹] Boukamp, B.A., *Solid State Ionics*, **20** (1986) 31

-
- [⁶²] Boukamp; B.A., *Equivalent Circuit Users Manual*; University of Twentw; The Netherlands,1989. 38p
- [⁶³] Prasad, B. e Lal, R., *Meas. Sci. Technol.*, **10** (1999) 1097
- [⁶⁴] Schyberg, C., Plossu, C., Barbier, D., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Maupas, H., Souteyrand, E., Charles, M.-H., Delair e T., Mandrand, B., *Sens. Actuators B*, **26** (1995) 457
- [⁶⁵] Omanovic, S. e Roscoe, S. G., *Langmuir*, **15** (1999) 8315.
- [⁶⁶] Stelzle, M., Weissmüller, G. e Sackmann, E., *J. Phys. Chem.*, **97** (1993) 2974
- [⁶⁷] McNeil, C.J., Athey, D., Ball, M., Ho, W.O., Krause, S., Armstrong, R.D., Des Wright, J. e Rawson, K., *Anal. Chem.*, **67** (1995) 3928
- [⁶⁸] Sargent,V. e Sadik,V, *Electrochim. Acta*, **44** (1999) 4667.
- [⁶⁹] Zhou, A., Xie, Q., Wu, Y., Cai, Y., Nie, L. e Yao, S., *J. Colloid Interface Sci.*, **229** (2000) 12
- [⁷⁰] Caprani, V e Lacour, F., *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **25** (1991) 241
- [⁷¹] Mullet, M., Fievet, P., Bouhallab, S., Reggiani, V e Pagetti, J., *J. Membr. Sci.*, **128** (1997) 243
- [⁷²] Berggren, C. e Johansson, G., *Anal. Chem.*, **69** (1997) 3651
- [⁷³] Pai, C.M., Jacobs, H., Bae, Y.H. e Kim, S.W., *Biotechnol. Bioengineering*, **41** (1993) 957.

-
- [⁷⁴] Salahuddin, A., Begum, R. e Averill, B. K., *Biochem. J.*, **220** (1984) 639.
- [⁷⁵] Poretz, R.D. e Goldstein, I.J., *Immunology*, **14** (1968) 165.
- [⁷⁶] Conway, B.E., Angerstein-Kozłowska, H., Sharp, W.B.A. e Criddle, E.E., *Anal. Chem.*, **45** (1973) 1333
- [⁷⁷] Nicholson, R.S., *Anal. Chem.*, **37** (1965) 1351
- [⁷⁸] American Institute of Physics Handbook – 2 ed. New York: McGraw-Hill, c 1963.
- [⁷⁹] Mertens, S.F.L. e Temmerman, E., *J. Colloid Interface Sci.*, **227** (2000) 517
- [⁸⁰] Hubrecht, J., Embrechts, M. e Bogaerts, W., *Electrochim. Acta*, **38** (1993) 1867
- [⁸¹] Ward, A., Damjanovic, A., Gray, E. e O’Jea, M., *J. Electrochem. Soc.*, **123** (1976) 1599
- [⁸²] Tremiliosi-Filho, G., Jerkiewicz, G. e Conway, B.E., *Langmuir*, **8** (1992) 658
- [⁸³] Angerstein-Kolzłowska, H., in *Comprehensive Treatise of Electrochemistry*, vol. 9, Yeager, E., Bockris, J.O’M., Conway, B.E. e Sarangapani, S. (eds.), Plenum Press, New York, 1984, pp15-59
- [⁸⁴] Shibata, S., *Electrochim. Acta*, **22** (1977) 175
- [⁸⁵] Abe, Y., Kawamura, M. e Sasaki, K., *Japan J. Applied Physics*, **38** (1999) 2092

-
- [⁸⁶] Neff, H., Henkel, S., Hartmannsgruber, E., Stenbeis, E., Michalke, W., Steenbeck, V. e Schmidt, H.G., *J. Applied Physics*, **79** (1996) 7672
- [⁸⁷] Damjanovic, A., Birss, V.I. e Boudreaux, D.S., *J. Electrochem. Soc.*, **138** (1991) 2549
- [⁸⁸] Damjanovic, A. e Hudson, P.G., *J. Electrochem. Soc.*, **135** (1988) 2269
- [⁸⁹] Damjanovic, A., *J. Electrochem. Soc.*, **138** (1991) 2315
- [⁹⁰] Cohen, Y., Levi, S., Rubin, S. e Willner, I., *J. Electroanal. Chem.*, **417** (1996) 65
- [⁹¹] Diniz, F.B., Ueta, R.R., Pedrosa, A.M. da C., Areias, M. da C., Pereira, V.R.A., Silva, E.D., Silva Jr., J.G., Ferreira, A.G.P. e Gomes, Y., *Biosens. Bioelectron.*, trabalho aceito.
- [⁹²] Omanovic, S. e Roscoe, S.G., *J. Colloid Interf. Sci.*, **227** (2000) 452
- [⁹³] Stelzle, M., Weissmüller, G. e Sackmann, E., *J. Phys. Chem.*, **97** (1993) 2974
- [⁹⁴] Jackson, D.R., Omanovic, S. e Roscoe, S.G., *Langmuir*, **16** (2000) 5449
- [⁹⁵] Cabilio, N.R., Omanovic, S. e Roscoe, S. G., *Langmuir*, **16** (2000) 8480
- [⁹⁶] Damjanovic, A. Birss, V e Boudreaux; D.S., *J. Electrochem. Soc.*, **138** (1991) 2549
- [⁹⁷] Lundström, I. , *Phy. Scr.*, **T4** (1983) 5
- [⁹⁸] Gutmann, F., Keyzer, H., *Modern Bioelectrochemistry*, New York, Plenum Press, 1985. p.1-43

-
- [⁹⁹] De Bono, R.F., Krull, U.J., Rounaghi, Gh., *ACS Symp. Series*, **511** (1992) 121
- [¹⁰⁰] Revell, D.J., Knight, J.R., Blyth, D.J., Haines, A.H. e Russel, D.A., *Langmuir*, **14** (1998) 4517
- [¹⁰¹] Waner, M.J., Gilchrist, M., Schindler, M. e Dantus, M., *J. Phys. Chem. B*, **102** (1998) 1649
- [¹⁰²] Afshar-Rad, T., Bailey, A.I., Lucknam, P.F., MacNaughtan, W. e Chapman, D., *Colloids Surf.*, **31** (1988) 125
- [¹⁰³] Claesson, P.M., Blomberg, E., Fröberg, J.C., Nylander, T. e Arnebrant, T., *Adv. Colloid Interface Sci.*, **57** (1995) 161
- [¹⁰⁴] Luckham, P.F. e Hartley, P.G., *Adv. Colloid Interface Sci.*, **49** (1994) 341
- [¹⁰⁵] Anzai, J., Kobayashi, Y. e Nakamura, N., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, (1998) 461
- [¹⁰⁶] Ebara, Y. e Okahata, Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **116** (1994) 11209
- [¹⁰⁷] Bataillard, P., Gardies, F., Jaffrezic-Renaud, N., Martelet, C., Colin, B. e Mandrand, B., *Anal. Chem.*, **60** (1988) 2374
- [¹⁰⁸] Taira, H., Nakano, K., Maeda, M. e Takagi, M., *Anal. Sci.*, **9** (1993) 199
- [¹⁰⁹] Souteyrand, E., Martin, J.R. e Martelet, C., *Sens. Actuators B*, **20** (1994) 63
- [¹¹⁰] Knichel, M., Heiduschka, P., Beck, W., Jung, G., Göpel, W., *Sens. Actuators B*, **28** (1995) 85

-
- [¹¹¹] Ivarsson, B.A., Hegg, P.-O., Lundström, K.I. e Jönsson, U., *Colloids Surf.*, **13** (1985) 169
- [¹¹²] Lacour, F., Torresi, R., Gabrielli, C. e Caprani, A., *Colloids Surf. B: Biointerfaces*; **1** (1993) 251
- [¹¹³] Bernabeu, P., Tamisier, L, Cesare, A. e Caprani, A., *Electrochim. Acta*, **33** (1988) 1129
- [¹¹⁴] Gebbert, A., Alvarez-Icaza, M., Stöcklein, W. e Schmid, R.D., *Anal. Chem.*, **64** (1992) 997
- [¹¹⁵] Skládal, P., *Electroanalysis*, **9** (1997) 737
- [¹¹⁶] Savitri, D. e Mitra, C.K., *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **48** (1999) 163
- [¹¹⁷] Berney, H., Alderman, J., Lane, W. e Collins, J.K., *Sens. Actuators B*, **44** (1997) 578
- [¹¹⁸] Xie, Q., Zhang, Y., Xu, M., Li, Z., Yuan, Y. e Yao, S., *J. Electroanal. Chem.*, **478** (1999) 1
- [¹¹⁹] Maupas, H., Saby, C., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N., Soldatkin, A.P., Charles, M.-H., Delair, T. e Mandrand, B., *J. Electroanal. Chem.*, **406** (1996) 53
- [¹²⁰] Maupas, H., Soldatkin, A.P. Martelet, C. Jaffrezic-Renault, N. e Mandrand, B., *J. Electroanal. Chem.*, **421** (1997) 165.
- [¹²¹] Stryer, L., *Bioquímica*, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1992, 3ª edição. 1-427p.

[¹²²] Ribeiro, R.T. Determinação da carga do eletrodo de platina em solução de NaCl. Recife:UFPE, 2002. 39f (monografia de graduação), Diniz, F.B. (orientador).

[¹²³] Oliveira, S.R. Análise Impedimétrica da Imobilização de Proteína e Enzimas Sobre Eletrodos Metálicos para o Desenvolvimento de Biosensores. Recife:UFPE, 2002. 44f. (monografia de graduação), Diniz, F.B. (orientador).

[¹²⁴] Pedrosa, M.C. Análise Impedimétrica da Imobilização de Proteína e Enzimas Sobre Eletrodos Metálicos para o Desenvolvimento de Biosensores. Recife: UfPE, 2002. 38f (monografia de graduação), Diniz, F.B. (orientador).