

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS



Ciências
ULisboa

**(Bio)funcionalização de superfícies nanoestruturadas para
eletrocatalise e desenvolvimento de biossensores
eletroquímicos e óticos**

Doutoramento em Química
Química Física

Inês Bela Borralho Almeida

Tese orientada por:
Doutora Ana Pimenta da Gama Silveira Viana

Documento especialmente elaborado para a obtenção do grau de doutor

2016

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS



Ciências
ULisboa

(Bio)funcionalização de superfícies nanoestruturadas para eletrocatalise e desenvolvimento de biossensores eletroquímicos e óticos

Doutoramento em Química
Química Física

Inês Bela Borralho Almeida

Tese orientada por:
Doutora Ana Pimenta da Gama Silveira Viana

Júri:

Presidente:

Doutora Ana Maria Jara Ponces da Costa Freire

Vogais:

Doutor Christopher Michael Ashton Brett

Doutora Maria Cristina Fialho Oliveira

Doutora Maria Gabriela Machado de Almeida

Doutor António Carlos Henriques Cascalheira

Doutor Jorge Manuel Palma Correia

Doutora Ana Pimenta da Gama Silveira Viana

Documento especialmente elaborado para a obtenção do grau de doutor

Agradecimentos

Agradeço, de uma forma especial, à minha orientadora, Professora Doutora Ana Viana a sua orientação e apoio ao longo destes anos e pelo rigor e sentido de responsabilidade exigidos que contribuíram para o meu desenvolvimento tanto profissional como pessoal.

Obrigada à Professora Luísa Abrantes, que embora já não se encontre entre nós, em muito contribuiu para o meu crescimento científico.

Ao Doutor Jorge Correia, Doutor Rodrigo Almeida e à Professora Maria de Deus Carvalho pela constante colaboração e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Professor Gang Jin, Doutor Yu Niu, Wei Liu e Tengfei Kang, a minha gratidão pela simpatia com que me receberam e pelas condições de acolhimento durante a minha estadia em Beijing.

A todo o grupo de Eletroquímica Interfacial (atuais e ex-elementos) e ao grupo de Biofísica Molecular, do Centro de Química e Bioquímica em especial ao Joaquim Marquês, pela enorme ajuda prestada e pela boa convivência que sempre esteve presente.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo apoio financeiro concedido (SFRH/BD/70673/2010).

Um especial agradecimento aos meus amigos de sempre, José Diogo, Jacinta e Cláudia por todos os momentos passados, pela compreensão e incentivo permanente.

À família Dias, por todo o apoio e carinho demonstrado desde do primeiro minuto;

Ao meu irmão, Pedro, por estar sempre disponível a ouvir-me e por estar sempre do meu lado e a toda a minha família, em especial às minhas tias e avôs que tiveram e tem sempre uma palavra de conforto.

Ao Diogo, por todo o amor, carinho, compreensão e apoio incondicional ao longo deste último ano, Di esta tese também é tua.

Por fim agradeço aos meus pais, José e Albertina, pelo amor e amizade que sempre encontrei, por sempre acreditarem em mim. Obrigada aos dois pelo amor e carinho.

Resumo

A descoberta de novos métodos, simples e robustos, de imobilização de biomoléculas conjugadas com nanomateriais em superfícies metálicas, surge devido à necessidade de melhorar o desempenho das interfaces biossensoras atualmente existentes, tornando-as mais estáveis, versáteis e eficientes para a detecção de compostos alvo.

Na presente tese foram exploradas metodologias diretas, de um só passo reacional, para imobilização de biomoléculas em superfícies de ouro, baseadas na formação *in situ* de ditiocarbamatos, com o intuito de utilizá-las como plataformas para biossensores. Para tal estudou-se a reatividade entre o dissulfureto de carbono e grupos amina presentes em moléculas pequenas (epinefrina), em aminoácidos (triptofano) e em enzimas (glucose oxidase e lacase). Estas reações foram efectuadas na presença de nanopartículas com vários tamanhos médios: Pt (3 nm), Au (5, 20 nm) e Fe₃O₄ (20 e 40 nm), em meio orgânico e aquoso. A funcionalização das nanopartículas e a imobilização estável dos (bio)compostos estudados na superfície de ouro, foi confirmada por ensaios eletroquímicos (voltametria cíclica, cronoamperometria), por espectroscopia fotoeletrónica de raios-X e microscopia de força atómica. A atividade catalítica dos eléctrodos nanoestruturados modificados com glucose oxidase e lacase foi avaliada, electroquimicamente, para a oxidação da glucose e do ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).

O dissulfureto de carbono foi igualmente utilizado para ligar nanopartículas de magnetite (20 e 40 nm), em superfícies de ouro, funcionalizadas com metaloporfirinas de Fe e Co que possuem grupos funcionais específicos com afinidade para superfícies de óxidos metálicos. Esta modificação simples e versátil permitiu estudar com sucesso a reação de redução de oxigénio (ORR), em meio ácido. Desta forma, provar demonstrou-se a estabilidade das nanopartículas de magnetite conjugadas com metaloporfirinas em soluções ácidas, revelando o seu potencial como uma alternativa à utilização de catalisadores à base de platina para a ORR. A funcionalização das nanopartículas foi demonstrada por espectroscopia de UV – visível enquanto os ensaios com o eléctrodo rotativo de disco e anel, revelaram a existência de dois

mecanismos diferentes para a ORR, via 2 ou 4 elétrons, dependendo do centro metálico, Co ou Fe, das metaloporfirinas.

A metodologia de modificação de superfícies nanoestruturadas de ouro com base na formação *in situ* de ditiocarbamatos (CS₂ e proteína A) foi também testada na preparação de interfaces para imunossensores. Ficou demonstrado, por ressonância de plasmão de superfície, elipsometria convencional e de imagem em modo de reflexão interna total, que esta interface apresenta capacidade para detetar fenómenos de bioespecificidade (Imunoglobulina G - Anti-Imunoglobina G), com a vantagem de inibir a adsorção de proteínas ligadas inespecificamente. Foi ainda apresentada uma abordagem completamente inovadora de preparação de biointerfaces muito sensíveis, baseadas na deposição direta de bicamadas lipídicas suportadas em ouro. Para este propósito depositaram-se vesículas que contêm misturas de dois lípidos comuns (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina e colesterol) e um alcanotiol, que provaram formar bicamadas robustas, com elevada capacidade para inibir a adsorção não específica de proteínas, permitindo ainda o acoplamento covalente de anticorpos. Esta nova plataforma apresenta-se como uma alternativa com elevado potencial à utilização de tiolipídios tipicamente usados no desenvolvimento de plataformas imunossensoras.

Palavras-chave

Dissulfureto de carbono; ditiocarbamato; nanopartículas; biossensores; reação de redução de oxigénio.

Abstract

The research for new, simple and robust methods to immobilize biomolecules conjugated with nanomaterials on metal surfaces arises from the need to improve the performance of the current biosensing interfaces. The purpose is to make these biosensing interfaces more stable, versatile and efficient for the detection of target compounds.

In this thesis, simple and one-step methodologies were explored for the immobilization of biomolecules on gold surfaces, based on the *in situ* formation of dithiocarbamates, in order to use them as biosensors. The reactivity between carbon disulfide and amine groups present in small molecules (epinephrine), aminoacids (tryptophan) and enzymes (glucose oxidase and laccase) was studied. These reactions were carried out in the presence of nanoparticles of various average sizes, Pt (3 nm), Au (5, 20 nm) and Fe₃O₄ (20, 40 nm), in organic and aqueous media. The functionalization of nanoparticles and the stable immobilization of the (bio)compounds studied on the gold surface was confirmed by electrochemical techniques (cyclic voltammetry, chronoamperometry), X-rays photoelectron spectroscopy and atomic force microscopy. The catalytic activity of the modified nanostructured electrode with glucose oxidase and laccase was electrochemically evaluated towards glucose and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), respectively.

Carbon disulfide was also used to attach magnetite nanoparticles (20 and 40 nm) functionalized with metalloporphyrins (Fe and Co) containing specific groups with affinity for metal oxide surfaces, to gold electrodes. This simple and versatile modification allowed to study successfully the oxygen reduction reaction (ORR), in acidic medium. Thus, the stability of the metalloporphyrin/Fe₃O₄ nanoparticles conjugate in acidic solution was confirmed, showing its potential as an alternative to platinum-based catalysts for ORR. The functionalization of the magnetite nanoparticles was confirmed by UV – visible spectroscopy, while the rotating ring-disk electrode assays revealed the existence of two different mechanisms for ORR via 2 or 4 electrons transfer, depending on the Co or Fe centre of metalloporphyrins.

The methodology to modify the nanostructured gold surfaces based on the *in situ* formation of dithiocarbamates (CS₂ and protein A) was also tested for preparing immunosensing interfaces. It was demonstrated by surface plasmon resonance, conventional and total internal reflection imaging ellipsometry, that the biointerface has the ability to detect biospecific phenomena (Immunoglobulin G- Anti-Immunoglobulin G), with the advantage of inhibiting the non-specific adsorption of proteins. A completely novel approach to prepare sensitive biointerfaces, based on the direct deposition of lipid bilayers supported on gold is also presented. For this purpose, vesicles containing mixtures of two common lipids (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine and cholesterol) and an alkanethiol were deposited on gold and showed the formation of robust bilayers with a high capacity to inhibit non-specific protein adsorption, allowing the covalent coupling of antibodies. This new platform is presented as an alternative immunosensing interface without the need to use thiolipids, typically employed in the preparation of lipid bilayers on gold.

Keywords: Carbon disulfide, dithiocarbamates, biosensors, nanoparticles, oxygen reduction reaction.

Índice geral

Agradecimentos	i
Resumo e palavras-chave	iii
<i>Abstract and keywords</i>	v
Lista de abreviaturas e símbolos	xi

Capítulo 1 – Introdução

1.1 Funcionalização química de superfícies de ouro	3
1.1.1 Monocamadas auto-montadas	3
1.1.2 Formação <i>in situ</i> de ditiocarbamatos	6
1.1.3 Nanomateriais	7
1.1.3.1 Nanopartículas de Au e Pt	8
1.1.3.2 Nanopartículas de Fe ₃ O ₄	9
1.1.3.3 Modificação de nanopartículas e imobilização em superfícies de eletrodo	10
1.1.4 Bicamadas lipídicas suportadas	12
1.2 Biossensores	13
1.2.1 Sensores enzimáticos com transdução eletroquímica	14
1.2.2 Imunossensores óticos	15
1.3 Eletrocatalise para a reação de redução do oxigénio	17
1.4 Objetivos e estrutura da tese	20
1.5 Referências bibliográficas	22

Capítulo 2 - Metodologias experimentais e técnicas de caracterização

2.1 Reagentes e soluções	31
2.2 Síntese de Nanopartículas	34
2.3 Métodos de modificação de superfícies de ouro	36
2.3.1 Formação <i>in situ</i> de ditiocarbamatos em ouro na presença nanopartículas	36

2.3.2	Imobilização de nanopartículas funcionalizadas com moléculas catalíticas	38
2.3.3	Formação de bicamadas lipídicas	40
2.4	Caracterização de suspensões coloidais e superfícies modificadas	43
2.4.1	Morfologia, distribuição de tamanhos e características óticas no UV-visível das nanopartículas em suspensão coloidal (TEM, XDR, UV-vis)	43
2.4.2	Análise topográfica e estrutural das superfícies de ouro modificadas (AFM, XPS)	46
2.4.3	Estudos eletroquímicos (voltametria cíclica e cronoamperometria)	49
2.4.4	Medição dos parâmetros elipsométricos e determinação da espessura de filmes finos (elipsometria convencional)	56
2.4.5	Desempenho dos imunossensores (SPR, TIRIE, elipsometria de imagem)	59
2.5	Referências bibliográficas	64

Capítulo 3 – Formação *in situ* de ditiocarbamatos para a construção de biossensores

3.1	Elétrodos nanoestruturados - nanopartículas de ouro e platina	70
3.1.1	Reação entre o CS ₂ , epinefrina ou triptofano	71
3.1.2	Atividade catalítica da Glucose oxidase	94
3.2	Nanoestruturas magnéticas de óxido de ferro	106
3.2.1	Caraterização morfológica e estrutural de nanopartículas de Fe ₃ O ₄	109
3.2.2	Formação de ditiocarbamatos em suspensão coloidal	111
3.2.3	Elétrodos modificados com compostos modelo	112
3.2.4	Atividade enzimática de nanoconjugados de Lacase	117
3.3	Referências bibliográficas	128

Capítulo 4 – Eléttodos modificados com nanoprtículas magnéticas e compostos organometálicos – Estudo da reação de redução do oxigénio

4.1 Funcionalização de nanoprtículas de Fe_3O_4 com metaloporfirinas	140
4.2 Desempenho eletrocatalítico	144
4.3 Caracterização morfológica das superfícies modificadas	161
4.4 Imobilização de nanoprtículas: dissulfureto de carbono <i>versus</i> 1,6-hexanoditiol	163
4.5 Eletrocatalise de nanoprtículas de MnFe_2O_4 em meio básico	168
4.6 Referências bibliográficas	170

Capítulo 5 – Desenvolvimento de plataformas para Imunossensores

5.1 Biofuncionalização de superfícies nanoestruturadas de ouro com CS_2 e proteína A	178
5.2 Bcamadas lipídicas suportadas em ouro	194
5.2.1 Ouro previamente modificado com uma SAM de ácido mercaptoundecanóico	197
5.2.2 Deposição direta de lipossomas de misturas lipídicas de DPPC/Colesterol/decanotiol	200
5.3 Referências bibliográficas	209

Capítulo 6 – Conclusões finais

215

Lista de abreviatura e símbolos

SAM(s) (*Self-Assembly Monolayer(s)*) – monocamada(s) auto-montada (s)

DTC(s) – ditiocarbamato(s)

NP(s) – nanopartícula(s)

AuNPs – nanopartículas de Au

PtNPs – nanopartículas de Pt

Fe₃O₄NPs – nanopartículas de Fe₃O₄

MnFe₂O₄NPs – nanopartículas de MnFe₂O₄

SLB(s) (*Supported Lipid Bilayer*) – bicamada lipídica suportada

SUVs (*Small Unilamellar Vesicles*) – vesículas pequenas unilamelares

LUVs (*Large Unilamellar Vesicles*) – vesículas grandes unilamelares

M – Mediador redox

ORR (*Oxygen Reduction Reaction*) – reação de redução do oxigênio

Me – Metal

DPPC (*1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) – 1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-fosfocolina

IgG – Imunoglobina G

Anti-IgG – Anti-Imunoglobina G

HMA – hexilmetilamina

DietilDTC – dietilditiocarbamato

HexilmetilDTC – hexilmetilditiocarbamato

DibutilDTC – dibutilditiocarbamato

AFM (*Atomic Force Microscopy*) – microscopia de força atômica

TEM (*Transmission Electronic Microscopy*) – microscopia de transmissão eletrônica

XPS (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*) – espectroscopia fotoeletrônica de raio-X

XRD (*X-Ray Diffraction*) – difração de raio-X

UV-vis – Ultravioleta-visível

CCD (*Charge-Coupled-Device*) – dispositivo de carga acoplada

MUA (*MercaptoUndecanoic Acid*) – ácido mercaptoundecanóico

RDE (*Rotative Disc Electrode*) – eletrodo rotativo de disco

RRDE (*Rotative Ring-Disc Electrode*) – eletrodo rotativo de disco e anel

IE (*Imaging Ellipsometry*) – elipsometria de imagem

TIRIE (*Total Internal Reflection Imaging Ellipsometry*) – elipsometria de imagem com reflexão interna total

SPR (*Surface Plasmon Resonance*) – ressonância de plasmão de superfície

STM (*Scanning Tunneling Microscopy*) – microscopia de efeito túnel

SCE (*Saturated Calomel Electrode*) – eletrodo saturado de calomelanos

SHE (*Standard Hydrogen Electrode*) – eletrodo padrão de hidrogênio

NHE (*Normal Hydrogen Electrode*) – eletrodo normal de hidrogênio

PBS (*Phosphate Buffer Saline*) – tampão fosfato salino

PBST (*Phosphate Buffer Saline with Tween 20*) – tampão fosfato salino com Tween

BSA (*Bovine serum albumin*) – albumina de soro de bovino

BB (*Blocking buffer*) – tampão bloqueador (à base de caseína)

NHS (*N-Hydroxysuccinimide*) – N-hidroxisuccinimida

EDC (*1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide*) – hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropilo)-N'-etilcarbodiimida

CoP – porfirina de Co

FeP – porfirina de Fe

FMCA (*FerroceneMonoCarboxilic Acid*) – ácido ferrocenomonocarboxílico

FDCA (*FerroceneDicarboxilic Acid*) – ácido ferrocenodicarboxílico

GOx – glucose oxidase

ABTS (*2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*) – ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

min – minuto

s - segundo

j – densidade de corrente ($\mu\text{A cm}^{-2}$)

E – potencial de um eletrodo *versus* a referência (V)

E_p^{red} – potencial do pico catódico (V)

E_p^{ox} – potencial do pico anódico (V)

j_p – densidade de corrente de pico ($\mu\text{A cm}^{-2}$)

j_p^{ox} – densidade de corrente do pico anódico ($\mu\text{A cm}^{-2}$)

j_p^{red} – densidade de corrente do pico catódico ($\mu\text{A cm}^{-2}$)

v – velocidade de varrimento (V s^{-1})

n – número de elétrons

F – constante de Faraday (96485 C mol^{-1})

R – constante dos gases ideais ($8.3144 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
 T – temperatura ($20^\circ\text{C} = 293.25 \text{ K}$)
 A – área geométrica do eletrodo (cm^2)
 Q – carga (C)
 C – concentração (M)
 ω – velocidade de rotação (rpm)
 D_0 – coeficiente de difusão das espécies ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$)
 j_{lim} – densidade de corrente limite (mA cm^{-2})
 j_{Lev} – densidade de corrente limite de Levich (mA cm^{-2})
 j_k – densidade de corrente na ausência de quaisquer efeitos de transferência de massa (mA cm^{-2})
 C_0^* - concentração das espécies no seio da solução ($2.9 \times 10^{-4} \text{ M} = 2.9 \times 10^{-1} \text{ mol cm}^{-3}$)
 ν – viscosidade cinemática ($0.01 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 25°C)
 α – coeficiente de absorção
 Ψ – parâmetro elipsométrico da amplitude / ângulo azimutal
 Δ – parâmetro elipsométrico da fase/desvio de fase
 n_s – parâmetro ótico do substrato
 k_s – coeficiente de extinção do substrato
 d_f – espessura do filme (nm)
 \hat{n} – índice de refração complexo
 $\widehat{R}_p / \widehat{R}_s$ – coeficientes de Fresnel em direções p e s
 h – constante de Plank
 ϕ – ângulo de incidência ou de propagação
 δ – atraso da fase
 μ - momento dipolar
 ϵ – coeficiente de absorção molar ($\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ m}^{-1}$)
 $\tan \Psi$ - razão do eixo menor e maior de uma elipse
 β – espessura da fase
 λ – comprimento de onda (nm)
 θ – ângulo
 R^2 – fator de correlação
 ΔE_p – separação dos picos redox (V)
 $E_{1/2}$ – potencial de meia-onda (V)

$\Delta grayscale$ – diferença de *grayscale*

RU (*relative units*) – unidades relativas do sinal de SPR

ΔRU – diferença de unidades relativas do sinal de SPR

Δd_f – diferença de espessuras (nm)

Γ – cobertura superficial (mol cm^{-2})

Γ^{ox} – cobertura superficial obtida pela integração do pico anódico (mol cm^{-2})

Γ^{red} – cobertura superficial obtida pela integração do pico catódico (mol cm^{-2})

T_m – temperatura de transição da fase gel para o fluído

T_{amb} – temperatura ambiente ($^{\circ}\text{C}$)

K_m^{app} – constante de Michaelis-Mentem

A – absorvância

a – parâmetro da célula

rms - rugosidade

t - Tempo (min ou s)

Capítulo 1

Introdução

1.1 Funcionalização química de superfícies de ouro

A funcionalização de substratos metálicos com compostos orgânicos tornou-se uma prática comum na área da química de superfícies.

A importância de estudar e desenvolver novos métodos de imobilização, simples e versáteis, de biomoléculas ou de centros catalíticos em superfícies metálicas, que possam ser utilizados para o desenvolvimento de biossensores (óticos ou eletroquímicos) e para eletrocatalise, surge devido à necessidade de melhorar a qualidade dessas plataformas, tornando-as mais estáveis e mais eficientes.

Têm sido empregues diversas metodologias na imobilização de biomoléculas (enzimas, anticorpos) em superfícies de eléctrodo, tais como, adsorção física ou eletrostática (em suportes metálicos e de carbono), acoplamento covalente em superfícies modificadas electroquimicamente por polímeros ou redução de sais diazónio [1] e através da formação de monocamadas auto-montadas (SAMs) [2, 3] ou da formação *in situ* de ditiocarbamatos (DTC), particularmente em ouro [4-6]. Mais recentemente, também tem sido reportada a incorporação de proteínas em superfícies de ouro modificadas por sistemas modelo de biomembranas (bicamadas)[7, 8].

À medida que se vai evoluindo neste campo de investigação, tem-se vindo a descobrir que a utilização de compostos organossulfurados prontamente disponíveis para reagir com superfícies planas e/ou nanoestruturadas, é uma das chaves para a funcionalização de eléctrodos (ouro, carbono, platina, etc.) [2, 3, 9].

1.1.1 Monocamadas auto-montadas

Desde o início da década de 90, surgiram vários trabalhos descrevendo a formação de monocamadas auto-montadas (SAMs) reportando detalhadamente as suas principais características, vantagens e tipos de interação mais comuns [2, 10-14]. As SAMs são originadas pela adsorção espontânea de moléculas orgânicas em

substratos sólidos (figura 1.1a), através de grupos com afinidade para o substrato, e por ligações de van der Waals entre grupos apolares de moléculas adjacentes. Apresentam-se estáveis, organizadas, com elevado grau de empacotamento e são fáceis de preparar e muito versáteis, o que as torna muito atrativas para diversas aplicações, tais como eletrocatalise, biossensores, proteção contra a corrosão. A formação de SAMs com grupos específicos, por exemplo, COOH ou NH₂, são suscetíveis de serem covalentemente ligados a proteínas (figura 1.1a) [14, 15]. Os exemplos de SAMs mais conhecidos são os triclorosilanos de alquila em vidro, sílica, óxido de alumínio e os derivados de enxofre em ouro, platina, mercúrio e cobre [16]. A auto-montagem de n-alkanotióis, dialquilsulfuretos e dialquildissulfuretos [2, 11, 15] em ouro é controlada pela elevada afinidade do enxofre para a superfície de ouro com uma energia da ordem de $\sim 40 \text{ kcal mol}^{-1}$ [17]. O enxofre liga-se à superfície do ouro, possivelmente formando um tiolato, com um estrutura hexagonal ($\sqrt{3} \times \sqrt{3}$)R30° (figura 1.1b) e a adsorção ocorre nos locais em que o átomo de S (sp^3) coordena com 3 átomos de Au da superfície Au (111), com um espaçamento de $\sim 5 \text{ \AA}$ entre átomos vizinhos (figura 1.1c). Os vetores da célula unitária são $\sqrt{3}$ vezes maiores do que os do substrato [16, 18].

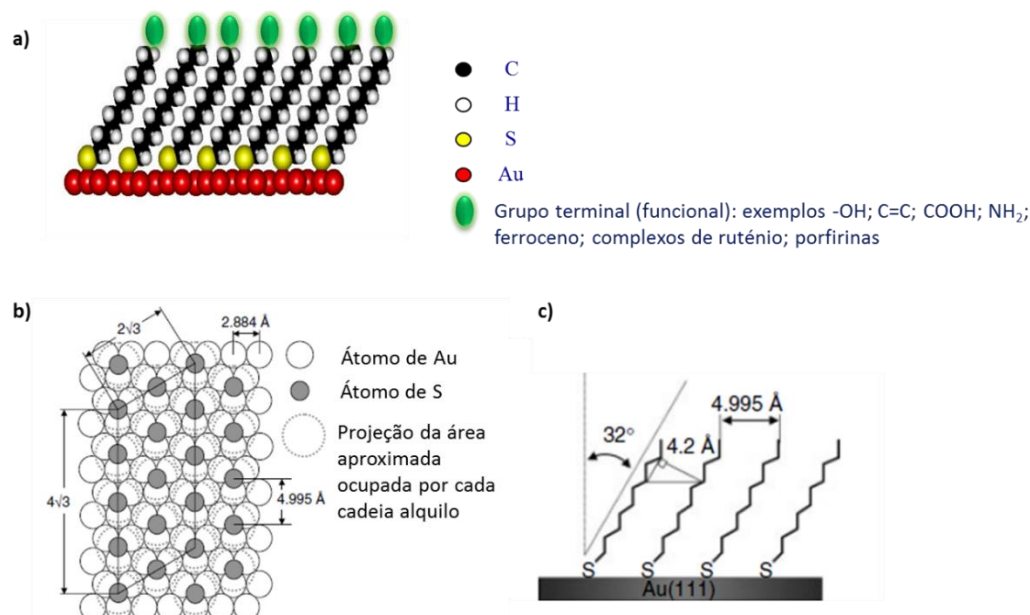


Figura 1.1 – a) Esquemática de monocamadas auto-montadas formadas em ouro; b) perspectiva de topo da estrutural hexagonal ($\sqrt{3} \times \sqrt{3}$) $R30^\circ$ de uma monocamada auto-montada de decanotiol empacotada em Au(111); c) perspectiva lateral do arranjo das moléculas de decanotiol adsorvidas na superfície do ouro com 5 Å de separação entre as cadeias alquila e posicionadas a 32° da superfície do ouro, adaptado de [3].

A ligação forte entre o enxofre e a superfície do ouro permite a caracterização das SAMs formadas por diversas técnicas de caracterização superficiais de elevada sensibilidade (espectroscopia fotoeletrónica de raios-X, microscopia de força atómica e elipsometria). Por técnicas eletroquímicas (voltametria cíclica ou cronoamperometria, determinação da carga) é possível quantificar o número de átomos de enxofre desadsorvidos da superfície de ouro, por desadsorção redutiva, podendo-se estimar coberturas superficiais e inferir sobre a estabilidade e organização da SAM.

Como alternativa à formação de SAMs de alcanotóis em ouro surgiu a formação *in situ* de ditiocarbamatos utilizando compostos organossulfurados.

1.1.2 Formação *in situ* de ditiocarbamatos

As moléculas com grupos carboditiolato ($-CS_2$) podem ter propriedades de adsorção química superiores às dos tióis (SH), pois as suas distâncias interatômicas S-S são quase ideais para a adsorção epitaxial sobre Au, superfícies [2, 4]. Tais grupos podem ser alternativas atrativas à utilização de alcanotióis no que respeita a robustez da adsorção. A. Wei [4, 5] foi o primeiro a reportar a adsorção espontânea de grupos ditiocarbamatos (DTCs) em superfícies de Au, através da simples exposição a dissulfureto de carbono e uma amina secundária.

Os DTCs, quando não estão adsorvidos em superfícies, são considerados instáveis na sua forma ácida e muitas vezes são preparados como sais de metal pela condensação de dialquilaminas com CS_2 [4](figura 1.2a) sob condições fortemente básicas. Thomas J. Meade, em 2010 [19], reforça e complementa esses estudos, mostrando que uma variedade de aminas secundárias podem condensar com o CS_2 em superfícies de Au, à temperatura ambiente sem base adicional, para formar grupos que são estáveis em ambientes aquosos ácidos e básicos. Em 2010, o nosso grupo de trabalho [20] demonstrou que podíamos utilizar a formação *in situ* de ditiocarbamatos para imobilizar diretamente aminoácidos e enzimas em ouro, a partir de soluções aquosas. Também em 2010, J. Huskens e V.M. Rotello [21], reportaram a utilização de ditiocarbamatos para a imobilização de nanopartículas de óxido de sílica em monocamadas auto-montadas, funcionalizadas com grupos amina ancorados em superfícies de sílica. Em 2011, K. Chen e H. D. Robinson [22], introduzem a funcionalização de nanopartículas de Au hidrocloreto de polialiamina, por ditiocarbamatos, através da reação dos grupos amina laterais com moléculas de CS_2 .

Assim, a formação *in situ* de ditiocarbamatos ocorre por imersão de substratos de Au em soluções com uma proporção equimolar de CS_2 e de aminas [20] (figura 1.2b). Este procedimento de um só passo pode ser realizado em solventes aquosos ou orgânicos, no entanto, em meio orgânico (álcoois) tem sido reportado uma maior eficiência desta reação. Os ditiocarbamatos podem também ser formados em suspensões coloidais de nanopartículas de Au (figura 1.2 c) e em nanoestruturas pontuais (*quantum dots*) de CdZe-ZnS [23]. É importante salientar, de acordo com o

reportado [24], que as moléculas de ditiocarbamatos formam uma SAM compacta em Au (111), através de uma ligação bidentada e apresentam densidades eletrônicas elevadas nos átomos de enxofre, formando uma estrutura de ressonância quando adsorvidas ao ouro.

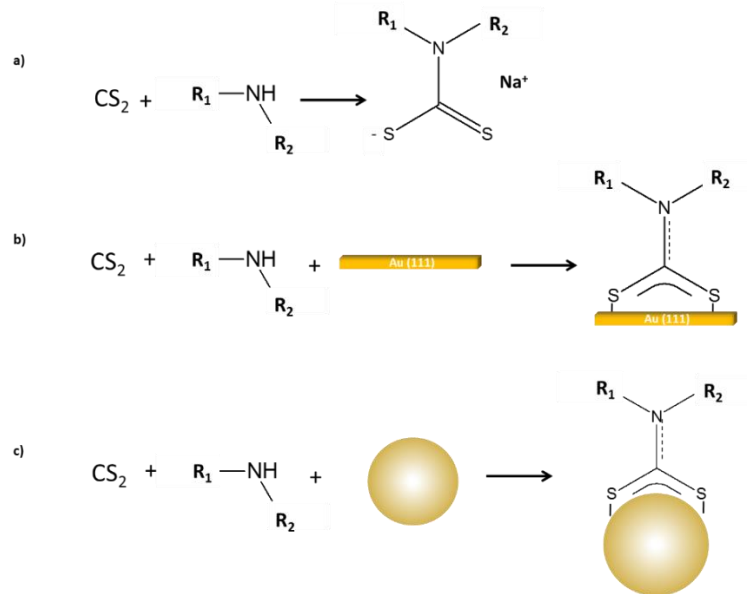


Figura 1.2 – a) Reação entre CS_2 e diaquilaminas em solução básica; b) reação de formação *in situ* de ditiocarbamatos em superfícies de ouro; c) reação de formação *in situ* de ditiocarbamatos em superfícies nanoestruturadas.

Apesar da robustez da ligação ditiocarbamato-Au e da facilidade com que estes grupos podem ser formados, ainda existem relativamente poucos estudos sobre as suas propriedades e aplicações. Assim, a gama de estruturas sintéticas ou de biocompostos que podem ser immobilizadas por esta via em superfícies planas ou nanoestruturadas, deverá certamente expandir num futuro próximo.

1.1.3 Nanomateriais

Os nanomateriais (nanopartículas, nanotubos, etc) têm, por definição, dimensões na escala nanométrica (0- 100 nm) e propriedades distintas do seu material maciço de origem. As nanopartículas, em particular as de metais nobres e de óxidos metálicos, têm propriedades únicas, tais como áreas superficiais elevadas,

biocompatibilidade, propriedades condutoras, magnéticas e óticas, o que as torna elementos muito interessantes para diversas aplicações, em particular, para biossensores (por ex. óticos e eletroquímicos) e eletrocatalise [25-28]. De entre os metais empregues na síntese de nanopartículas, Au, Pt, Pd, Ag, Ru, as de Au e a Pt ,têm sido das mais estudadas [29-31], enquanto nas nanopartículas de óxidos de metais de transição, um dos óxidos mais estudado é o Fe_3O_4 [28, 32, 33]

1.1.3.1 Nanopartículas de ouro e platina

A preparação de nanopartículas de Au (AuNPs) e de Pt (PtNPs) por métodos químicos em solução encontra-se largamente referenciada na literatura [29-31, 34, 35]. Em geral, envolve o uso de um sal do metal em solução e a adição de um agente redutor [29, 36]. A presença de um agente redutor, em solução, permite estabilizar as nanopartículas formadas, controlando a agregação, o tamanho, a forma e a orientação cristalográfica superficial das nanopartículas [37].

Entre os métodos disponíveis para a síntese de AuNPs, o método de redução direta é um dos mais utilizados. Este foi descrito por Turkevich [38] e desenvolvido por outros [31, 39, 40]. O sal de ouro (HAuCl_4) em solução é reduzido, a temperatura elevada ($\sim 100\text{ }^\circ\text{C}$), pelo agente redutor citrato de sódio, formando-se nanopartículas esféricas com tamanhos entre 16 e 150 nm de diâmetro. Podem ainda ser sintetizadas AuNPs e também PtNPs à temperatura ambiente utilizando um procedimento semelhante (método Solla- Gullón), ou seja, por redução direta do sal de ouro ou platina (HAuCl_4 ou K_2PtCl_4 , respetivamente) e pela adição de citrato de sódio e borohidreto de sódio [41], obtendo-se nanopartículas com diâmetros muito mais reduzidos, de aproximadamente 5 nm.

Uma das características óticas mais interessantes das AuNPs é que, quando irradiadas por luz visível, ocorre uma oscilação coletiva de eletrões livres na superfície da partícula, absorvendo parte dessa luz visível. Este fenómeno é denominado por efeito de ressonância do plasmão de superfície, o qual sofre desvios de comprimento de onda no espectro do UV-visível, devido ao tamanho, material, forma e ao meio dielétrico circundante [42-44]. As PtNPs não apresentam este fenómeno ótico na região UV-visível, no entanto a sua formação pode ser acompanhada pelo

desaparecimento da banda de absorção do sal de platina (K_2PtCl_6), em meio aquoso (água) a cerca de 258 nm [45].

Um dos procedimentos mais utilizado para ligar as AuNPs a superfícies planas é a formação de monocamadas auto-montadas de derivados de alcanoditióis [46, 47], devido à forte afinidade química entre o enxofre e ouro.

1.1.3.2 Nanopartículas de magnetite (Fe_3O_4)

A magnetite é um mineral magnético, constituída por óxidos de ferro (II) e (III) e oxigénio, que apresenta uma estrutura do tipo espinela com uma fórmula geral AB_2O_4 , em que A e B são os catiões [48]. O empacotamento denso dos aniões (neste caso oxigénio (O_4)) provoca dois tipos de interstícios distintos, o tetraédrico e octaédrico, onde irão posicionar-se os átomos Fe [28]. As posições tetraédricas são ocupadas por iões Fe^{3+} e as posições octaédricas por iões Fe^{3+} e Fe^{2+} . Assim, a estrutura pode globalmente ser descrita como $(Fe^{3+})_{tet}(Fe^{3+}Fe^{2+})_{oct}O_4$. A magnetite pode facilmente sofrer oxidação, especialmente na forma de nanopartículas com tamanhos mais pequenos (< 12 nm) pelo que, a sua formulação correta terá de ser $Fe_{3-x}O_4$, em que x diminuiu com o aumento do tamanho da partícula. No caso de uma oxidação máxima ($x = 1$) esta estrutura dá origem à magemite, $\gamma-Fe_2O_3$, onde o ferro existe apenas como Fe^{3+} [32, 33], enquanto que, para $x = 0$, tem-se Fe_3O_4 (magnetite) no seu estado mais puro. Quanto maior for o tamanho médio das partículas menor a tendência para se oxidarem. Deste modo, o fator estequiométrico do Fe^{2+}/Fe^{3+} influencia bastante as propriedades das nanopartículas (cristalinidade, capacidade de adsorção, estado de oxidação, condutoras e magnéticas, etc) [28, 49].

As propriedades das nanopartículas dependem fortemente do método de preparação escolhido. De todas as metodologias existentes atualmente, o método de co-precipitação ou apenas precipitação, é um dos mais usados [50-52].

As nanopartículas de magnetite atuam como ácidos de Lewis em sistemas aquosos, coordenados a moléculas de H_2O ou grupos hidroxilo. Este é o motivo pelo qual a superfície destas nanopartículas é bastante dependente do pH [49]: a valores de $pH < 7$, a superfície está protonada e a $pH > 7$, a superfície está negativamente

carregada com grupos OH^- [53]. As nanopartículas de magnetite em contacto com uma solução aquosa de pH inferior a 7 dissolvem-se [54]. Por esse motivo, surge a necessidade de criar revestimentos apropriados para proteger e, simultaneamente, estabilizar estes nanomateriais.

1.1.3.3 Funcionalização de nanopartículas e imobilização em superfícies de eletrodo

As suspensões coloidais de nanopartículas metálicas possuem iões estabilizadores e é necessário substituí-los, por exemplo, a troca espontânea de um ião citrato das AuNPs por uma molécula de tiol ou dissulfureto, para permitir a funcionalização de nanopartículas e a sua ligação a superfícies de ouro plano. Foi reportado um estudo que afirma que as trocas de iões citrato por iões tiolatos em AuNPs [55-57], são conseguidas devido à diferença substancial da energia de ligação entre o Au-S (~ 40 kcal/mol) e o Au-O (~ 2 kcal/mol). No entanto, este estudo demonstra também que, ao contrário do que tem sido assumido, apenas 50-65 % de grupos tiolatos de uma SAM com empacotamento máximo, estarão co-adsorvidos às AuNPs juntamente com os iões citratos [57].

No caso de nanopartículas de óxidos metálicos, a sua funcionalização e posterior ligação a superfícies de ouro poderá ocorrer de uma forma mais direta, caso sejam obtidas no estado sólido sem agente estabilizante. No entanto, como a sua estabilidade em solução aquosa depende do pH do solvente, é necessária a formação de revestimentos inorgânicos ou orgânicos em redor das NPs. Estes revestimentos são geralmente de Au, sílica, ou outros compostos inorgânicos ou orgânicos (polímeros), ou ainda materiais semicondutores [58]. Uma alternativa à criação destas “capas” protetoras poderá ser a funcionalização de nanopartículas de magnetite por adsorção de compostos biológicos [59-62] ou organometálicos [63] a qual pode ocorrer através de interações eletrostáticas (COO^- , NH_3^+), pontes de hidrogénio ou pelo grupo SH, ou ligações covalentes [61, 62, 64]. Schwaminger e colaboradores [61] descreveram que a natureza química das interações entre os aminoácidos de uma proteína e a superfície de magnetite, depende essencialmente da polaridade e dos grupos COOH , NH_2 ou SH

de cada aminoácido. No caso da cisteína [65], esta deverá ligar-se pelo grupo SH à magnetite, através da ligação Fe-S, visto que a energia da ligação Fe-S (~ 77 kcal/mol) é superior, logo preferencial, à ligação Fe-O (~ 32 kcal/mol) [66].

Desta forma, surge o interesse em continuar a explorar a modificação direta de superfícies de magnetite por compostos organossulfurados, de forma a minimizar ou eliminar a necessidade de revestimentos químicos (*core-shell*), muitas vezes utilizados para a funcionalização de nanopartículas.

A ligação covalente de enzimas em superfícies nanoestruturadas de ouro através da formação de SAMs de alcanoditióis (com grupos terminais NH_2 ou COOH) é um dos métodos mais utilizados na preparação de biossensores enzimáticos [47], no entanto, é dependente de uma etapa de ativação destes grupos por agentes acoplantes (ex. NHS/EDC). Deste modo, a imobilização covalente da biomolécula ao transdutor ocorre, geralmente, em pelo menos 5 passos, como ilustrado na figura 1.3: formação da SAM, ligação das NPs, funcionalização das NPs e SAMs com grupos funcionais terminais, ativação destes grupos e ligação do enzima.

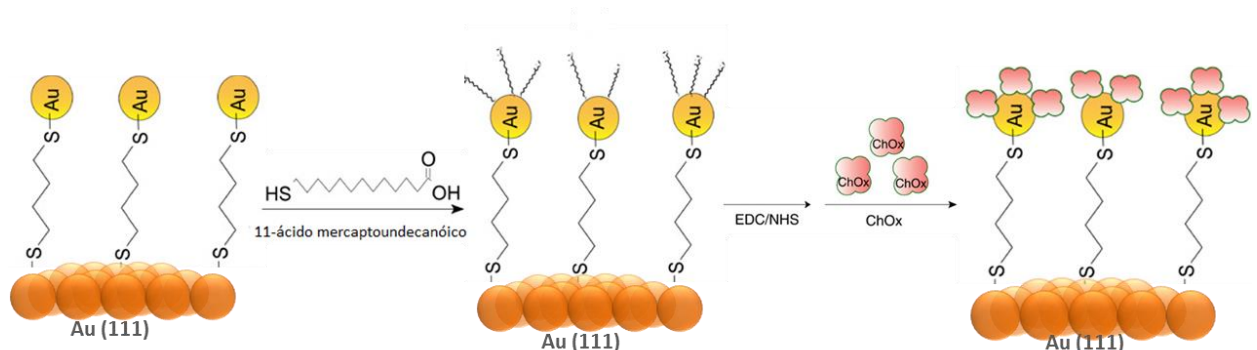


Figura 1.3 – Metodologia de funcionalização de superfícies de ouro com SAMs de ditióis e AuNPs, para a ligação covalente de enzimas.

Sendo assim, o desenvolvimento de procedimentos mais simples e diretos, que preservem a atividade biológica do enzima, é um dos requisitos fundamentais na preparação de interfaces para biossensores.

1.1.4 Formação de bicamadas lipídicas suportadas

O fator-chave para o desenvolvimento de superfícies condutoras com biomoléculas suficientemente estáveis e sensíveis é a interação entre a entidade biológica e a superfície transdutora. Frequentemente, a ligação à superfície afeta a estrutura e atividade biológica da biomolécula.

Os componentes principais das biomembranas são os lípidos e as proteínas, os quais se encontram em diferentes proporções, consoante o tipo de célula e/ou organismo [67, 68]. Para reduzir a complexidade das biomembranas, utilizam-se frequentemente sistemas modelo que mimetizam algumas das propriedades das biomembranas [69-72] e estes podem ser preparados usando lípidos puros, misturas de lípidos ou misturas lípido-proteína. Os sistemas modelo mais comuns são os lipossomas (vesículas) e as bicamadas lipídicas suportadas (SLBs) [68]. As vesículas são um dos sistemas modelo de biomembranas mais popular e podem ser preparadas a partir de uma suspensão de vesículas multilamelares (MLVs), resultando em vesículas unilamelares pequenas (SUVs), com diâmetro entre ca. 25 nm ou 50 nm, ou vesículas unilamelares grandes (LUVs), com diâmetro de ca. 50 nm até 500 nm [68]. Nas bicamadas lipídicas, a unilamelaridade das vesículas fundidas e posteriormente depositadas, é também uma vantagem, pois possibilita a análise por microscopia da força atômica dos domínios típicos dos sistemas lipídicos, dado que a formação de multicamadas pode influenciar os valores de espessura e/ou a diferença de alturas dos domínios formados.

As SLBs têm sido utilizadas com sucesso em diversos estudos [71, 73, 74], tendo sido este o sistema modelo utilizado neste trabalho. A formação de SLBs é possível em suportes sólidos por transferência sequencial de duas monocamadas, a partir de uma interface ar-água, ou por fusão de vesículas em contacto com um suporte hidrófilo [68]. A adsorção de uma bicamada lipídica a uma superfície de ouro é bastante mais exigente do que em mica e em óxido de silício, devido à hidrofobicidade da superfície de ouro. Lipkowski e seus colaboradores reportaram a deposição e caracterização de bicamadas em Au (111), demonstrando também o efeito da aplicação de um potencial na adsorção/desadsorção e orientação das moléculas de lípido[75]. Adicionalmente, já

existem outros estudos que demonstram a capacidade da bicamada suportada em acomodar uma biomolécula eletroativa, permitindo o estudo dos seus processos de oxidação/redução [7, 76].

Com o intuito de tornar a superfície de ouro mais hidrófila é possível modificá-la com uma SAM. Um exemplo de um dos compostos mais utilizados para este fim é o ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) [76, 77]. O tiol é responsável por estabelecer uma ligação muito forte e estável com o ouro, enquanto o grupo carboxilo estará disponível para interagir com os grupos hidrófilos dos fosfolípidos. As bicamadas formadas num ouro previamente modificado são estáveis e possibilitam a caracterização de compostos eletroativos (por exemplo, por voltametria cíclica) que possam estar inseridos na própria bicamada. No entanto, como a imobilização ao substrato não é covalente (interações eletrostáticas entre o COOH e os fosfolípidos), estas podem não ser suficientemente resistentes em estudos que envolvam o uso de células de fluxo com alteração da força iónica, tendo em conta que as interações electrostáticas serão afetadas. Como alternativa, tem sido explorada a utilização de tiolípidos (lípidos com um SH numa das extremidades), tendo em conta a ligação forte do S ao ouro [78]. Contudo, estas estruturas condicionam a fluidez natural das membranas biológicas.

Deste modo, é necessário criar outras metodologias alternativas adequadas ao desenvolvimento de biossensores, sem que o ambiente biomimético seja alterado, permitindo a interação de biomoléculas sem causar a diminuição da sua bioatividade.

1.2 Biossensores

Devido ao crescimento da população e ao aumento da longevidade vai existindo um maior número de pessoas com problemas de saúde crónicos, como por exemplo a diabetes. Para melhorar a qualidade de vida destas pessoas é necessário criar dispositivos médicos que facilitem o controlo da glucose na corrente sanguínea. Conforme o relatório publicado este ano pela *transparency market research*, o mercado de biossensores globais está previsto aumentar de 12,4 bilhões de dólares em 2013 para 21,6 bilhões de dólares até 2020. Este facto leva ao aumento da

investigação neste campo, com o desenvolvimento de novas plataformas que possam ser usadas como biossensores, criando dispositivos de detecção rápida e de fácil utilização.

Um biossensor é um dispositivo miniaturizado integrado que utiliza um elemento biológico (anticorpo, enzima, recetor de proteína, ácido nucleico, tecido celular, moléculas orgânicas pequenas, etc.), como elemento sensor acoplado a um transdutor, por exemplo, eletroquímico (amperométrico, potenciométrico), para detecção de um sinal elétrico (figura 1.4) [79, 80].

O elemento biológico (enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, etc.) tem um papel fundamental no dispositivo de reconhecimento molecular, transformando/detetando o analito, sendo também responsável pela seletividade com que este é detetado. Este elemento biológico pode ser acoplado com nanomateriais (por exemplo, nanopartículas metálicas), criando novas nanoestruturas que irão aumentar a sensibilidade dos biossensores, facilitando o contato elétrico entre o enzima e a superfície transdutora [81].

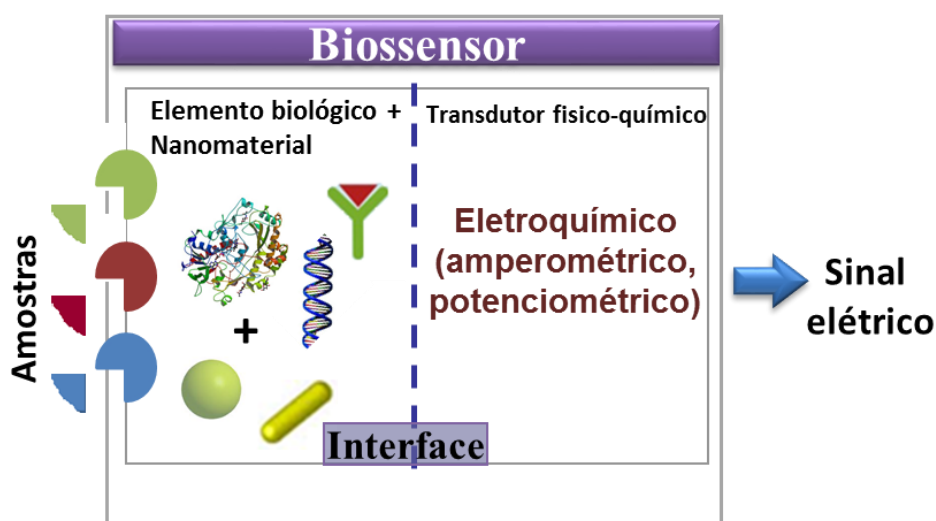


Figura 1.4 – Ilustração esquemática do funcionamento de um biossensor enzimático com transdução eletroquímica.

1.2.1 Sensores enzimáticos com transdução eletroquímica

Um dos passos mais importantes no desenvolvimento de biossensores enzimáticos é a imobilização de biomoléculas na superfície metálica, garantindo a

estabilidade e preservação da sua atividade biológica[82]. Os biossensores amperométricos são os mais estudados e comercializados hoje em dia, devido à elevada sensibilidade para uma vasta gama de substratos [83] e por serem os mais utilizados na deteção da glucose no sangue. Este tipo de biossensores pode ser dividido em três gerações (figura 1.5): 1.ª geração - biossensores com base na medição da concentração de substrato natural e produtos da reação enzimática; 2.ª geração - biossensores utilizando mediadores (M) redox como transportadores de eletrões dos centros ativos do enzima para o eléctrodo; 3.ª geração - biossensores que utilizam a transferência eletrónica direta entre o enzima e o eléctrodo [83].

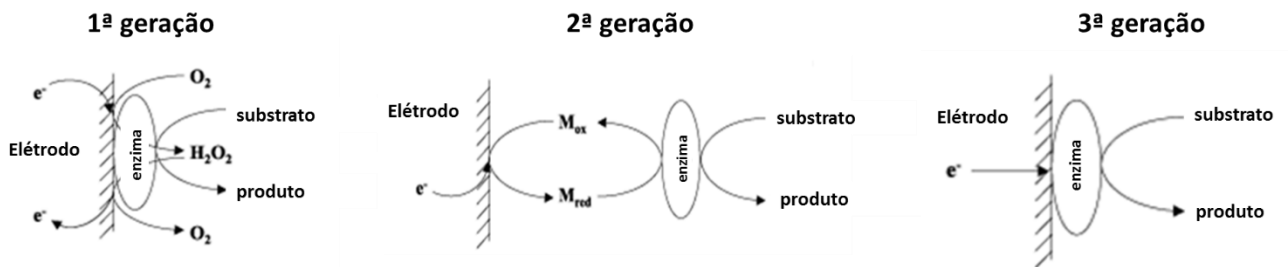


Figura 1.5 – Esquema ilustrativo das três gerações de biossensores enzimáticos, adaptado de [84].

Nos biossensores de 2ª geração recorre-se ao uso de mediadores redox, pois estes facilitam a transferência eletrónica entre a componente biológica e a superfície transdutora [83, 85]. As características de um mediador ideal são essencialmente: reagir rapidamente com o enzima reduzido, apresentar uma cinética heterogénea reversível, o sobrepotencial para a regeneração do mediador oxidado deve ser baixo e independente do pH, possuir formas oxidada e reduzida estáveis e a forma reduzida não deve reagir com o oxigénio. O ferroceno e seus derivados são os mediadores redox mais utilizados, destacando-se os ácidos ferroceno (mono) e (di)carboxílicos utilizados neste trabalho.

1.2.2 Imunossensores óticos

Dentro da categoria de biossensores existem os imunossensores, que são dispositivos de medição que exploram o reconhecimento biológico envolvido no

acoplamento específico, por exemplo, de um antigénio a um anticorpo, originando sinais óticos (ou elétricos) mensuráveis. Em geral, num imunossensor ótico, como ilustrado na figura 1.6, após a obtenção de linha de base com uma solução tampão, a adsorção do antigénio ao anticorpo origina uma variação de sinal de SPR, que se tornará estável, quando todos os antigénios estiverem ligados aos anticorpos. Caso as biomoléculas não estejam ligadas especificamente, estas poderão dissociar-se e sair após a lavagem com o tampão usado inicialmente, verificando-se a diminuição do sinal SPR até ao valor inicial.

O imunoenensaio mais conhecido e utilizado é o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay [86]. Este tipo de ensaios imunológicos, embora muito sensíveis, apresenta algumas desvantagens relativamente aos imunossensores, tais como, o uso de procedimentos longos, a elevada concentração de anticorpos e a utilização de marcadores para a deteção de anticorpos específicos. O uso de interfaces imunossensoras permite a deteção do anticorpo com maior sensibilidade, usando concentrações muito baixas de anticorpos, não sendo necessário o uso de anticorpos marcados (*labeled-antibody*) [87].

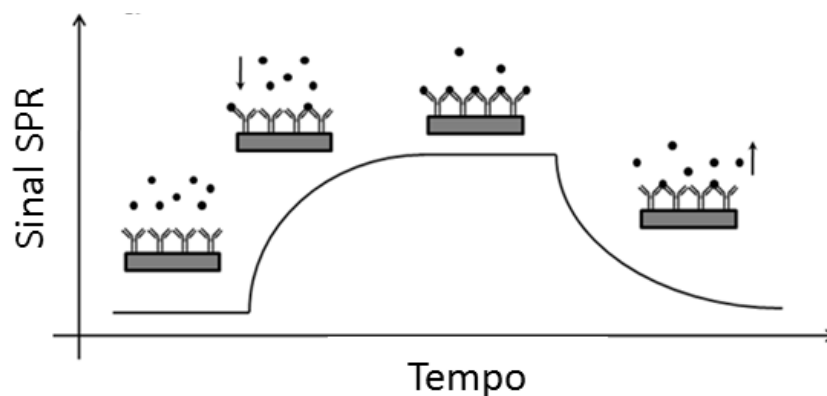


Figura 1.6 – Variação de sinal de SPR ao longo do tempo após a adsorção e dissociação de biomoléculas (exemplo, antigénios) adaptado de [88].

Devido ao facto de a qualidade dos imunossensores estar diretamente relacionada com a afinidade do anticorpo para o antigénio, deve ser dada especial atenção à seleção do anticorpo, de forma a garantir a especificidade da ligação

anticorpo-antígeno [89, 90]. A inibição da adsorção não específica na interface em conjunto com uma adequada orientação do bioreceptor (anticorpo) e a sua distribuição sobre a superfície, são fatores importantes que devem ser controlados, a fim de obter o melhor desempenho do imunossensor. Dessa forma, tem existido, nos últimos anos, uma procura por superfícies que previnam a adsorção não específica de proteínas [91-93]. As superfícies de óxido de polietileno e as superfícies de ouro modificadas com derivados tiolados de polietilenoglicol (PEG), mostraram-se resistentes à adsorção não específica de algumas proteínas [94, 95], uma vez que são capazes de minimizar interações eletrostáticas e hidrofóbicas. O uso de agentes tensoativos/surfactantes [96, 97], como o sulfato de dodecil de sódio (SDS) ou o polioxietileno sorbitan 20 (Tween 20) durante o processo de bioreconhecimento, tornou-se um procedimento bastante utilizado para minimizar ou até evitar as interações físicas não desejadas (ex. apolares, eletrostáticas), na preparação de biossensor.

Têm sido descritas metodologias que envolvem a conjugação de nanopartículas de ouro, com anticorpos, e que têm sido utilizadas em imunoenaios para a detecção de biomarcadores cancerígenos [98] que, por este motivo, apresentam potencial para aplicação na área dos imunossensores.

Também a combinação de nanomateriais com compostos organometálicos de reconhecida atividade catalítica, tem-se revelado uma vantagem na modificação de superfícies para a reação de redução do oxigênio.

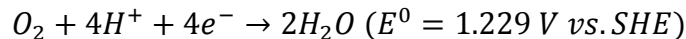
1.3 Eletrocatalise da reação de redução do oxigênio

A reação de redução de oxigênio (*oxygen reduction reaction*, ORR) é considerada como uma das reações mais importantes em dispositivos eletroquímicos de conversão de energia [99-101], como por exemplo, nas células de combustível. O seu funcionamento consiste na oxidação de um combustível, normalmente o hidrogênio, no ânodo e na redução de um agente oxidante, o oxigênio, no cátodo de uma célula galvânica.

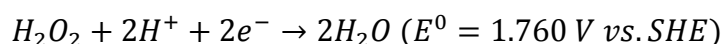
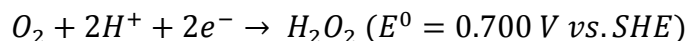
O catalisador catódico mais utilizado numa célula de combustível alimentada a O₂ é a platina [102]. Todavia, este metal nobre apresenta algumas contrapartidas, não só a nível do elevado custo e do seu fornecimento natural mas também devido ao seu desempenho eletroquímico como catalisador. A redução do O₂ em platina no cátodo é significativamente mais lenta ($i_0 \approx 10^{-9} \text{ A cm}^{-2}$ (25 °C)) [103] do que a oxidação do H₂ no ânodo ($i_0 \approx 10^{-3} \text{ A cm}^{-2}$ (25 °C)) [103], sendo um passo limitante em todas as células de combustível de O₂. Deste modo, tornou-se necessário apostar no desenvolvimento de novos materiais para catalisadores catódicos que possam substituir a platina. Assim, um catalisador alternativo não só deve ser mais barato mas, também deverá catalisar a redução do oxigénio por meio de um mecanismo reacional mais rápido, originando a obtenção de melhores parâmetros cinéticos (densidade de corrente de troca, i_0 , e coeficiente de simetria, α), aumentando a corrente envolvida na reação e, consequentemente, a eficiência da célula.

A ORR em soluções aquosas ácidas pode ocorrer por via de dois mecanismos diferentes [99]:

i) Mecanismo direto:

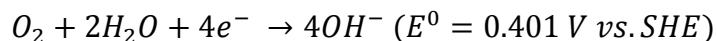


ii) Mecanismo em dois passos:

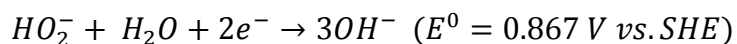
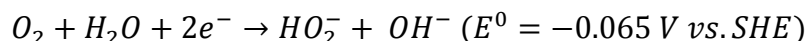


Com o aumento pH da solução aquosa, os potenciais desviam-se negativamente 60 mV/unidade de pH e a pH igual ou superior a 7, as reações são:

i) Mecanismo direto:



ii) Mecanismo em dois passos:



A distinção entre estes dois mecanismos (direto e dois passos) é dificultada pelo fato de que a reação de redução direta (4 eletrões) também pode envolver a formação de H₂O₂. No entanto, este tem tendência a permanecer adsorvido na

superfície do eléctrodo sem sofrer desadsorção ou decomposição, ocorrendo subsequentemente a sua redução. Em geral, o uso do eléctrodo rotativo de disco e anel permite distinguir electroquimicamente os dois mecanismos reacionais que regem a reação de redução do O_2 [101], considerando que neste tipo de estudos, por exemplo, se pode medir a produção de H_2O_2 , produzida junto ao anel, aplicando um potencial fixo (0.9 V).

Os compostos quelatos- N_4 pirolisados com metais de transição suportados em superfícies de carbono de elevada área superficial são conhecidos por reduzir cataliticamente o oxigénio em meio ácido [104], como resultado da interação entre o oxigénio e o ião metálico central (por exemplo, interação O_2 -hemoglobina) [105, 106]. Os primeiros grupos de compostos deste tipo descritos como sendo cataliticamente ativos foram as ftalocianinas [100] e de seguida as porfirinas [106, 107]. Comparando os diferentes tipos de complexos- N_4 , relativamente à sua atividade e estabilidade em soluções ácidas, foi descrito que as porfirinas estão a prevalecer, devido ao seu sistema eletrónico conjugado, um pré-requisito para a ativação da molécula de oxigénio [106, 107]. As porfirinas apresentam uma estrutura macrocíclica composta por quatro anéis de pirrol unidos por pontes metino (=CH-), cujos carbonos, com hibridização sp^2 , são usualmente designados meso porfirínicos [107]. O macrociclo porfirínico apresenta-se como um sistema completamente conjugado, que obedece à regra de aromaticidade de Hückel ($4n+2$ electrões π , $n = 1, 2, 3, \dots$). Este sistema é constituído por ter 22 electrões π ($n=5$), dos quais 18 ($n=4$) se encontram deslocalizados e contribuem para a aromaticidade do macrociclo [107].

A vitamina B_{12} e seus derivados também têm sido alvos de investigação na área da eletrocatalise [108, 109] visto que contém um centro de cobalto, que catalisa diversas reações metabólicas em sistemas vivos (ex. a vitamina B_{12} no seu estado reduzido estará envolvida em reações de transferência eletrónica do metil e hidreto em sistemas vivos). Vários complexos de cobalto foram sintetizados como compostos modelo equivalentes de vitamina B_{12} , tais como, os dissulfuretos cobirinato, e as suas reatividades básicas foram também investigados em vários sistemas *in-vivo* e *in-vitro* [108, 110].

Cada vez mais tem-se vindo a investigar o desenvolvimento de novos catalisadores à base de nanomateriais, tendo em conta as suas características superficiais (tamanho, forma, área superficial, volume poroso) e propriedades condutoras, magnéticas, eletrónicas e óticas [111]. Nanopartículas de metais de transição (Fe, Co, Ni, Cu e Zn) e de óxidos de metais de transição (por exemplo, TiO_2 , ZrO_2 , CeO_2 , Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , Mn_3O_4 , CoO , Co_3O_4) [111] acopladas em superfícies metálicas, poderão influenciar positivamente o desempenho catalítico das superfícies modificadas [63].

Beneficiando-se da atividade eletrocatalítica das metaloporfirinas é ainda possível sintetizar novos catalisadores baseados na adsorção de metaloporfirinas em suportes de carbono [104]. Desta forma, é importante salientar que, a conjugação das características dos nanomateriais com as propriedades catalíticas das metaloporfirinas ou outros compostos organometálicos, cria uma sinergia que deverá aumentar significativamente o desempenho catalítico das superfícies para a reação de redução do oxigénio.

1.4 Objetivos e estrutura da tese

O objetivo central desta tese é o de desenvolver novas metodologias para criar plataformas sensíveis, estáveis e versáteis para serem usadas no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, imunossensores óticos e em eletrocatalise. Deste modo, pretende-se explorar diversos métodos de modificação de superfícies de ouro com base na química do enxofre. A figura 1.7 ilustra as principais modificações na superfície de ouro desenvolvidas ao longo desta tese.

A formação *in situ* de ditiocarbamatos na presença de nanopartículas metálicas e semicondutoras, será estudada como uma alternativa simples – um só passo reacional – à deposição de monocamadas auto-montadas de tióis, para a imobilização de compostos simples (ex. aminoácido, contendo aminas, e de estruturas mais complexas, como enzimas (glucose oxidase e lacase) em superfícies de ouro (figura 1.7 A e B). A preparação, caracterização e o desempenho destes elétrodos modificados como biossensores de glucose e de 2 são apresentados no capítulo 3.

Tendo em vista a combinação das propriedades catalíticas de compostos organometálicos e de nanopartículas semicondutoras de magnetite, avaliou-se a capacidade do CS₂ co-adsorver nas nanopartículas, estabilizando-as e ligando-as fortemente à superfície de ouro. As propriedades catalíticas destes elétrodos para a reação de redução de oxigénio serão estudadas no capítulo 4 onde se comparará o seu desempenho com SAMs de ditiois (figura 1.7 C e D).

Com o intuito de desenvolver novas interfaces imunossensoras com transdução ótica, que sejam, sensíveis, estáveis, biomiméticas, testaram-se duas novas abordagens simples (capítulo 5): i) formação *in situ* de ditiocarbamatos com proteína A e nanopartículas de ouro (figura 1.7 E), ii) deposição direta de bicamadas lipídicas suportadas em ouro (figura 1.7 F), às quais se podem ligar covalentemente anticorpos. O intuito será criar interfaces universais (sem marcação) que possam ser facilmente adaptáveis a fenómenos de bioreconhecimento de interesse.

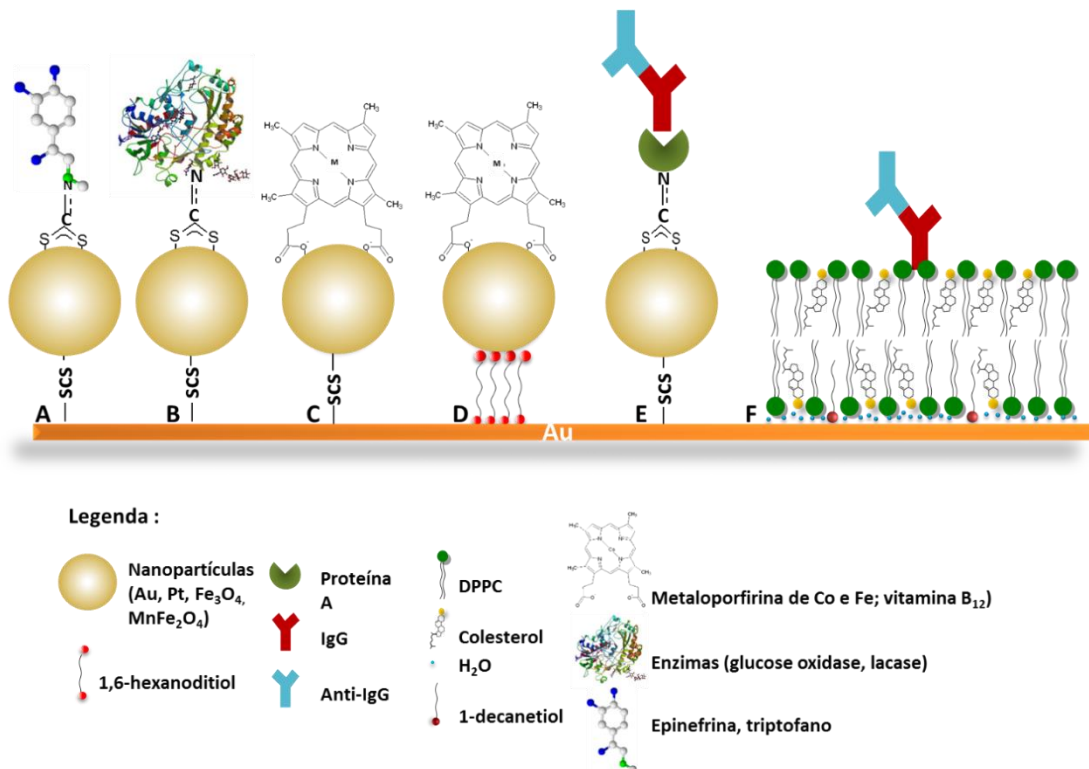


Figura 1.7 – Esquemática das várias modificações de superfície exploradas neste trabalho.

1.5 Referências Bibliográficas

- [1] X. Li, X. Wang, G. Ye, W. Xia, X. Wang, Polystyrene-based diazonium salt as adhesive: A new approach for enzyme immobilization on polymeric supports, *Polymer*, 51 (2010) 860-867.
- [2] A. Ulman, Formation and structure of self-assembled monolayers, *Chemical Reviews*, 96 (1996) 1533-1554.
- [3] I.R. M. Fujihira, J.F. Rusling, Modified Electrodes - Encyclopedia of Electrochemistry, A.J. Bard, M. Stratmann (Eds.) ed., Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA2007.
- [4] Y. Zhao, W. Perez-Segarra, Q.C. Shi, A. Wei, Dithiocarbamate assembly on gold, *Journal of the American Chemical Society*, 127 (2005) 7328-7329.
- [5] H. Zhu, D.M. Coleman, C.J. Dehen, I.M. Geisler, D. Zemlyanov, J. Chmielewski, G.J. Simpson, A. Wei, Assembly of dithiocarbamate-anchored monolayers on gold surfaces in aqueous solutions, *Langmuir*, 24 (2008) 8660-8666.
- [6] R. Cao, Jr., A. Diaz, R. Cao, A. Otero, R. Cea, M.C. Rodriguez-Arguelles, C. Serra, Building layer-by-layer a Bis(dithiocarbamate)copper(II) complex on Au{111} surfaces, *Journal of the American Chemical Society*, 129 (2007) 6927-6930.
- [7] O. Gutierrez-Sanz, D. Olea, M. Pita, A.P. Batista, A. Alonso, M.M. Pereira, M. Velez, A.L. De Lacey, Reconstitution of Respiratory Complex I on a Biomimetic Membrane Supported on Gold Electrodes, *Langmuir*, 30 (2014) 9007-9015.
- [8] J.K.R. Kendall, B.R.G. Johnson, P.H. Symonds, G. Imperato, R.J. Bushby, J.D. Gwyer, C. van Berkel, S.D. Evans, L.J.C. Jeuken, Effect of the Structure of Cholesterol-Based Tethered Bilayer Lipid Membranes on Ionophore Activity, *Chemphyschem*, 11 (2010) 2191-2198.
- [9] E. Delamarche, B. Michel, H.A. Biebuyck, C. Gerber, Golden interfaces: The surface of self-assembled monolayers, *Advanced Materials*, 8 (1996) 719-&.
- [10] R.G. Nuzzo, D.L. Allara, Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces, *Journal of the American Chemical Society*, 105 (1983) 4481-4483.
- [11] C.A. Widrig, C. Chung, M.D. Porter, The electrochemical desorption of n-alkanethiol monolayers from polycrystalline au and ag electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 310 (1991) 335-359.
- [12] C.E.D. Chidsey, C.R. Bertozzi, T.M. Putvinski, A.M. Mujsce, Coadsorption of ferrocene-terminated and unsubstituted alkanethiols on gold: electroactive self-assembled monolayers, *Journal of the American Chemical Society*, 112 (1990) 4301-4306.
- [13] C.D. Bain, E.B. Troughton, Y.T. Tao, J. Evall, G.M. Whitesides, R.G. Nuzzo, Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold, *Journal of the American Chemical Society*, 111 (1989) 321-335.
- [14] H.O. Finklea, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley and Sons1999-2004.
- [15] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, G.M. Whitesides, Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology, *Chemical Reviews*, 105 (2005) 1103-1169.
- [16] J. Sagiv, Organized monolayers by adsorption. 1. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces, *Journal of the American Chemical Society*, 102 (1980) 92-98.
- [17] R.G. Nuzzo, B.R. Zegarski, L.H. Dubois, Fundamental-studies of the chemisorption of organosulfur compounds on au(111) - implications for molecular self-assembly on gold surfaces, *Journal of the American Chemical Society*, 109 (1987) 733-740.
- [18] M.D. Porter, T.B. Bright, D.L. Allara, C.E.D. Chidsey, Spontaneously organized molecular assemblies .4. Structural characterization of normal-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared-spectroscopy, and electrochemistry, *Journal of the American Chemical Society*, 109 (1987) 3559-3568.
- [19] A.L. Eckermann, J.A. Shaw, T.J. Meade, Kinetic Dispersion in Redox-Active Dithiocarbamate Monolayers, *Langmuir*, 26 (2010) 2904-2913.

- [20] I. Almeida, A.C. Cascalheira, A.S. Viana, One step gold (bio)functionalisation based on CS₂-amine reaction, *Electrochimica Acta*, 55 (2010) 8686-8695.
- [21] M.-H. Park, X. Duan, Y. Ofir, B. Creran, D. Patra, X.Y. Ling, J. Huskens, V.M. Rotello, Chemically Directed Immobilization of Nanoparticles onto Gold Substrates for Orthogonal Assembly Using Dithiocarbamate Bond Formation, *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2 (2010) 795-799.
- [22] K. Chen, H.D. Robinson, Robust dithiocarbamate-anchored amine functionalization of Au nanoparticles, *Journal of Nanoparticle Research*, 13 (2011) 751-761.
- [23] Y. Zhang, A.M. Schnoes, A.R. Clapp, Dithiocarbamates as Capping Ligands for Water-Soluble Quantum Dots, *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2 (2010) 3384-3395.
- [24] P. Morf, F. Raimondi, H.G. Nothofer, B. Schnyder, A. Yasuda, J.M. Wessels, T.A. Jung, Dithiocarbamates: Functional and versatile linkers for the formation of self-assembled monolayers, *Langmuir*, 22 (2006) 658-663.
- [25] M.C. Daniel, D. Astruc, Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology, *Chemical Reviews*, 104 (2004) 293-346.
- [26] A.N. Shipway, E. Katz, I. Willner, Nanoparticle arrays on surfaces for electronic, optical, and sensor applications, *Chemphyschem*, 1 (2000) 18-52.
- [27] C.M. Welch, R.G. Compton, The use of nanoparticles in electroanalysis: a review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384 (2006) 601-619.
- [28] R.M.C.U. Schwertmann, *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*, Wiley-VCH ed.2003.
- [29] N.R. Jana, L. Gearheart, C.J. Murphy, Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template, *Advanced Materials*, 13 (2001) 1389-1393.
- [30] J. Solla-Gullon, F.J. Vidal-Iglesias, E. Herrero, J.M. Feliu, A. Aldaz, CO monolayer oxidation on semi-spherical and preferentially oriented (100) and (111) platinum nanoparticles, *Electrochemistry Communications*, 8 (2006) 189-194.
- [31] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, A. Plech, Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited, *Journal of Physical Chemistry B*, 110 (2006) 15700-15707.
- [32] M.D. Carvalho, F. Henriques, L.P. Ferreira, M. Godinho, M.M. Cruz, Iron oxide nanoparticles: the Influence of synthesis method and size on composition and magnetic properties, *Journal of Solid State Chemistry*, 201 (2013) 144-152.
- [33] J. Santoyo Salazar, L. Perez, O. de Abril, L. Truong Phuoc, D. Ihiawakrim, M. Vazquez, J.-M. Greneche, S. Begin-Colin, G. Pourroy, Magnetic Iron Oxide Nanoparticles in 10–40 nm Range: Composition in Terms of Magnetite/Maghemite Ratio and Effect on the Magnetic Properties, *Chemistry of Materials*, 23 (2011) 1379-1386.
- [34] N.C. Bigall, T. Haertling, M. Klose, P. Simon, L.M. Eng, A. Eychmueller, Monodisperse Platinum Nanospheres with Adjustable Diameters from 10 to 100 nm: Synthesis and Distinct Optical Properties, *Nano Letters*, 8 (2008) 4588-4592.
- [35] J. Yang, T.C. Deivaraj, H.P. Too, J.Y. Lee, Acetate stabilization of metal nanoparticles and its role in the preparation of metal nanoparticles in ethylene glycol, *Langmuir*, 20 (2004) 4241-4245.
- [36] K.R. Brown, D.G. Walter, M.J. Natan, Seeding of colloidal Au nanoparticle solutions. 2. Improved control of particle size and shape, *Chemistry of Materials*, 12 (2000) 306-313.
- [37] Y. Chen, X. Gu, C.-G. Nie, Z.-Y. Jiang, Z.-X. Xie, C.-J. Lin, Shape controlled growth of gold nanoparticles by a solution synthesis, *Chemical Communications*, (2005) 4181-4183.
- [38] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discussions of the Faraday Society*, (1951) 55-&.
- [39] G. Frens, Particle-size and sol stability in metal colloids, *Kolloid-Zeitschrift and Zeitschrift Fur Polymere*, 250 (1972) 736

- [40] M. Grzelczak, J. Perez-Juste, P. Mulvaney, L.M. Liz-Marzan, Shape control in gold nanoparticle synthesis, *Chemical Society Reviews*, 37 (2008) 1783-1791.
- [41] J. Solla-Gullon, F.J. Vidal-Iglesias, A. Lopez-Cudero, E. Garnier, J.M. Feliu, A. Aldaza, Shape-dependent electrocatalysis: methanol and formic acid electrooxidation on preferentially oriented Pt nanoparticles, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10 (2008) 3689-3698.
- [42] Y. Joseph, I. Besnard, M. Rosenberger, B. Guse, H.-G. Nothofer, J.M. Wessels, U. Wild, A. Knop-Gericke, D. Su, R. Schlögl, A. Yasuda, T. Vossmeier, Self-Assembled Gold Nanoparticle/Alkanedithiol Films: Preparation, Electron Microscopy, XPS-Analysis, Charge Transport, and Vapor-Sensing Properties, *The Journal of Physical Chemistry B*, 107 (2003) 7406-7413.
- [43] C. Sonnichsen, T. Franzl, T. Wilk, G. von Plessen, J. Feldmann, Plasmon resonances in large noble-metal clusters, *New Journal of Physics*, 4 (2002).
- [44] W.R. Glomm, Functionalized gold nanoparticles for applications in bionanotechnology, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 26 (2005) 389-414.
- [45] V.C. Ferreira, A.I. Melato, A.F. Silva, L.M. Abrantes, Attachment of noble metal nanoparticles to conducting polymers containing sulphur – preparation conditions for enhanced electrocatalytic activity, *Electrochimica Acta*, 56 (2011) 3567-3574.
- [46] V.C. Ferreira, A.F. Silva, L.M. Abrantes, Electrochemical and Morphological Characterization of New Architectures Containing Self-Assembled Mono layers and Au-NPs, *Journal of Physical Chemistry C*, 114 (2010) 7710-7716.
- [47] U. Saxena, M. Chakraborty, P. Goswami, Covalent immobilization of cholesterol oxidase on self-assembled gold nanoparticles for highly sensitive amperometric detection of cholesterol in real samples, *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2011) 3037-3043.
- [48] K.E. Sickafus, J.M. Wills, N.W. Grimes, Structure of Spinel, *Journal of the American Ceramic Society*, 82 (1999) 3279-3292.
- [49] M.P.a.B.C.S. Anamaria Durdureanu-Angheluta, Tailored and Functionalized Magnetite Particles for Biomedical and Industrial Applications, in: S.D. Hutagalung (Ed.) *Materials Science and Technology 2012*.
- [50] K. Petcharoen, A. Sirivat, Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method, *Materials Science and Engineering: B*, 177 (2012) 421-427.
- [51] S.A. Kulkarni, P.S. Sawadh, P.K. Palei, K.K. Kokate, Effect of synthesis route on the structural, optical and magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles, *Ceramics International*, 40 (2014) 1945-1949.
- [52] L. Shen, Y. Qiao, Y. Guo, S. Meng, G. Yang, M. Wu, J. Zhao, Facile co-precipitation synthesis of shape-controlled magnetite nanoparticles, *Ceramics International*, 40 (2014) 1519-1524.
- [53] A. Durdureanu-Angheluta, R. Ardeleanu, M. Pinteala, V. Harabagiu, H. Chiriac, B.C. Simionescu, Silane covered magnetite particles. Preparation and characterisation, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 3 (2008) 33-40.
- [54] A. Rodríguez-López, D. Torres-Torres, J. Mojica-Gomez, C. Estrada-Arteaga, R. Antaño-López, Characterization by electrochemical impedance spectroscopy of magnetite nanoparticles supported on carbon paste electrode, *Electrochimica Acta*, 56 (2011) 8078-8084.
- [55] C.S. Weisbecker, M.V. Merritt, G.M. Whitesides, Molecular self-assembly of aliphatic thiols on gold colloids, *Langmuir*, 12 (1996) 3763-3772.
- [56] M. Giersig, P. Mulvaney, Preparation of ordered colloid monolayers by electrophoretic deposition, *Langmuir*, 9 (1993) 3408-3413.
- [57] J.-W. Park, J.S. Shumaker-Parry, Strong Resistance of Citrate Anions on Metal Nanoparticles to Desorption under Thiol Functionalization, *ACS Nano*, 9 (2015) 1665-1682.
- [58] P.R. Solanki, A. Kaushik, V.V. Agrawal, B.D. Malhotra, Nanostructured metal oxide-based biosensors, *Npg Asia Materials*, 3 (2011) 17-24.
- [59] A.-H. Lu, E.L. Salabas, F. Schueth, Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application, *Angewandte Chemie-International Edition*, 46 (2007) 1222-1244.

- [60] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L.V. Elst, R.N. Muller, Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications, *Chemical Reviews*, 108 (2008) 2064-2110.
- [61] S.P. Schwaminger, P.F. García, G.K. Merck, F.A. Bodensteiner, S. Heissler, S. Günther, S. Berensmeier, Nature of Interactions of Amino Acids with Bare Magnetite Nanoparticles, *The Journal of Physical Chemistry C*, 119 (2015) 23032-23041.
- [62] J. Hu, B. Yuan, Y. Zhang, M. Guo, Immobilization of laccase on magnetic silica nanoparticles and its application in the oxidation of guaiacol, a phenolic lignin model compound, *RSC Advances*, 5 (2015) 99439-99447.
- [63] H. Zhu, S. Zhang, Y.-X. Huang, L. Wu, S. Sun, Monodisperse $MxFe_3-xO_4$ ($M = Fe, Cu, Co, Mn$) Nanoparticles and Their Electrocatalysis for Oxygen Reduction Reaction, *Nano Letters*, 13 (2013) 2947-2951.
- [64] H. Cohen, A. Gedanken, Z. Zhong, One-Step Synthesis and Characterization of Ultrastable and Amorphous Fe_3O_4 Colloids Capped with Cysteine Molecules, *The Journal of Physical Chemistry C*, 112 (2008) 15429-15438.
- [65] C. Guo, P. Boullanger, L. Jiang, T. Liu, One-step immobilization of alkanethiol/glycolipid vesicles onto gold electrode: Amperometric detection of Concanavalin A, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62 (2008) 146-150.
- [66] *Quantum Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH ed.2005.
- [67] M.M.C. David L.Nelson, *Biological Membranes and Transport.*, 2005.
- [68] R.F.M.d.A. Luís M. S. Loura, *Tópicos de Biofísica de Membranas*, LIDEL2004.
- [69] R.F.M. de Almeida, J. Borst, A. Fedorov, M. Prieto, A.J.W.G. Visser, Complexity of lipid domains and rafts in giant unilamellar vesicles revealed by combining imaging and microscopic and macroscopic time-resolved fluorescence, *Biophysical Journal*, 93 (2007) 539-553.
- [70] C.B. Yuan, J. Furlong, P. Burgos, L.J. Johnston, The size of lipid rafts: An atomic force microscopy study of ganglioside GM1 domains in sphingomyelin/DOPC/cholesterol membranes, *Biophysical Journal*, 82 (2002) 2526-2535.
- [71] S. Chiantia, J. Ries, N. Kahya, P. Schwille, Combined AFM and two-focus SFCS study of raft-exhibiting model membranes, *Chemphyschem*, 7 (2006) 2409-2418.
- [72] Y.-H.M. Chan, S.G. Boxer, Model membrane systems and their applications, *Current Opinion in Chemical Biology*, 11 (2007) 581-587.
- [73] A. Berquand, M.P. Mingeot-Leclercq, Y.F. Dufrene, Real-time imaging of drug-membrane interactions by atomic force microscopy, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1664 (2004) 198-205.
- [74] I. Johnston, L.J. Johnston, Sphingomyelinase generation of ceramide promotes clustering of nanoscale domains in supported bilayer membranes, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1778 (2008) 185-197.
- [75] *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, in: A.I.a.C.V. Kulkarni (Ed.)2014.
- [76] J.T. Marques, A.S. Viana, R.F.M. de Almeida, A Biomimetic Platform to Study the Interactions of Bioelectroactive Molecules with Lipid Nanodomains, *Langmuir*, 30 (2014) 12627-12637.
- [77] J.T. Marques, R.F.M. de Almeida, A.S. Viana, Biomimetic membrane rafts stably supported on unmodified gold, *Soft Matter*, 8 (2012) 2007-2016.
- [78] L.J.C. Jeuken, N.N. Daskalakis, X. Han, K. Sheikh, A. Erbe, R.J. Bushby, S.D. Evans, Phase separation in mixed self-assembled monolayers and its effect on biomimetic membranes, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 124 (2007) 501-509.
- [79] F.S. F. Scheller, *Biosensors*, 1st Edition, Elsevier1992.
- [80] A. Amine, H. Mohammadi, I. Bourais, G. Palleschi, Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring, *Biosensors and Bioelectronics*, 21 (2006) 1405-1423.
- [81] I. Willner, B. Willner, Biomolecule-Based Nanomaterials and Nanostructures, *Nano Letters*, 10 (2010) 3805-3815.

- [82] E. Katz, I. Willner, Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties, and applications, *Angewandte Chemie-International Edition*, 43 (2004) 6042-6108.
- [83] A.S. Sabine Borgmann, Sebastian Neugebauer, Wolfgang Schuhmann, *Advances in Electrochemical Science and Engineering*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA ed.2011.
- [84] R.S. Freire, C.A. Pessoa, L.D. Mello, L.T. Kubota, Direct electron transfer: An approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14 (2003) 230-243.
- [85] A. Chaubey, B.D. Malhotra, Mediated biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 17 (2002) 441-456.
- [86] Y. Cai, Z. Wang, J. Li, N. Li, F. Wei, Q. Liu, Evaluation of an indirect elisa using recombinant granule antigen gra7 for serodiagnosis of toxoplasma gondii infection in cats, *Journal of Parasitology*, 101 (2015) 37-40.
- [87] H.K. Hunt, A.M. Armani, Label-free biological and chemical sensors, *Nanoscale*, 2 (2010) 1544-1559.
- [88] M.D.O. Cesar Andrade, Tanize Faulin, Vitor Hering and Dulcineia Saes Parra Abdalla Biosensors for detection of Low-Density Lipoprotein and its modified forms, in: P.A. Serra (Ed.) *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity*2011.
- [89] B. Liedberg, C. Nylander, I. Lunström, Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, *Sensors and Actuators*, 4 (1983) 299-304.
- [90] Y. Li, X. Liu, Z. Lin, Recent developments and applications of surface plasmon resonance biosensors for the detection of mycotoxins in foodstuffs, *Food Chemistry*, 132 (2012) 1549-1554.
- [91] Y.Y. Luk, M. Kato, M. Mrksich, Self-assembled monolayers of alkanethiolates presenting mannitol groups are inert to protein adsorption and cell attachment, *Langmuir*, 16 (2000) 9604-9608.
- [92] Z.-H. Wang, A.S. Viana, G. Jin, L.M. Abrantes, Immunosensor interface based on physical and chemical immunoglobulin G adsorption onto mixed self-assembled monolayers, *Bioelectrochemistry*, 69 (2006) 180-186.
- [93] P.Q. Ying, A.S. Viana, L.M. Abrantes, G. Jin, Adsorption of human serum albumin onto gold: a combined electrochemical and ellipsometric study, *Journal of Colloid and Interface Science*, 279 (2004) 95-99.
- [94] S.W. Hui, T.L. Kuhl, Y.Q. Guo, J. Israelachvili, Use of poly(ethylene glycol) to control cell aggregation and fusion, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 14 (1999) 213-222.
- [95] Y. Zhang, Y. Chen, G. Jin, Serum tumor marker detection on PEGylated lipid membrane using biosensor based on total internal reflection imaging ellipsometry, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 159 (2011) 121-125.
- [96] G.B. Sigal, M. Mrksich, G.M. Whitesides, Effect of surface wettability on the adsorption of proteins and detergents, *Journal of the American Chemical Society*, 120 (1998) 3464-3473.
- [97] Z.H. Wang, G. Jin, Covalent immobilization of proteins for the biosensor based on imaging ellipsometry, *Journal of Immunological Methods*, 285 (2004) 237-243.
- [98] X. Liu, Q. Dai, L. Austin, J. Coutts, G. Knowles, J. Zou, H. Chen, Q. Huo, A One-Step Homogeneous Immunoassay for Cancer Biomarker Detection Using Gold Nanoparticle Probes Coupled with Dynamic Light Scattering, *Journal of the American Chemical Society*, 130 (2008) 2780-2782.
- [99] C.S.a.J. Zhang, *PEM Fuel Cell electrocatalysis, Fundamentals and Applications*, Springer2008.
- [100] R. Jasinski, New fuel cell cathode catalyst, *Nature*, 201 (1964) 1212-&.
- [101] R.R.G. Professor d. pletcher, dr r. peat, professor l. m. peter, dr j. robinson, *instrumental methods in electrochemistry*, Southampton Electrochemistry Group, Woodhead Publishing India Private Limited2011.
- [102] J. Ma, N.A. Choudhury, Y. Sahai, A comprehensive review of direct borohydride fuel cells, *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 14 (2010) 183-199.

- [103] J.O.M. Bockris, Khan, Shahad U.M. , Surface Electrochemistry: a Molecular Level Approach, Plenum, 1993.
- [104] S.N.S. Goubert-Renaudin, X. Zhu, A. Wieckowski, Synthesis and characterization of carbon-supported transition metal oxide nanoparticles — Cobalt porphyrin as catalysts for electroreduction of oxygen in acids, *Electrochemistry Communications*, 12 (2010) 1457-1461.
- [105] H. Jahnke, M. Schonborn, G. Zimmermann, Organic dyestuffs as catalysts for fuel cells, *Topics in current chemistry*, 61 (1976) 133-181.
- [106] H. Alt, H. Binder, G. Sandstede, Mechanism of the electrocatalytic reduction of oxygen on metal chelates, *Journal of Catalysis*, 28 (1973) 8-19.
- [107] Handbook of Porphyrin Science, Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine, World Scientific 2010.
- [108] E. Szócs, L. Durrer, R. Luginbühl, N. Simic, A.S. Viana, L.M. Abrantes, R. Keese, H. Siegenthaler, STM investigations of Au(1 1 1) electrodes coated with vitamin B12 derivatives, *Surface Science*, 600 (2006) 43-55.
- [109] C. Wedemeyer-Exl, T. Darbre, R. Keese, A Model for the Cobalamin-Dependent Methionine Synthase, *Helvetica Chimica Acta*, 82 (1999) 1173-1184.
- [110] A.S. Viana, M. Kalaji, L.M. Abrantes, Self-assembled monolayers of Vitamin B12 disulphide derivatives on gold, *Electrochimica Acta*, 47 (2002) 1587-1594.
- [111] S. Liu, S.-Q. Bai, Y. Zheng, K.W. Shah, M.-Y. Han, Composite Metal–Oxide Nanocatalysts, *ChemCatChem*, 4 (2012) 1462-1484.

Capítulo 2

Metodologias experimentais e técnicas de
caraterização

O objetivo central deste trabalho é o desenvolvimento de metodologias de modificação de superfícies de ouro para criar interfaces mais versáteis, eficientes e com potencial para serem usadas em biossensores e para eletrocatalise. Neste capítulo, descreve-se detalhadamente todos os passos dos procedimentos utilizados na modificação das superfícies de ouro, além de uma breve descrição dos princípios básicos das técnicas de caracterização usadas, bem como dos equipamentos, reagentes, elétrodos e células eletroquímicas utilizados neste trabalho.

2.1 Reagentes e soluções

Os reagentes mais utilizados na modificação das superfícies de ouro e na síntese das nanopartículas foram: dissulfureto de carbono (99 %, Acros Organics), epinefrina (95 %, Sigma–Aldrich), triptofano (98%, Sigma–Aldrich), dietilditiocarbamato de sódio (98 %, Riedel-de Häen), dibutilditiocarbamato de cádmio (98 %, Riedel-de Häen) e hexilmetilditiocarbamato de zinco (98 %, Riedel-de Häen), ácido cloroáurico dihidratado (99 %, Alfa Aesar), hexacloroplatinato(IV) de potássio (99 %, BDH Chemicals), citrato de sódio (99 % Alfa Aesar), 1,6-Hexanoditiol (≥ 97 % Alfa Aesar), hidróxido de sódio (≥ 98 %, Sigma-Aldrich), cloreto de ferro (III) (97 %, Sigma-Aldrich), sulfato de ferro (II) (≥ 99 % Merck), nitrato de ferro (III) (99%, Sigma-Aldrich) e cloreto de manganês (II) (99%, Riedel-de-Haën, amônia (≥ 25 %, Scharlau), cloreto de sódio (≥ 99.5 % Sigma-Aldrich), ácido sulfúrico (≥ 96 % Pancreac), ácido clorídrico (37 %, Merck) e etanol absoluto (≥ 99 %, Sigma-Aldrich).

Para o estudo da atividade catalítica dos elétrodos modificados foram usados dois enzimas, Glucose Oxidase proveniente de *Aspergillus niger* (GOx) (EC 1.1.3.4 tipo X–S, em forma de pó liofilizado, 100,000–250,000 unidades/g, Sigma–Aldrich) e Lacase proveniente de *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2 0,92 unidades/mg, Sigma-Aldrich) e os seguintes substratos D(+)glucose (≥ 99.5 %, Sigma-Aldrich) e ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS, 548,7 g/mol; ≥ 98 % Sigma Chemical), respetivamente. Nos ensaios com a glucose oxidase usaram dois mediadores redox, os ácidos ferrocenomonocarboxílico e ferrocenodicarboxílico (FMCA 97%, FDCA 96%, respetivamente, Sigma–Aldrich). A solução de glucose foi previamente preparada em

solução tampão fosfato (pH 7.4) permanecendo a 4°C, durante 24 h, para permitir a mutarrotação, para que, em solução, exista um equilíbrio entre os compostos anômeros cíclicos alfa e beta.

Nos estudos de eletrocatalise foram utilizados dois tipos de metaloporfirinas, a porfirina de cobalto (II) (CoP) (figura 2.1a), que foi sintetizada pelo grupo do Professor F.-P. Montforts, Universidade de Bremen, de acordo com o procedimento descrito na literatura [1, 2] e a deuteroporfirina de ferro (III) (FeP, Fe(III) deuteroporphyrin IX chloride) (figura 2.1b), que foi adquirida à Cymitquimica. O derivado da vitamina B₁₂ (B₁₂C₁₀SSC₁₀CH₃) (figura 2.1c) usado foi sintetizado pelo Professor R. Keese, Universidade de Bern, e seus colaboradores, de acordo com o procedimento reportado [3].

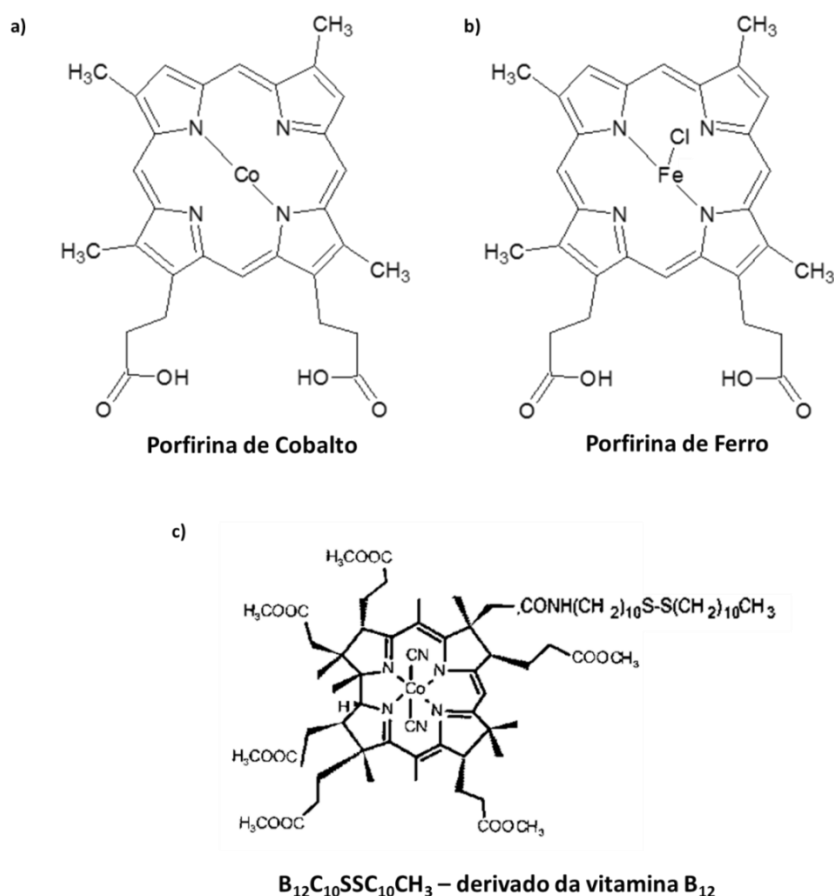


Figura 2.1 – Estruturas das porfirinas de Co e Fe e do derivado da vitamina B₁₂ utilizados na modificação das superfícies de ouro para eletrocatalise.

Para a formação das bicamadas lipídicas em ouro foi utilizado o 1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-fosfolina (DPPC, > 99% Alabaster, AL) e o Colesterol (> 99%), adquiridos à Avanti Polar Lipids. As estruturas do DPPC e colesterol são apresentadas na figura 2.2.

O ácido 11-mercaptoundecanóico (> 95%, MUA), o 1-decanotiol (> 96%), o N-hidroxisuccinimida (> 98%, NHS), o hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropilo)-N'-etilcarbodiimida (> 98%, EDC) também envolvidos na preparação de plataformas imunossensoras foram adquiridos à Sigma-Aldrich.

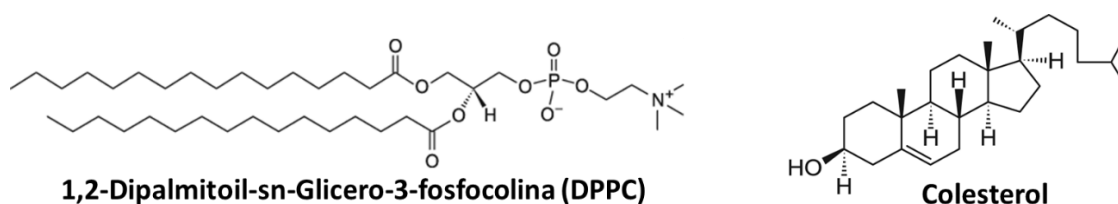


Figura 2.2 – Representação esquemática da estrutura dos lipídios usados na preparação da interface para a reação de bioreconhecimento.

A Imunoglobulina G humana (IgG) e o Anti-IgG, produzido a partir da cabra, são policonais (*Heavy + Light, whole molecule*), ambos têm um peso molecular entre 150 - 160 kDa e foram adquiridos à Sigma-Aldrich. A albumina de soro de bovino (*bovine serum albumin, BSA, > 98%*) e o tampão com um agente bloqueador à base de caseína (*Casein blocking buffer (BB)*) também foram comprados à Sigma-Aldrich.

Os tampões utilizados neste trabalho foram preparados seguindo os procedimentos abaixo descritos:

- Tampão fosfato salino (*phosphate buffer saline, PBS*): 8.0 mM Na₂HPO₄ (Merck); 1.14 mM KH₂PO₄ (Merck); 138 mM NaCl (Merck) e 2.7 mM KCl (Merck) - pH 7.4;
- Tampão citrato-fosfato: 0.1 M C₆H₈O₇·H₂O (Sigma-Aldrich) e 0.2 M Na₂HPO₄ (Merck) - pH 4.6;
- Tampão HEPES: 10 mM HEPES (Sigma-Aldrich). Só foi adicionado 3 mM CaCl₂ ao tampão nas experiências de deposição de lípidos no ouro previamente modificado com MUA - pH 7.4;

-Tampões fosfato salino (*phosphate buffer saline*, PBS, 0.01 M,) com adição de Tween 20 (0.05 %) (PBST) foram adquiridos à Sigma-Aldrich - pH 7.4

Todos os reagentes foram usados sem purificação prévia. Todas as soluções foram preparadas com água milli-Q purificada por um sistema mili-Q A10 com resistividade de 18.2 MΩ cm.

2.2 Síntese de nanopartículas

Neste trabalho foram sintetizadas nanopartículas de ouro e de platina. As nanopartículas de óxido de ferro do tipo Fe₃O₄ e MnFe₂O₄ foram sintetizadas no grupo de Química do Estado sólido, pela Professora Maria de Deus Carvalho, da Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.

Os detalhes experimentais sobre as sínteses são descritos de seguida:

a) Nanopartículas de ouro (AuNPs) (diâmetros médios de 20 e 40 nm)

A uma solução de HAuCl₄ (2.40×10^{-4} M) em ebulição (~ 100 °C), sob agitação forte, foi adicionado 1.60×10^{-3} M (ou 0.65×10^{-3} M) de citrato de sódio. Após alguns minutos o aquecimento foi desligado, mantendo a agitação durante 30 min. A mistura mudou de cor com a adição do citrato de sódio entre cinza, púrpura e vermelho. As suspensões coloidais foram armazenadas ao abrigo da luz, no frigorífico (4°C). Este procedimento é designado por método de Turkevich [4, 5]. A menor concentração de citrato de sódio leva à formação de nanopartículas de maiores dimensões (~ 40 nm).

b) Nanopartículas de ouro (AuNPs) e platina (PtNPs) (diâmetro médio de 5 e 3 nm, respetivamente).

A 20 mL de uma solução 1.25×10^{-4} M de HAuCl₄ e 2.50×10^{-4} M de citrato de sódio, à temperatura ambiente, foram adicionados 0.3 mL de uma solução 1.50×10^{-4} M de NaBH₄ (arrefecida em gelo e imediatamente após preparação), sob forte agitação. A agitação da solução foi reduzida após 30-60 s e mantida durante cerca de

15 min, a 40-45 °C para eliminação do excesso de NaBH₄. Na preparação de nanopartículas de Pt usando o K₂PtCl₆ foi utilizado um procedimento semelhante. Este método de síntese por redução por borohidreto à temperatura ambiente é o método Solla-Gullón, em meio aquoso [6, 7].

A redução do HAuCl₄ por citrato de sódio conduz à formação de partículas de maiores dimensões ($\varnothing \geq 16$ nm) [4, 5] do que as obtidas usando o borohidreto de sódio [6, 8] ($\varnothing < 10$ nm). Nestas amostras o ião citrato adsorve-se na superfície das AuNPs, estabilizando-as, prevenindo a sua agregação e conferindo-lhes uma carga negativa.

c) Nanopartículas semicondutoras de óxido de ferro (Fe₃O₄NPs - diâmetros médios de 20 e 40 nm; MnFe₂O₄NPs com aproximadamente 20 nm)

As nanopartículas Fe₃O₄ utilizadas neste trabalho foram sintetizadas pelo método de precipitação, no grupo de Química do Estado Sólido e de acordo com o descrito na literatura [9]. Resumidamente, foram dissolvidas quantidades estequiométricas de FeSO₄.7H₂O e FeCl₃.6H₂O em HCl, em atmosfera de azoto, para evitar a oxidação dos iões de ferro. De seguida foi adicionado NH₄OH para precipitar as Fe₃O₄NPs. O produto foi depois transferido para uma autoclave e mantido a uma temperatura de 200°C durante 3 ou 24 h, dependendo do tamanho médio (20 ou 40 nm, respetivamente). O precipitado foi separado por filtração magnética, utilizando um ímã permanente, e lavado com água destilada até a solução atingir um valor de pH = 7. O precipitado resultante foi seco a uma temperatura de 60°C.

As nanopartículas de MnFe₂O₄ foram sintetizadas pelo método de precipitação, semelhante ao utilizado para as Fe₃O₄NPs mas com a adição de nitrato de ferro (III) e cloreto de manganês (II) e um tratamento hidrotérmico (em autoclave durante 6 horas) a uma temperatura de 150°C.

2.3 Métodos de modificação de superfícies de ouro

2.3.1 Formação *in situ* de ditiocarbamatos em ouro na presença nanopartículas

Existem várias metodologias para a formação *in situ* de ditiocarbamatos, que têm sido exploradas pelo grupo e que inicialmente se basearam em três métodos: i) reação num só passo entre o CS₂ e a amina na presença da superfície de ouro; ii) formação de uma SAM de CS₂ no ouro e subsequente reação com a amina; iii) reação entre o CS₂ e a amina e posterior contato com a superfície de ouro. Verificou-se [10] que a metodologia que apresentou melhores resultados é a que ocorre num só passo: imobilização do CS₂ (0.1 M) e da amina (0.1 M) na superfície do ouro, com tempo de adsorção de 16 h, em etanol, a uma temperatura ambiente de $\approx 22^{\circ}\text{C}$. No caso de se pretender imobilizar compostos biológicos utilizam-se soluções aquosas tamponadas e a reação ocorreu a 4°C durante 16h.

Com o intuito de aumentar a quantidade de (bio)moléculas imobilizadas covalentemente neste tipo de substratos recorreu-se ao uso de nanopartículas.

Na primeira parte do trabalho, foram introduzidas nanopartículas de ouro (AuNPs 20 nm, 4 nM) na reação entre o CS₂ (1 mM) e compostos eletroativos contendo grupos aminas (epinefrina, triptofano (0.1 M)) incluindo a glucose oxidase e a lacase (1 mg/ml), em soluções orgânicas ou aquosas. Testaram-se ainda outras nanopartículas metálicas (Au -5 nm e Pt - 3 nm) e nanopartículas de Fe₃O₄ (3 mg/mL; diâmetros médios de 20 e 40 nm).

A formação *in situ* de ditiocarbamatos, foi também estendida aos imunossensores [11], fazendo-se reagir o CS₂ e a proteína A, na presença de AuNPs (20 nm). A proteína A é conhecida por apresentar uma grande especificidade para a região Fc do IgG. O IgG imobilizado irá detetar o antigénio, Anti-IgG.

O esquema da figura 2.3 ilustra a metodologia de funcionalização de superfícies de ouro, através da formação de grupos ditiocarbamatos, e na presença de nanopartículas. O CS₂ apresenta um papel fundamental neste tipo de metodologias pois espera-se que para além de reagir com as aminas para formar ditiocarbamatos, na presença de nanopartículas consiga-as ligar fortemente às superfícies de ouro.

As superfícies de ouro preparadas foram posteriormente caracterizadas por técnicas eletroquímicas (voltametria cíclica, cronoamperometria), microscopia de força atômica, espectroscopia fotoeletrônica de raios-X, ressonância de plasmão de superfície, elipsometria convencional e elipsometria de imagem em modo reflexão interna total.

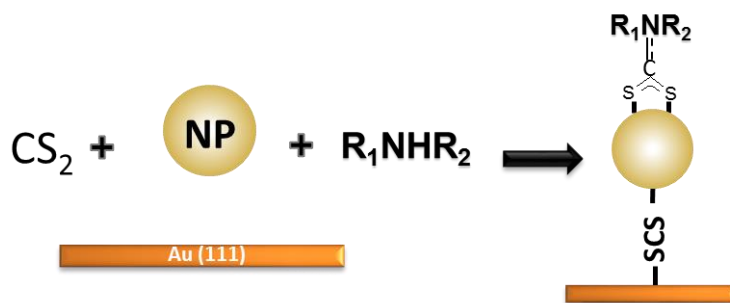


Figura 2.3 – Esquema ilustrativo da metodologia usada para a funcionalização de superfícies de ouro com CS₂, nanopartículas (NP) (Au, Pt ou Fe₃O₄NPs), compostos contendo grupos amina (epinefrina/triptofano/glucose oxidase/lacase), durante 16 h, em meio orgânico (etanol) e aquoso.

A funcionalização das nanopartículas em suspensão coloidal:

i) 250 µL da suspensão coloidal de AuNPs de 20 nm (4 nM) reagiram durante 2 h com 3.75 µL de CS₂ (0.25 mM) e 7.5 µl epinefrina/triptofano (0.50 mM) ou de 1000 µL GOx (0.1 mg/mL) que foram previamente preparados em etanol ou tampão fosfato. As suspensões foram analisadas por espectroscopia de UV-visível e AFM: a solução de reação foi centrifugada, várias vezes, a 10000 rpm durante 20 min; os *pellets* foram imediatamente dispersos em água milli-Q até ao seu volume original e centrifugados novamente, sendo este procedimento repetido até que o espectro de UV-vis do sobrenadante não exibir qualquer banda de absorção de composto;

ii) 250 µl das suspensões aquosas de Fe₃O₄NPs foram colocadas em contato (2 horas) com 3.75 µL de CS₂ (0.25 mM) e 7.5 µl de Hexilmetilamina (0.50 mM) preparadas em meio aquoso. Após este tempo, utilizando um magnete, as soluções foram “lavadas” com água milli-Q, num total de cinco vezes, de modo a assegurar que apenas os compostos que estão ligados às nanopartículas permanecem, enquanto os restantes foram removidos no processo de lavagem.

A suspensão aquosa de Fe₃O₄NPs foi preparada através da adição de 3 mg de Fe₃O₄ em pó a uma solução de tampão fosfato (500 µL) seguindo-se de sonificação durante 15 min.

2.3.2 Imobilização de nanopartículas funcionalizadas com moléculas catalíticas

Com o objetivo de desenvolver novos materiais de eletrodo catalíticos para a ORR, foi explorada uma nova via de imobilização de nanopartículas modificadas em ouro, com compostos que possuem um macrociclo tetrapirrólico (porfirinas de Co e Fe) e com um macrociclo com um centro cobirinato (derivado da vitamina B₁₂, B₁₂C₁₀SSC₁₀), utilizando o CS₂ como “ponte”, como ilustrado no esquema da figura 2.4. Foram utilizadas nanopartículas metálicas (Au e Pt) e de óxidos metálicos (Fe₃O₄ e MnFe₂O₄ NPs).

Os procedimentos de modificação de superfícies de ouro foram os seguintes:

i) Au (111) /CS₂/NPs: imersão do eletrodo de Au (111) durante 16h numa solução de 500 µL das NPs e em 1mL de CS₂ em etanol (1.5 mM);

ii) Au (111) ou Au policristalino/CS₂/NPs/porfirina (ou derivado da vitamina B₁₂): 500 µL das NPs foram adicionados a 1 mL do composto organometálico em etanol (1 mM) durante 2 min sob sonificação, seguindo-se a adição de 15 µL de CS₂ em etanol (0.1 M) e imersão do eletrodo de Au, durante 16h;

iii) Au (111) /porfirina (ou derivado da vitamina B₁₂): o Au foi imerso em 1 mM do composto organometálico previamente dissolvido em etanol, durante 16 h;

iv) Au (111)/1,6- hexanoditiol/NPs/porfirina: formação da SAM de 1,6-hexanoditiol (1 mM, em etanol) durante 15 min na superfície de ouro; de seguida o eletrodo modificado foi lavado exaustivamente com água e etanol e colocado em contato com uma solução aquosa consistindo em 500 µL de NPs e de 1 mL da solução de porfirina (1 mM) previamente preparado em etanol.

O tempo de reação entre as NPs e os compostos organometálicos, antes de se colocar em contato com CS₂ e Au, foi investigado durante 120 min, não se registando diferenças significativas após 2 min.

Após o tempo de modificação (16 h), os elétrodos foram cuidadosamente lavados com etanol e água milli-Q, a fim de remover as moléculas que não ficaram fortemente adsorvidas, e secos sob um fluxo constante de azoto.

Os elétrodos modificados foram caracterizados por técnicas eletroquímicas e por microscopia de força atômica.

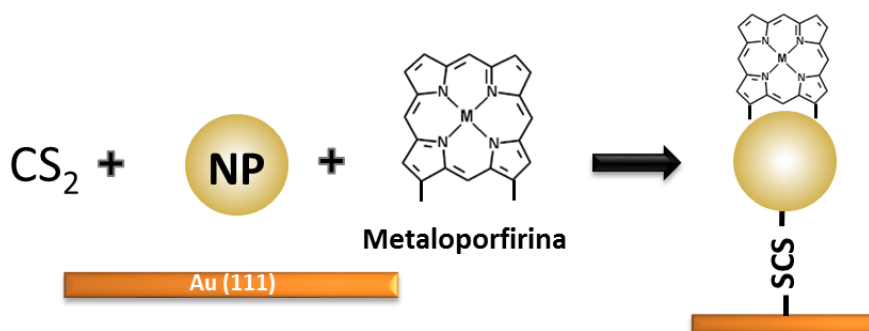


Figura 2.4 – Esquema ilustrativo da metodologia usada para a funcionalização de superfícies de ouro envolvendo o CS_2 , nanopartículas, (Au, Pt, Fe_3O_4) e a metaloporfirina (ou um derivado da vitamina B_{12}).

Em suspensão coloidal, a funcionalização das nanopartículas decorreu conforme os procedimentos descritos em baixo e a respetiva caracterização foi realizada por espectroscopia de UV-visível:

i) 250 μ L das AuNPs (20 nm) em suspensão coloidal foram misturados com 1.25 mL metaloporfirina (0.66 mM) previamente dissolvida em etanol. Após 2 min, a solução foi centrifugada, várias vezes, a 10000 rpm durante 20 min e o sobrenadante resultante de cada centrifugação foi removido e analisado por espectroscopia UV - vis. Os *pellets* foram imediatamente dispersos em água milli-Q até ao seu volume original e centrifugados novamente até que o espectro de UV-vis do sobrenadante não exibir qualquer banda de absorção de metaloporfirina;

ii) 250 μ l das suspensões aquosas de Fe_3O_4 NPs (20 e 40 nm) foram colocadas em contato com 1.25 mL de metaloporfirina (0.66 mM), previamente dissolvidas em etanol, durante 2 min. Após este tempo, e utilizando um magnete, as soluções foram “lavadas” com água milli-Q, num total de cinco vezes, de modo a assegurar que apenas

as espécies fortemente ligadas às nanopartículas estavam presentes, enquanto os compostos restantes foram removidos no processo de lavagem.

2.3.3 Formação de bicamadas lipídicas

Com o intuito de criar um ambiente biomimético mais apropriado para os eventos de bio-reconhecimento que ocorram nos imunossensores foram testados dois procedimentos diferentes de modificação de superfícies de ouro envolvendo a formação de bicamadas lipídicas suportadas em Au (figura 2.5). Um consiste na formação de uma SAM de ácido 11-mercaptoundecanóico na superfície do eletrodo antes da deposição do lípido e no outro, as vesículas preparadas já contém uma percentagem de um alcanotiol (1-decanotiol) sendo posteriormente depositadas no ouro.

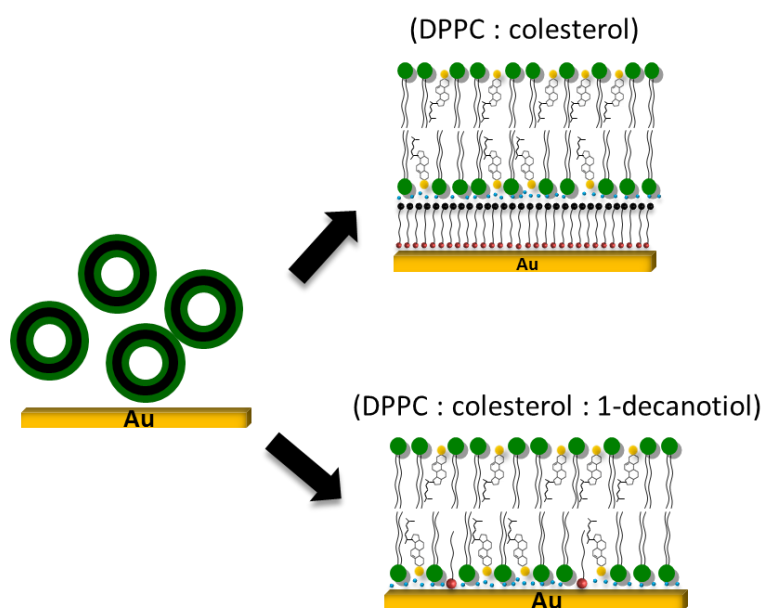


Figura 2.5 – ilustração de dois procedimentos testados para a funcionalização de superfícies de ouro com base na deposição de bicamadas lipídicas.

i) Modificação de Au (111) com SAMs de ácido mercaptoundecanóico e decanotiol

A formação de monocamadas puras destes dois compostos foi efetuada por imersão de eletrodos de ouro numa solução com 1mM de cada composto em etanol durante 18 h. Após este tempo de incubação os eletrodos foram lavados

abundantemente com água milli-Q e etanol para remover as moléculas que não estão ligadas à superfície do eletrodo.

ii) Formação de bicamadas lipídicas suportadas de DPPC/colesterol (70:30 mol %) numa superfície de ouro previamente modificada com uma monocamada de MUA.

Preparação e deposição de vesículas unilamelares grandes (*larger unilamellar vesicles*, LUVs):

Inicialmente, prepararam-se soluções de lípidos em clorofórmio espectral. Retirou-se, para um tubo *ependorf*, o volume desejado de cada solução para preparar os lipossomas constituídos por um ou mais lípidos. O solvente foi evaporado sob um fluxo suave de azoto, seguido de secagem sob vácuo 16 h. Os lípidos foram hidratados para uma concentração final de 1 mM com o tampão Hepes (10 mM, com 150 mM NaCl), encontrando-se o tampão a uma temperatura superior à temperatura de transição (T_m) dos lípidos (por exemplo, para o DPPC é de 41°C). Em seguida a solução foi submetida a agitação num vórtex e a 3 – 5 ciclos de congelamento (em azoto líquido) – descongelamento a $T > T_m$ [12]. Para a deposição em ouro, a amostra foi extrusada a 60°C com um extrusor (Avanti Polar Lipids) contendo filtros cujo diâmetro do poro é de 400 nm, obtendo-se uma suspensão de LUV's. Neste tipo de procedimentos, a utilização de um tampão contendo cálcio é importante, na medida em que este não favorece a interação entre os lípidos e a superfície modificada [13, 14].

Da solução extrusada retiraram-se 150 µL que foram depositados sobre superfícies de ouro, com ou sem modificação, por um período de 1h numa estufa a ~ 60 °C. Durante este período, as vesículas adsorvem à superfície do substrato, fundem-se e sofrem a rutura formando uma bicamada como esquematizado na figura 2.6.

Após este período, as amostras foram retiradas da estufa e colocadas à temperatura ambiente, seguindo-se um período de incubação de mais de 1 h. Para

remover as vesículas que não se fundiram, a superfície de ouro foi lavada com tampão Hepes.

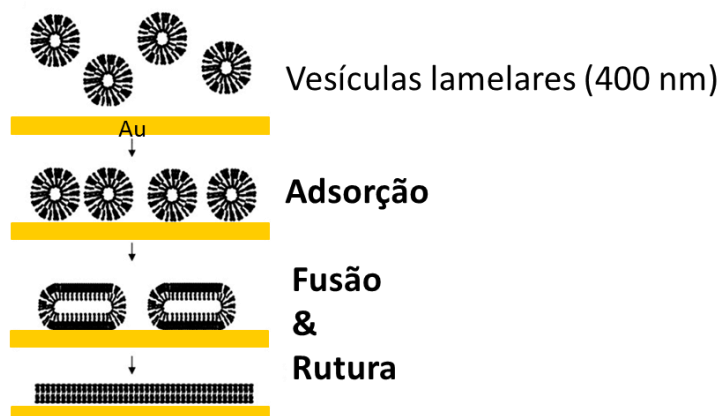


Figura 2.6 – Esquema ilustrativo da adsorção, fusão e rutura de vesículas na superfície de ouro.

iii) Preparação de bicamadas lipídicas suportadas em Au de DPPC/colesterol/decanotiol (65:30:5 mol %)

À solução *stock* de 1-decanotiol em etanol foi retirado o volume necessário para obter uma concentração final de 1mM, que foi adicionado ao DPPC e ao colesterol. Todos os compostos foram secos em conjunto. O procedimento subsequente para preparar as LUV com o tiol foi idêntico ao descrito anteriormente.

iv) Ativação da superfície de ouro modificada com a bicamada lipídica DPPC/Colesterol/decanotiol (65:30:5 mol %)

Após a formação da bicamada lipídica sobre a superfície de ouro e com o intuito de imobilizar covalentemente o anticorpo para o evento de bioreconhecimento, o substrato foi submerso em 0.2 M EDC e 0.05 M de NHS durante 1 h, com o objetivo de ativar os grupos fosfatos dos DPPC's [15]. Após este período, o substrato foi lavado com tampão Hepes.

As reações de reconhecimento biológico foram realizadas por ressonância de plasmão de superfície, elipsometria convencional, elipsometria de imagem,

elipsometria de imagem em modo de reflexão interna total e microscopia de força atômica.

2.4 Caracterização de suspensões coloidais e superfícies modificadas

2.4.1 Morfologia, distribuição de tamanhos e características óticas no UV-visível das nanopartículas em suspensão coloidal (TEM, XDR, UV-vis)

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foi utilizada na caracterização morfológica e distribuição de tamanho de partícula nas suspensões coloidais de nanopartículas de Au, Pt e Fe₃O₄. Esta técnica permite analisar o tamanho, forma e estrutura cristalina que constituem a amostra e dependendo do sistema, até à escala dos diâmetros atômicos, incluindo o arranjo atômico (organização e defeitos) na gama de poucos nanômetros. Com base na imagem real executada pelo feixe eletrônico transmitido é possível a observação das amostras. Assim, as zonas escuras (mais espessas ou mais densas) e claras (mais finas ou menos densas) da imagem obtida correspondem a partes da amostra através das quais foram transmitidos maior e menor quantidade de elétrons, respetivamente. Os elétrons transmitidos, defletidos do seu percurso original por átomos da amostra sem perda de energia, obedecem à lei de Bragg e portanto são difratados de acordo com: $\lambda = 2d \sin\theta$.

Neste trabalho, as amostras para análise por TEM foram preparadas colocando uma ou várias gotas da amostra sobre uma rede de cobre recoberta por um polímero (*formvar*), deixando-se evaporar.

Equipamento: Hitachi H8100 Electron Microscope acoplado com um espectrómetro de raios-x de dispersão de energias operando a uma voltagem de aceleração de 200 kV, localizado no ICEMS do Instituto Superior Técnico.

As nanopartículas de Fe₃O₄ “em pó” foram caracterizadas por difração de raios-X (XRD) [40] de modo a analisar a estrutura cristalina e a pureza deste tipo de nanopartículas. Os parâmetros de célula foram calculados usando o programa FullProf [16] e, o tamanho médio da cristalite (<D>) foi estimado através da equação de Debye-

Scherrer, assumindo a forma esférica das nanopartículas e um comprimento de onda de 1,5406 Å, que corresponde ao comprimento de onda da âmpola de raios-X usado, que neste caso é uma âmpola de Cu.

A difração de raios-X (XRD) é uma técnica analítica não-destrutiva e pode ser usada para caracterizar os materiais cristalinos, determinando a sua estrutura (por ex. o tipo de empacotamento no estado cristalino, tamanho e forma da célula unitária), por comparação dos parâmetros obtidos com os das fichas publicadas pelo JCPDS-ICDD (Joint Committee on Powder Diffraction Standards, International Centre for Diffraction Data).

Equipamento: Phillips Analytical PW 3050/60 X'Pert PRO, com varrimento entre os valores de 2θ de 30° a 80° , com passo de $0,010^\circ$ e tempo por passo de 5,000 s. O controlo do difractómetro e a aquisição de dados foi efetuada automaticamente através de um computador acoplado ao equipamento e do software Phillips PC – APD versão 3.5B. Os espectros obtidos foram adquiridos e analisados pela Professora Maria de Deus Carvalho e seus colaboradores.

As nanopartículas de Au e de Fe_3O_4 também foram caracterizadas por espectrofotometria de UV-visível antes e após modificação com os compostos de interesse, em suspensão coloidal.

As AuNPs apresentam uma particularidade ótica muito importante, relativamente a outro tipo de nanopartículas. Estes nanomateriais apresentam bandas de absorção na região do UV - visível que correspondem a oscilações coletivas dos eletrões na banda de condução das partículas em ressonância com a onda eletromagnética da luz. Este fenómeno ótico é designado de ressonância de plasmão de superfície [17-19] (figura 2.7a). O espectro de absorção obtido nesta região do UV-visível para a suspensão coloidal de nanopartículas metálicas (por exemplo, AuNPs com 20 nm) (figura 2.7b) é afetado por vários fatores, tais como o tamanho e a forma das partículas, pois estes influenciam a posição e a intensidade da banda de absorção, mas também o solvente usado e a presença de estabilizadores [20, 21].

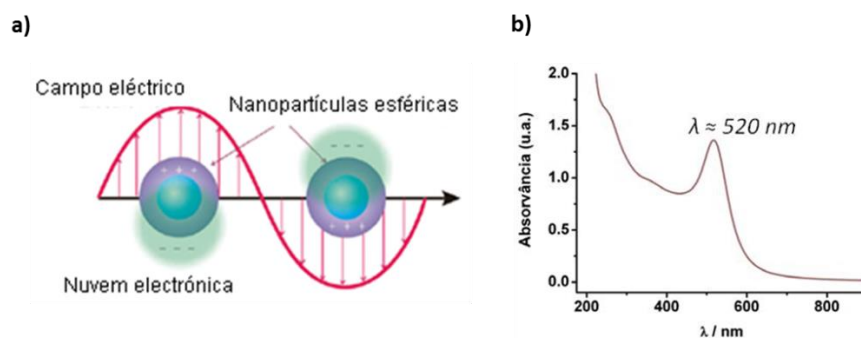


Figura 2.7 - Representação esquemática da oscilação coletiva dos elétrons livres numa nanopartícula metálica sob o efeito da onda eletromagnética da luz (adaptado de [22]) e do espectro de absorção característico de nanopartículas de ouro [23].

O fenómeno de absorção de radiação UV-visível também ocorre em compostos cuja estrutura apresenta grupos funcionais com ligações covalentes insaturadas e/ou elétrons não-ligantes resultantes da presença de heteroátomos (e.g., azoto e oxigénio), como é o caso das metaloporfirinas. Estes grupos funcionais absorvem energia na zona UV-visível, promovendo a transição de elétrons de um estado eletrónico de baixa energia (estado fundamental) para um estado de maior energia (estado excitado). Estas transições ocorrem preferencialmente de uma orbital molecular ocupada de maior energia (HOMO) para uma orbital desocupada de menor energia (LUMO) [24]. Por este motivo, as metaloporfirinas, que são sistemas aromáticos altamente conjugados, apresentam um espectro de absorção caracterizado por transições $\pi \rightarrow \pi^*$, interpretadas com base no modelo das “quatro-orbitais” (2 orbitais π HOMO e 2 orbitais π^* LUMO) [24, 25]. Tendo em conta este tipo de transições eletrónicas, o espectro de absorção das metaloporfirinas apresenta uma banda de grande intensidade entre os 400–420 nm, designada a banda Soret ou banda B, correspondente à transição ($S_0 \rightarrow S_2$) permitida pelas regras de simetria, e quatro bandas de menor intensidade entre os 500–700 nm, as bandas-Q, correspondentes a transições ($S_0 \rightarrow S_1$) proibidas pelas regras de simetria. A intensidade destas bandas-Q é variável e está diretamente relacionada com o tipo e a posição dos grupos substituintes do macrociclo, os quais podem estabilizar ou destabilizar as orbitais HOMO e LUMO do anel porfirínico [25].

Foi ainda possível seguir por espectroscopia de UV-visível, como reportado pelo Wei e colaboradores [26], a formação de grupos de ditiocarbamatos através do aparecimento de duas bandas a 260 e 290 nm localizadas na região do UV.

Equipamento: UV-2600, Shimadzu.

As nanopartículas de ouro estabilizadas por iões citrato e de óxido de ferro foram também analisadas por microscopia de força atômica (AFM). As amostras foram preparadas através da colocação de uma gota (50 μ L) da suspensão coloidal numa superfície de mica previamente limpa por clivagem numa direção paralela às faces do cristal. Após aproximadamente 15 min., estas foram secas com fluxo de N₂. A descrição da técnica é exibida de seguida.

2.4.2. Análise topográfica e estrutural das superfícies de ouro modificadas (AFM, XPS)

A caracterização morfológica das superfícies de Au foi realizada por microscopia de força atômica (*atomic force microscopy*, AFM), em condições ambientais.

O fator comum em todas as técnicas de microscopia de varrimento de sonda é o uso de uma ponta muito afiada, que geralmente é feita de silício ou nitreto de silício, montada na extremidade de um *cantilever* (braço flexível). A ponta interage diretamente com a superfície e analisa as forças repulsivas e atrativas que existem entre a ponta e a amostra. À medida que a ponta percorre a superfície e varre uma área, as interações entre a ponta e a amostra provocam deflexões no *cantilever* (que podem ir até à escala picométrica), que vão sendo monitorizadas através de um laser que incide sobre a parte superior do *cantilever* e será refletido para um fotodetector, geralmente composto por quatro fotodíodos, produzindo uma imagem topográfica de alta resolução (figura 2.8) [27]. A amostra pode ser montada diretamente no *scanner* ou o conjunto ponta-*cantilever* ser montado no *scanner* encontrando-se acima da amostra. Os materiais do scanner são piezoelétricos e caracterizam-se por sofrerem uma deformação das suas dimensões em resposta à aplicação de um campo elétrico. Se

as voltagens aplicadas forem perfeitamente controladas, podem ser efetuados movimentos extremamente precisos em x, y e z [28].

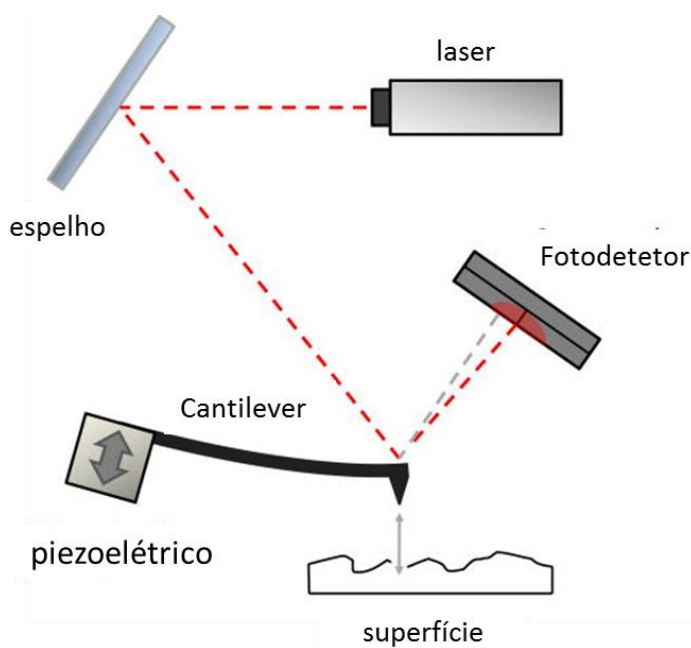


Figura 2.8 – Esquema ilustrativo de um microscópio de força atômica, adaptado de [29].

Um microscópio de força atômica pode funcionar em diferentes modos operativos, que devem ser escolhidos consoante o tipo de amostra (dependendo da topografia, do material, etc.) e a informação que se pretende obter (topográfica, de fase, curvas de força-distância, etc). Os três modos mais comuns são o modo contacto, não-contacto e intermitente (*tapping*).

Considerando o tipo amostra analisado e a informação que se pretendeu obter, apenas se irá descrever o modo contacto intermitente ou *tapping* pois foi o utilizado neste trabalho, pois além de ser muito versátil é adequado ao estudo de várias interfaces, nomeadamente com biomoléculas. Neste modo operativo a ponta oscila a uma frequência próxima da sua frequência de ressonância, aproximando-se da amostra ocorrendo o contacto, que leva a uma diminuição da amplitude de oscilação da ponta. A amplitude de oscilação da ponta é mantida constante usando um ciclo de retroação de forma a elevar ou baixar a amostra. Este modo oferece a possibilidade de fornecer informação adicional à topográfica, através das variações de fase da oscilação

da ponta, que ocorrem devido à presença de materiais com propriedades distintas, tais como dureza e viscoelasticidade [27, 28].

Esta técnica microscópica foi crucial neste trabalho para avaliar cada passo de modificação da superfície de ouro, e em particular na presença das nanopartículas, permitindo avaliar a sua distribuição/dispersão na superfície do ouro. O AFM fornece ainda um contributo muito importante no estudo das bicamadas lipídicas suportadas em ouro, avaliando a separação de fase e a espessura dos domínios lipídicos formados.

Equipamento: Multimode Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Veeco).

As imagens foram obtidas em modo contacto intermitente (*tapping*) com pontas de silício (Si) (TESP, frequência de oscilação ~300 kHz), a uma velocidade de aquisição de ~ 1.7 Hz.

Para a caracterização estrutural dos compostos químicos adsorvidos nos eléctrodos Au recorreu-se à espectroscopia fotoeletrónica de raios-X (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*, XPS). Esta técnica permite, com clareza, caracterizar a composição química dos compostos adsorvidos na superfície do eléctrodo, através da identificação das bandas ionização (tais como, S2p, C1s, N1s) dos elementos químicos presentes na superfície do ouro (S, C, N). O estudo de superfícies por XPS baseia-se na análise do espectro de emissão de electrões, que contém picos com energias características em resultado de dois processos físicos fundamentais, emissão de electrões por efeito fotoelétrico e a emissão de electrões Auger. Esta técnica apresenta uma elevada sensibilidade à composição química da superfície devido aos electrões com energias até cerca de 2 keV.

Equipamento. Microlab 310 F (Thermo Electron-former VG Scientific), com um ânodo de Mg (monocromado), um analisador hemisférico concêntrico e foi operado sob pressões mais baixas que 5×10^{-9} mbar, utilizando uma radiação Al (monocromador). Os espectros foram obtidos em modo CAE (30 eV) e com uma tensão de aceleração de 15 kV. A quantificação de cada pico foi determinada após ajustamento obtido pela

função do produto Gaussian – Lorentzian e o algoritmo foi baseado na otimização Simplex (Software Advantage).

As análises aos elétrodos modificados foram realizadas em colaboração com a professora Maria de Fátima Montemor do ICEMS do Instituto Superior Técnico.

2.4.3 Estudos eletroquímicos (voltametria cíclica e cronoamperometria)

A realização de estudos eletroquímicos, particularmente de voltametria cíclica, pode contribuir significativamente para responder a uma série de questões sobre elétrodos modificados: natureza química das espécies adsorvidas, a sua estabilidade, empacotamento, organização, etc.

O aparecimento de picos anódicos ou catódicos num voltamograma cíclico, como exemplificado na figura 2.9, indica a oxidação e redução de espécies à superfície do eletrodo de trabalho, sendo associável uma corrente de pico anódica (i_p^{red}) e catódica (i_p^{ox}), e um potencial de pico anódico (E_p^{red}) e catódico (E_p^{ox}) [30].

É possível deduzir se a espécie em estudo está adsorvida numa superfície ou em solução, uma vez que o comportamento voltamétrico é muito distinto. Esta diferença pode ser explicada tendo em conta que a componente da corrente devido à transferência de massa (i.e. difusão das espécies eletroativas) é nula quando estas espécies estão adsorvidas na superfície do eletrodo. Quando a transferência eletrónica da espécie adsorvida é reversível obtém-se um voltamograma cíclico com picos simétricos, relativos aos processos de oxidação e redução (figura 2.9a), devido à quantidade fixa de reagente adsorvido na superfície. A corrente sobe de ~ 0 para o seu máximo e cai para perto de 0, após o pico, indicando que o reagente é totalmente consumido.

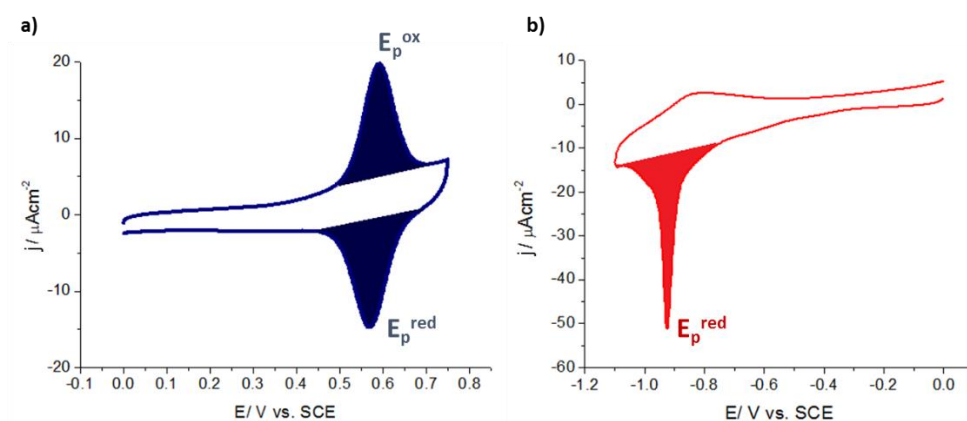


Figura 2.9 – a) Voltamograma cíclico correspondente a, a) um processo redox reversível de uma espécie adsorvida à superfície do eletrodo; b) desadsorção redutiva de espécies não eletroativas de uma monocamada imobilizadas na superfície do eletrodo.

No caso das espécies redox estarem adsorvidas no eletrodo de trabalho, prevê-se a linearidade entre a densidade de corrente de pico (j_p) e a velocidade de varrimento (v) [30]:

$$j_p = \frac{n^2 F^2 A \Gamma}{4RT} v \text{ (eq. 1)}$$

Onde, j_p , é a densidade de corrente de pico em $A \cdot cm^{-2}$; n , é o número de eletrões envolvidos; F , é a constante de Faraday (96485 C mol^{-1}); R , é a constante dos gases perfeitos ($8.3144 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$); T , é a temperatura em K ($20^\circ\text{C} = 293.25 \text{ K}$); Γ , é o recobrimento superficial em mol cm^{-2} , A , área geométrica do eletrodo de ouro (cm^2) e v a velocidade de varrimentos (Vs^{-1}).

A carga Q , envolvida nos processos faradaicos, obtida por integração da corrente, permite estimar o valor de recobrimento superficial, Γ , através da equação seguinte,

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \text{ (eq. 2)}$$

Desta expressão podemos então obter a cobertura de superfície, que é calculada através da integração da área do pico (processos de oxidação ou redução) após ter sido definida uma linha de base (figura 2.9) de forma a limitar a área correspondente ao processo redox que ocorre a uma dada velocidade de varrimento, ou seja, a carga elétrica (Q), tendo em conta o número de eletrões envolvidos na reação redox.

É também possível avaliar a estabilidade e organização molecular de monocamadas de derivados de enxofre formadas em ouro por desadsorção redutiva, obtendo informação quantitativa no número de átomos de enxofre adsorvidos [31]. A equação geralmente aceite pode ser descrita por: $Au|SC_nX + e^- \rightarrow Au^0 + XC_nS^-$.

O E_p^{red} correspondente à reação é observado no varrimento catódico (figura 2.9) enquanto no anódico aparece o pico de readsorção; quando se inicia o varrimento catódico seguinte (segundo ciclo), a desadsorção desta monocamada ocorre, normalmente, a um potencial menos negativo, o que traduz a menor organização das moléculas que se re-adsorveram e uma maior permeabilidade aos iões da solução, logo é de esperar que monocamadas menos densas desadsorvam a valores de potenciais mais positivos [31]. Seguindo o procedimento e a equação 2 anteriormente descritos, podemos determinar o recobrimento superficial da monocamada adsorvida na superfície do ouro, ou seja, a concentração superficial de átomos de enxofre, integrando a área do pico de redução e considerando a carga e o número de eletrões associados ao processo.

A cronoamperometria é uma técnica muito útil quando se pretende estudar a atividade biológica de um enzima quando este está imobilizado à superfície do eletrodo. As respostas catalíticas resultam da oxidação ou redução das espécies presentes no sistema, quer no eletrodo ou no eletrólito (centro ativo do enzima, mediador redox, substrato, ou oxigénio), medindo-se a corrente que flui através do eletrodo de trabalho em função do tempo resultante da aplicação de um potencial constante. Esse fluxo de corrente é correlacionado com o gradiente de concentração das espécies oxidadas ou reduzidas na superfície do eletrodo de trabalho [32]. No estudo de cinética enzimática, à medida que se vai aumentando a concentração de substrato, obtém-se um valor de corrente por cada adição de substrato, como exemplificado na figura 2.10. Através dos valores da corrente correspondente ao

patamar de estabilização é possível traçar uma curva I/j vs. $C_{\text{substrato}}$ (figura 2.10) e obter informação cinética e analítica da atividade do enzima e do desempenho do eletrodo modificado como um biossensor.

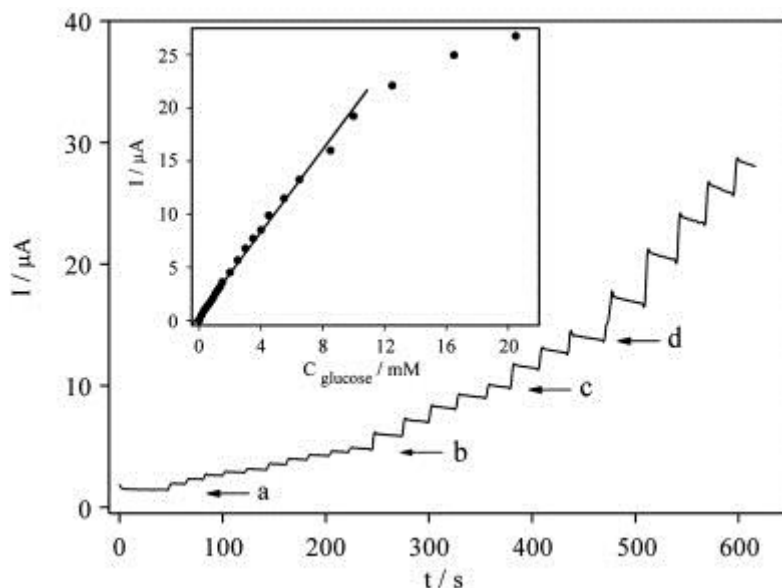


Figura 2.10 – Exemplo de um cronoamperograma obtido após várias adição de glucose e a respetiva representação gráfica de I vs. $C_{\text{substrato}}$, retirado de [33].

Equipamento: PARSTAT 2263 (Perkin Elmer).

O eletrodo de trabalho usado nos ensaios de voltametria cíclica e cronoamperometria, foi uma placa de ouro com dimensões de $1.1 \times 1.1 \text{ cm}^2$ da marca ArrandeeTM, constituída por uma camada de ouro de 200 nm evaporado em vidro borossilicato com uma camada intermédia de crómio (2 - 4 nm) para possibilitar a aderência do ouro ao vidro (figura 2.11 a); o eletrodo de referência foi o eletrodo saturado de calomelanos, Hg/Hg₂Cl₂ saturado em KCl (*saturated calomel electrode*, SCE) e o contra-eletrodo ou eletrodo auxiliar, um fio de platina. A célula eletroquímica utilizada é de um compartimento e encontra-se exemplificada na figura 2.11b. A placa de ouro foi fixa à parte inferior da célula por uma tampa com parafusos e por um O-ring, que define a área do eletrodo de trabalho a 0.57 cm^2 , exemplificado na figura 2.11b. Os restantes eletrodos são colocados na parte superior após a célula estar fechada coma respetiva tampa.

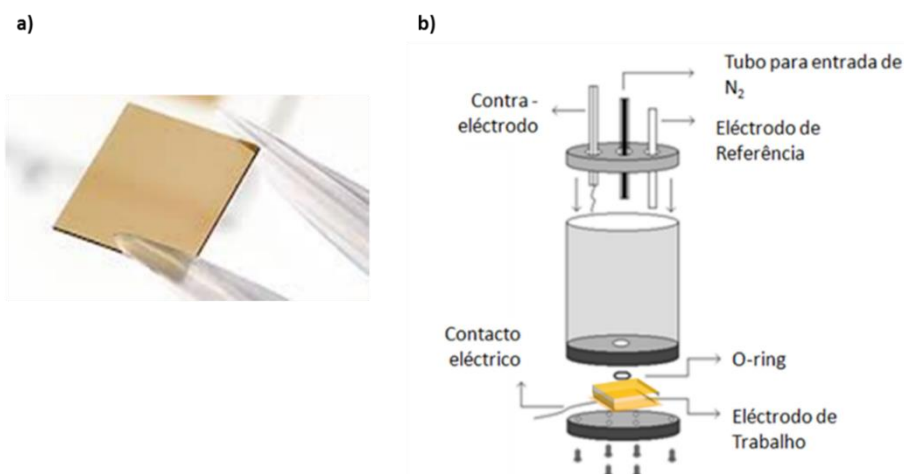


Figura 2.11 – a) Eléctrodo de Au (111) e b) esquema ilustrativo da montagem da célula eletroquímica de 1 compartimento.

A superfície do eléctrodo de Au (111) (figura 2.11a) foi limpa com solução piranha (mistura 3:1 (v/v) de $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$), e se seguida lavada abundantemente com água e etanol, e com um tratamento à chama com gás butano, *flame-annealing*, tornando a superfície de ouro com uma orientação cristalográfica preferencial (111) e uma rugosidade superficial de ca. 1.2 que foi estimado através do método de adsorção química de iodo e está de acordo com os valores reportados para eléctrodos de ouro similares [31, 34, 35]. Para confirmar o estado da superfície do ouro, recorreu-se à Microscopia de Efeito Túnel (STM), para observar os terraços do ouro planos e monoatómicos, com alturas de 0.24 nm característicos da orientação preferencial (111) (figura 2.12).

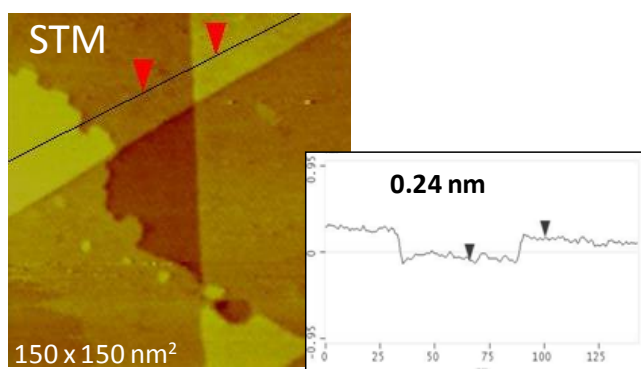


Figura 2.12 – Imagem de STM da superfície do ouro após o processo de *flame-annealing*, com os terraços planos de 0.24 nm característicos da orientação cristalográfica (111).

O elétrodo rotativo de disco e anel (RRDE) é utilizado para estudos de eletrocatalise, em condições hidrodinâmicas controladas [32].

A redução do oxigénio é uma reação energeticamente importante tanto em meio ácido como alcalino e, em geral, pode ocorrer por via de dois tipos de mecanismos diferentes, envolvendo 2 eletrões (formação de H_2O_2) ou 4 eletrões (formação de H_2O). O elétrodo rotativo de disco e anel permite diferenciar os dois tipos de mecanismos, dando informação sobre se existem intermediários (H_2O_2) formados durante a reação. Esta capacidade advém do fato de as espécies geradas no elétrodo de trabalho de disco poderem ser detetadas num segundo elétrodo de trabalho de anel (com controlo de potencial elétrico independente) colocado à volta do disco numa posição muito próxima deste (340 μm no sistema utilizado). Experimentalmente, no caso da reação de redução de oxigénio molecular, no disco observa-se apenas uma única onda de corrente reductiva que pode corresponder à produção de H_2O ($n=4$) ou H_2O_2 ($n=2$). Se, durante o varrimento de potencial no disco, o anel for mantido a um potencial constante e suficiente para promover a oxidação do H_2O_2 , desenvolver-se-ão correntes anódicas no anel caso o peróxido tenha sido formado no disco, ou não dará qualquer resposta se a redução do oxigénio no disco tiver envolvido 4 eletrões, com a formação direta de água (figura 2.13).

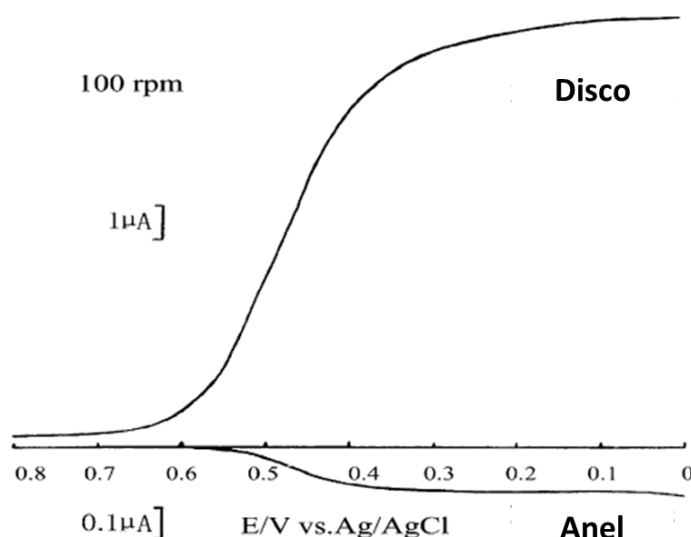


Figura 2.13 – Exemplo de curvas obtidas no disco e no anel com o elétrodo rotativo de disco e anel, adaptado de [37].

O elétrodo rotativo de disco e anel inclui-se no conjunto mais alargado dos designados sistemas hidrodinâmicos [32]. Estes funcionam em modo de convecção forçada apresentam como vantagem fulcral um maior transporte de espécies para o elétrodo, que se traduz num aumento de corrente e maior sensibilidade. A velocidade de rotação, ω , é uma variável independente. Fazendo variar ω , diferentes valores da corrente limite (j_{lim}) são obtidos quando o potencial (E) de elétrodo é varrido. A ω imposta e a corrente limite medida relacionam-se através da equação de Levich (j_{Lev}),

$$j_{lim} = j_{Lev} = 0.62nFD_0^{2/3}C_0^*v^{-1/6}\omega^{1/2} \text{ (eq. 3)}$$

onde, n , número de eletrões; F , constante de Faraday; A , área do elétrodo; D_0 , coeficiente de difusão da espécie; C_0^* , concentração do O_2 no seio da solução ; v , a viscosidade cinemática ($0.01 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para a água a 25°C); ω , a velocidade de rotação.

No caso de processos de transferência eletrónica irreversíveis, onde a reação inversa pode ser ignorada, a relação entre a corrente e a velocidade de rotação do elétrodo é obtida através da equação de Koutecky- Levich [32], que permite a obtenção de parâmetros cinéticos:

$$\frac{1}{j} = \frac{1}{j_K} + \frac{1}{j_{Lev}} = \frac{1}{nFC_0^*k} + \frac{1}{0.62nFD_0^{2/3}C_0^*v^{-1/6}\omega^{1/2}} \text{ (eq.4)}$$

onde, k , é a constante de velocidade da reação (cm s^{-1}) e j_K , representa a corrente na ausência de quaisquer efeitos de transferência de massa (correspondente ao processo a velocidade de rotação infinitamente elevada).

Equipamento: Bipotenciostato EG&G modelo 366, acoplado a um sistema de rotação Oxford Electrodes e um registador Yokogawa (A3 X-YY, model 3023).

Nos ensaios eletroquímicos com o elétrodo rotativo de disco e anel foi utilizada uma célula de três compartimentos (figura 2.14a) e um elétrodo de disco e anel de

ouro policristalino (figura 2.14b), como elétrodos de trabalho, tendo-se utilizado o eletrodo saturado de calomelanos como referência e uma placa de platina como contra eletrodo. As dimensões do eletrodo rotativo de disco e anel de ouro (figura 2.14b) são $A_{\text{anel}} = 0.062 \text{ cm}^2$, $A_{\text{disco}} = 0.416 \text{ cm}^2$. Antes de ser modificado o eletrodo foi polido em suspensões de alumina de 5, 1 e $0.3 \mu\text{m}$ (Al_2O_3 , Buehler) até se obter um nova e limpa superfície de ouro, lavando exaustivamente com água Milli-Q.



Figura 2.14 - a) Célula eletroquímica de 3 compartimentos e b) eletrodo de Au policristalino.

As soluções utilizadas como eletrólitos foram previamente desarejadas com azoto (99.99997%) ou com ar, através de uma bomba de ar, durante 20 min antes de serem utilizadas.

2.4.4 Medição dos parâmetros elipsométricos e determinação da espessura de filmes finos (elipsometria convencional)

Para avaliar a modificação das superfícies de ouro e o sucesso de cada passo do processo de modificação recorreu-se à elipsometria convencional, uma vez que a alteração dos parâmetros elipsométricos permite estimar a espessura do “filme” formado nestas superfícies. A elipsometria é uma técnica ótica, não destrutiva, que se baseia na medição de alterações na polarização da luz causadas pela interação da luz com um dado material de forma a obter informações sobre as propriedades óticas do material. Quando um feixe de luz polarizada se propaga num dado meio e incide numa superfície plana com um determinado ângulo (θ_0) face à superfície, parte deste feixe

será refletido, parte será, eventualmente, absorvido, enquanto o restante será transmitido através do novo meio sofrendo refração, propagando-se com um ângulo θ_1 determinado pelas propriedades óticas dos meios envolvidos, de acordo com a lei de Snell: $n_0 \sin \theta_0 = n_1 \sin \theta_1$, sendo n_j o índice de refração de cada um dos meios [38]. Desta interação o feixe de luz refletido apresenta uma polarização tipicamente elíptica, apresentando desvios de fase (Δ) das componentes ortogonais dos vectores campo eléctrico ou magnético da luz assim como alterações do ângulo azimutal (Ψ) que vão ser medidos pelo equipamento.

Estes parâmetros podem ser medidos de 0 a 360° e 90°, respetivamente e são relacionados pela equação fundamental da elipsometria:

$$\tan \Psi e^{i\Delta} = \frac{\hat{R}^p}{\hat{R}^s} \quad (\text{eq. 5})$$

Onde o \hat{R}^p e \hat{R}^s são os coeficientes de reflexão de Fresnel resultantes da polarizações paralela e perpendicular. No caso de um substrato revestido com um filme fino exposto a um dado ambiente, o valor dos coeficientes de reflexão de Fresnel é o resultado combinado das múltiplas reflexões nas duas interfaces formadas (substrato-filme e filme-ambiente),

$$\hat{R}^p = \frac{\hat{r}_{01}^p + \hat{r}_{12}^p e^{-i\beta}}{1 + \hat{r}_{01}^p + \hat{r}_{12}^p e^{-i\beta}} \quad (\text{eq.6}) \quad \hat{R}^s = \frac{\hat{r}_{01}^s + \hat{r}_{12}^s e^{-i\beta}}{1 + \hat{r}_{01}^s + \hat{r}_{12}^s e^{-i\beta}} \quad (\text{eq.7})$$

Onde, \hat{r}_{ij} é coeficiente reflexão de Fresnel para a interface entre o meio i e j e β um parâmetro proporcional à espessura, d_f , da fase do filme,

$$\beta = 4\pi \left(\frac{d_f}{\lambda} \right) \hat{n}_1 \cos \theta_1 \quad (\text{eq. 8})$$

onde o \hat{n}_1 é o índice de refração complexo do filme.

Os coeficientes de reflexão de Fresnel, \hat{r} , são a razão entre as amplitudes da onda refletida e da onda incidente das componentes ortogonais da luz, e são característicos de uma dada interface e função das propriedades óticas das fases que a constituem:

$$\hat{r}_{01}^p = \frac{\hat{n}_0 \cos \theta_1 - \hat{n}_1 \cos \theta_0}{\hat{n}_0 \cos \theta_1 + \hat{n}_1 \cos \theta_0} \quad (\text{eq. 9}) \quad \hat{r}_{01}^s = \frac{\hat{n}_1 \cos \theta_1 - \hat{n}_0 \cos \theta_0}{\hat{n}_1 \cos \theta_1 + \hat{n}_0 \cos \theta_0} \quad (\text{eq. 10})$$

Nestas circunstâncias, e dado que os coeficientes de reflexão de Fresnel dependem das propriedades óticas dos meios que compõem o sistema, nomeadamente do seu índice de refração, tem-se:

$$(\Psi, \Delta)_{j,i} = f(\hat{n}_j, \hat{n}_i, \lambda, \theta_0)$$

onde λ é o comprimento de onda utilizado.

Quando um meio é óticamente absorvedor os coeficientes de reflexão de Fresnel são quantidades complexas, \hat{r}^p e \hat{r}^s , e o índice de refração, \hat{n} também será

$$\hat{n} = n - ik \quad (\text{eq. 11})$$

em que n é a sua componente real, designada simplesmente por índice de refração, $i = \sqrt{-1}$ e k , denominado coeficiente de extinção, é uma medida da atenuação da intensidade da luz pelo meio, estando relacionado com o coeficiente de absorção, α ,

$$\alpha = 4\pi k / \lambda \quad (\text{eq. 12})$$

Para a situação representada na figura 2.15a, envolvendo apenas dois meios (substrato e ambiente), os parâmetros elipsométricos Ψ e Δ dependerão apenas das propriedades óticas do ambiente (n_a , no caso de uma medida ex-situ) que é normalmente transparente e portanto traduzido apenas pela parte real do índice de refração ($k=0$) e do substrato (índice de refração) complexo no caso de um substrato absorvedor), para além do ângulo de incidência e do comprimento de onda da luz que são parâmetros estabelecidos pelo operador. No caso de existirem três meios presentes, substrato/filme/ambiente, como esquematizado na figura 2.15b, os mesmos parâmetros Ψ e Δ dependerão adicionalmente do índice de refração complexo do filme e da sua espessura, aumentando desse modo a complexidade matemática do sistema. As características de um sistema (parâmetros óticos de cada material, espessura de um filme absorvedor) não podem ser obtidas analiticamente através dos parâmetros elipsométricos. Por essa razão, é necessária a adoção de modelos físicos que traduzam o sistema e utilização de programas de simulação em computador para se tratar e analisar os dados experimentais.

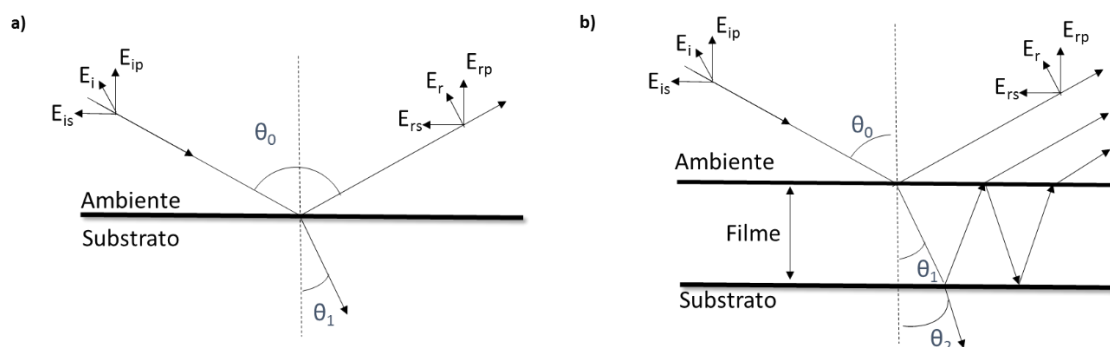


Figura 2.15 – a) Reflexão da luz polarizada na ausência e na b) presença de um filme fino adaptado de [38].

A determinação das espessuras dos filmes foi realizada recorrendo a um programa de ajuste baseado no modelo das três camadas homogêneas (equivalente ao sistema ilustrado na figura 2.15b) [38], fixando a parte real do índice de refração entre 1.48 e 1.50, consistente com o reportado para filmes finos de proteínas ou para bicamadas lipídicas [39, 40].

Equipamento: SE 400 (Sentech Instruments), equipado com um laser de He-Ne ($\lambda=632.8$ nm). As medições elipsométricas foram efetuadas a um ângulo de incidência de 70° em modo PSA (polarizador-amostra-analisador).

2.4.5 Desempenho dos imunossensores (SPR, TIRIE, elipsometria de imagem)

A técnica de ressonância de plasmão de superfície (SPR) é baseada na alteração do índice de refração e é aplicada em estudos de fenómenos de superfície.

Geralmente, os sistemas de SPR operam segundo a configuração proposta por Kretschmann (figura 2.16) [41-43]. A configuração de Kretschmann baseia-se no fenómeno de reflexão interna total. As propriedades óticas do sistema provocam mudanças no ângulo de ressonância do plasmão, tornando possível aplicar o fenómeno de SPR (figura 2.16). A posição do ângulo em que ocorre o máximo de ressonância depende do índice de refração do meio que está em contacto com o metal

e varia proporcionalmente com a concentração das moléculas presentes nesse meio, logo, uma alteração na concentração provoca uma alteração no índice de refração.

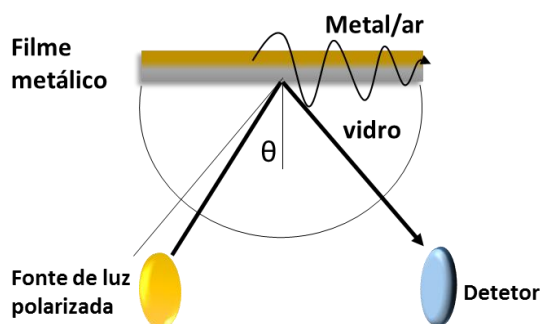


Figura 2.16 - Representação esquemática da configuração de Kretschmann.

Um espectro típico de SPR obtido durante a adsorção de um analito (por exemplo, um anticorpo) sobre uma superfície metálica encontra-se representado na figura 2.17. Inicialmente, a superfície é lavada com uma solução tampão adequada para gerar uma linha de base estável (figura 2.17 - (1)). Após o contato da solução (analito) com a superfície ocorre uma adsorção rápida ou lenta, dependendo da cinética da reação entre o analito e a superfície, originando um desvio do ângulo de ressonância do SPR. O patamar observado no perfil SPR exibido na figura 2.17 é devido à saturação da superfície com o analito [42]. Por último, é injetada novamente a solução tampão, com o intuito de remover as espécies que não estão ligadas especificamente, resultando uma segunda linha de base (figura 2.17 - (2)). A diferença entre a linha de base (1) e (2) fornece uma indicação sobre a extensão da adsorção/interação.

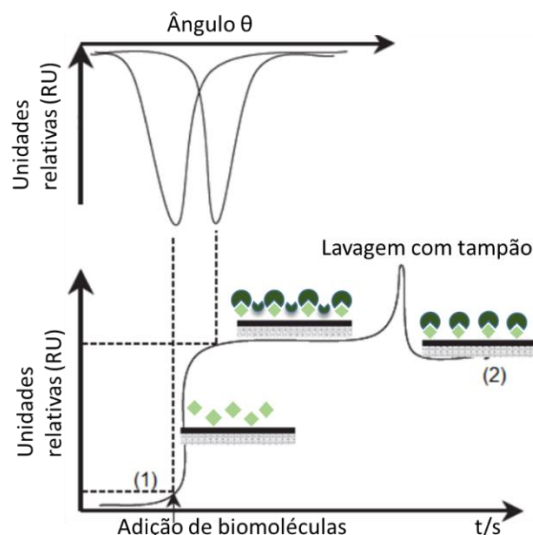


Figura 2.17 - Exemplo de um perfil de SPR e da alteração do ângulo de ressonância após a adsorção/interação de uma biomolécula, adaptado de [43].

Equipamento. BIOSUPLAR 400 T compact Surface Plasmon Resonance Spectrometer produzido pela Analytical μ -Systems acoplado a uma bomba peristáltica (ISMATEC).

Fonte de luz: díodo laser de baixa potência (630 - 670 nm), gama máxima de ângulos: acima dos 17° ; tempo da medição: no modo simples < 20 segundos, no modo *tracking* < 2 s, modo *slope* < 0.1 s; resolução angular: > 0.003° .

As experiências da adsorção/ interação das proteínas com a superfície modificada, em tempo real, foram obtidas usando um fluxo de solução $50 \mu\text{L}/\text{min}$.

Nas experiências de ressonância de plasmão de superfície foi utilizada a célula própria do equipamento (figura 2.18a), que possui dois orifícios/canais, que delimitam a superfície do ouro onde irá ocorrer a reação de bioreconhecimento. Os eletrodos de ouro utilizados nos ensaios de SPR (figura 2.18b) foram adquiridos na Analytical μ -Systems e são constituídos por um filme de 50 nm de ouro depositado em vidro. Antes de serem usados estes eletrodos foram limpos, recorrendo a uma câmara de UV-Ozono (45 min) e foram lavados com água milli-Q e etanol várias vezes.

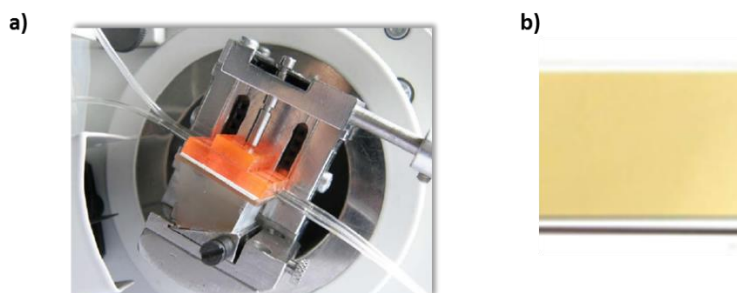


Figura 2.18 – a) Célula reacional do SPR e b) superfície de ouro utilizada nos ensaios de SPR.

Tal como na técnica de SPR, a IE e a TIRIE possibilita seguir uma reação de bio-reconhecimento entre biomoléculas (ex. anticorpo, antigénio), em tempo real. O biossensor TIRIE possui um sistema ótico e sistema microfluídico acoplados [44]. No sistema ótico, o feixe de luz atravessa o polarizador e o compensador e penetra dentro do prisma que está acoplado perpendicularmente. O feixe de luz reflete totalmente na interface do substrato e passa através do analisador acoplado a um dispositivo de imagem de vídeo (*charge-coupled-device*, CCD). A ângulos de incidência próximos do ângulo de Brewster, a onda evanescente forma-se na interface entre a superfície e a camada de proteína. A polarização da onda evanescente é modificada por deposição de camadas de biomoléculas na superfície e por isso o estado de polarização da reflexão interna total sofre alterações ao mesmo tempo.

Estas técnicas são bastante poderosas para o estudo de filmes orgânicos finos pouco absorsores (k baixo) devido à elevadíssima sensibilidade da elipsometria a variações do desvio de fase (Δ) decorrentes de alterações de espessura desses materiais. Fazendo uso de uma câmara CCD com razoável resolução lateral (dimensão do *pixel*) ao invés de um analisador fixo, estas técnicas de imagem permitem explorar com resolução espacial (da ordem dos micrómetros, lateralmente) as capacidades intrínsecas da elipsometria preservando, no entanto, a sua resolução axial (inferior ao nanómetro). Quando efetuada em condições de reflexão nula pelo substrato a uma dada polarização, as variações de intensidade registadas pela luz refletida com essa polarização (traduzidas instrumentalmente numa gama de tons de cinzento - *Grayscale*) são causadas pelo aumento de espessura do filme.

O sistema microfluídico é feito de polidimetilsiloxano e possui um conjunto de 24 células numa arquitetura de 3 x 8 (volume máximo de cada célula $\approx 150 \mu\text{l}$). O sistema está em contacto com uma camada de ouro/superfície (figura 2.19a) com 20-50 nm de espessura depositado por evaporação em vidro. Qualquer solução pode ser injetada individualmente em cada célula pelo sistema microfluídico. A velocidade do fluxo utilizada nos ensaios foi de $5 \mu\text{l}/\text{min}$. Todo o processo cinético de interação da biomolécula numa célula em cada momento é registado em diversas imagens ao longo do tempo (figura 2.19b).

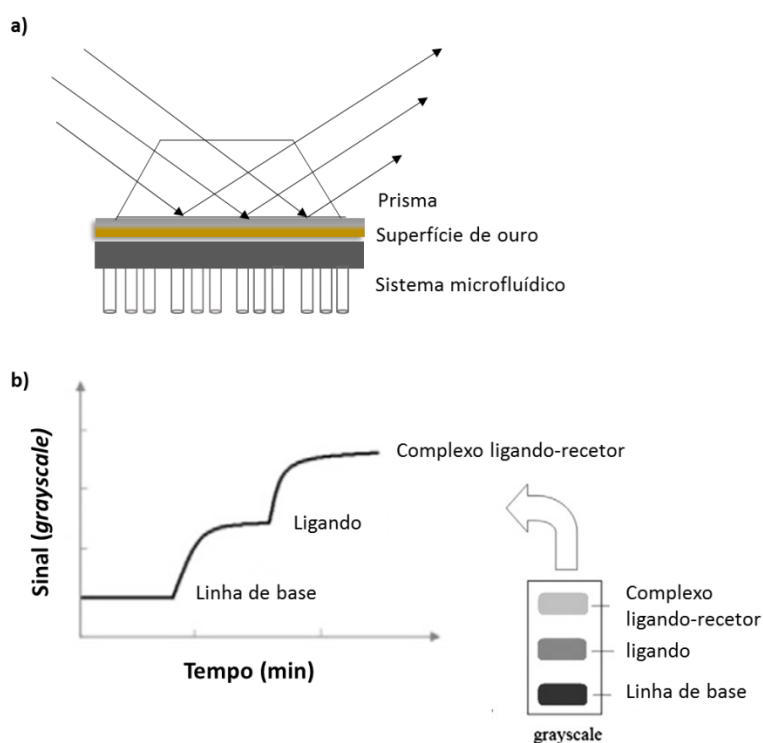


Figura 2.19 – a) Esquema do posicionamento da superfície de ouro, do sistema microfluídico e do prisma; b) Exemplificação de uma curva de TIRIE com as respetivas imagens captadas dos momentos iniciais e finais da interação do anticorpo e do antigénio, expressa em *grayscale* em função do tempo, adaptado de [44].

Equipamento: Elipsómetro de imagem (figura 2.20) e elipsómetro de imagem em modo de reflexão interna total (figura 2.21) desenvolvidos pelo grupo de Professor Gan JIN, no Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China.

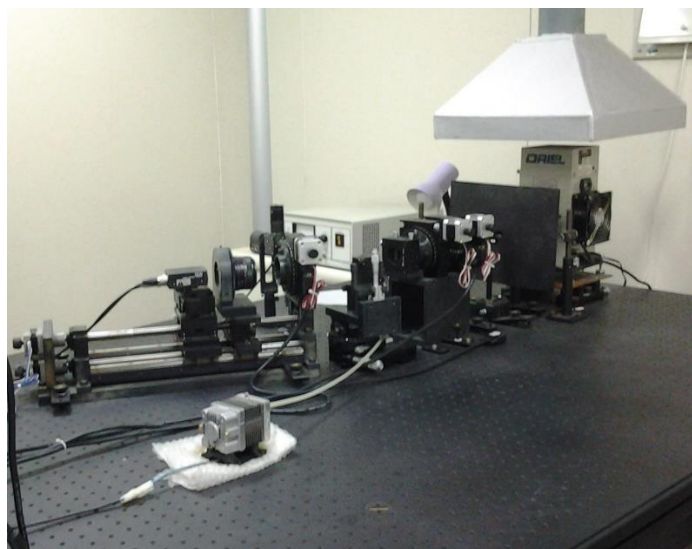


Figura 2.20 – Elipsómetro de imagem

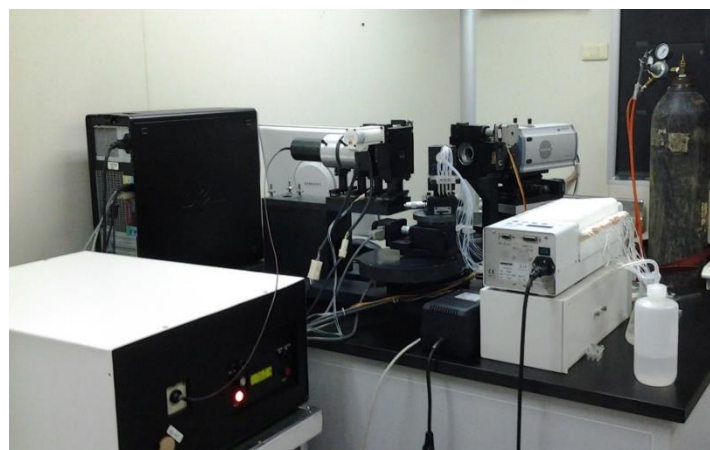


Figura 2.21 - Elipsómetro de imagem em modo de reflexão interna total (TIRIE)

2.5 Referências bibliográficas

- [1] M. Wedel, A. Walter, F.P. Monforts, Synthesis of metalloporphyrins and metallochlorins for immobilization on electrode surfaces, *European Journal of Organic Chemistry*, (2001) 1681-1687.
- [2] C.S. Eberle, A.S. Viana, F.P. Montforts, L.M. Abrantes, Synthesis and self-assembly of a novel cobalt(II) porphyrin lipoic acid derivative on gold, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, World Scientific Publishing Co., 2010, pp. 101-107.
- [3] J. Mendonca, R. Luginbuhl, H. Siegenthaler, R. Keese, Synthesis of disulfides containing a corrinoid head group for preparation of self-assembled monolayers, *Synlett*, (2005) 1901-1904.
- [4] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discussions of the Faraday Society*, (1951) 55-&.

- [5] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, A. Plech, Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited, *The Journal of Physical Chemistry B*, American Chemical Society, 2006, pp. 15700-15707.
- [6] C.M. Sánchez-Sánchez, F.J. Vidal-Iglesias, J. Solla-Gullón, V. Montiel, A. Aldaz, J.M. Feliu, E. Herrero, Scanning electrochemical microscopy for studying electrocatalysis on shape-controlled gold nanoparticles and nanorods, *Electrochimica Acta*, 55 (2010) 8252-8257.
- [7] J. Solla-Gullon, F.J. Vidal-Iglesias, E. Herrero, J.M. Feliu, A. Aldaz, CO monolayer oxidation on semi-spherical and preferentially oriented (100) and (111) platinum nanoparticles, *Electrochemistry Communications*, 8 (2006) 189-194.
- [8] N.R. Jana, L. Gearheart, C.J. Murphy, Seeding Growth for Size Control of 5-40 nm Diameter Gold Nanoparticles, *Langmuir*, American Chemical Society, 2001, pp. 6782-6786.
- [9] M.D. Carvalho, F. Henriques, L.P. Ferreira, M. Godinho, M.M. Cruz, Iron oxide nanoparticles: the Influence of synthesis method and size on composition and magnetic properties, *Journal of Solid State Chemistry*, 201 (2013) 144-152.
- [10] I. Almeida, A.n.C. Cascalheira, A.S. Viana, One step gold (bio)functionalisation based on CS₂-amine reaction, *Electrochimica Acta*, 55 (2010) 8686-8695.
- [11] Y. Niu, A.I. Matos, L.M. Abrantes, A.S. Viana, G. Jin, Antibody Oriented Immobilization on Gold using the Reaction between Carbon Disulfide and Amine Groups and Its Application in Immunosensing, *Langmuir*, American Chemical Society, 2012, pp. 17718-17725.
- [12] M.P. Mingeot-Leclercq, M. Deleu, R. Brasseur, Y.F. Dufrene, Atomic force microscopy of supported lipid bilayers, *Nature Protocols*, 3 (2008) 1654-1659.
- [13] M. Benes, D. Billy, A. Benda, H. Speijer, M. Hof, W.T. Hermens, Surface-dependent transitions during self-assembly of phospholipid membranes on mica, silica, and glass, *Langmuir*, 20 (2004) 10129-10137.
- [14] I. Reviakine, A. Brisson, Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy, *Langmuir*, 16 (2000) 1806-1815.
- [15] Y.D. Zhao, D.W. Pang, S. Hu, Z.L. Wang, J.K. Cheng, H.P. Dai, DNA-modified electrodes; part 4: optimization of covalent immobilization of DNA on self-assembled monolayers, *Talanta*, 49 (1999) 751-756.
- [16] J.R.-C. T. Roisnel, Fullprof Suite, (2011).
- [17] A. Moores, F. Goettmann, The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications, *New Journal of Chemistry*, 30 (2006) 1121-1132.
- [18] J.M. Pitarke, V.M. Silkin, E.V. Chulkov, P.M. Echenique, Surface plasmons in metallic structures, *Journal of Optics a-Pure and Applied Optics*, 7 (2005) S73-S84.
- [19] P. Mulvaney, Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles, *Langmuir*, 12 (1996) 788-800.
- [20] P.K. Jain, I.H. El-Sayed, M.A. El-Sayed, Au nanoparticles target cancer, *Nano Today*, 2 (2007) 18-29.
- [21] V. Myroshnychenko, J. Rodriguez-Fernandez, I. Pastoriza-Santos, A.M. Funston, C. Novo, P. Mulvaney, L.M. Liz-Marzan, F.J. Garcia de Abajo, Modelling the optical response of gold nanoparticles, *Chemical Society Reviews*, 37 (2008) 1792-1805.
- [22] K.L. Kelly, E. Coronado, L.L. Zhao, G.C. Schatz, The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment, *The Journal of Physical Chemistry B*, 107 (2003) 668-677.
- [23] V.ü.C. Ferreira, A.F. Silva, L.M. Abrantes, Electrochemical and Morphological Characterization of New Architectures Containing Self-Assembled Monolayers and Au-NPs, *The Journal of Physical Chemistry C*, American Chemical Society, 2010, pp. 7710-7716.
- [24] B. J.-M., G. R., C. E.-V., T. A., K. K.M., *The Porphyrin Handbook - Inorganic, Organometallic and Coordination Chemistry*, Academic Press 1999.
- [25] M. Gouterman, Spectra of porphyrins, *Journal of Molecular Spectroscopy*, 6 (1961) 138-163.

- [26] H. Zhu, D.M. Coleman, C.J. Dehen, I.M. Geisler, D. Zemlyanov, J. Chmielewski, G.J. Simpson, A. Wei, Assembly of dithiocarbamate-anchored monolayers on gold surfaces in aqueous solutions, *Langmuir*, 24 (2008) 8660-8666.
- [27] N.H. W. R. Bowen *Atomic Force Microscopy in Process Engineering*, 1st Edition, Elsevier 2009.
- [28] D. Ricci, P.C. Braga, *Atomic Force Microscopy Biomedical Methods and Applications*, Humana Press, Totowa, 2004, pp. 3-21.
- [29] R.P. Eason, A.J. Dick, Response Measurement Accuracy for Off-Resonance Excitation in Atomic Force Microscopy, *Journal of Dynamic Systems Measurement and Control-Transactions of the Asme*, 134 (2012).
- [30] B. A.J., F. L.R., *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, 2nd ed., Wiley, New York, 2001.
- [31] M.D. Porter, T.B. Bright, D.L. Allara, C.E.D. Chidsey, Spontaneously organized molecular assemblies .4. structural characterization of normal-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared-spectroscopy, and electrochemistry, *Journal of the American Chemical Society*, 109 (1987) 3559-3568.
- [32] R.R.G. Professor D. Pletcher, Dr R. Peat, Professor L. M. Peter, Dr J. Robinson, *Instrumental methods in electrochemistry*, Southampton Electrochemistry Group, Woodhead Publishing India Private Limited 2011.
- [33] Q. Sheng, K. Luo, L. Li, J. Zheng, Direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on NdPO₄ nanoparticles/chitosan composite film on glassy carbon electrodes and its biosensing application, *Bioelectrochemistry*, 74 (2009) 246-253.
- [34] J.F. Cabrita, L.M. Abrantes, A.S. Viana, N-hydroxysuccinimide-terminated self-assembled monolayers on gold for biomolecules immobilisation, *Electrochimica Acta*, 50 (2005) 2117-2124.
- [35] C.A. Widrig, C. Chung, M.D. Porter, The electrochemical desorption of n-alkanethiol monolayers from polycrystalline au and ag electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 310 (1991) 335-359.
- [36] C. Noguez, M. Wanunu, A rapid approach to reproducible, atomically flat gold films on mica, *Surface Science*, 573 (2004) L383-L389.
- [37] M. Huang, Y. Shao, X. Sun, H. Chen, B. Liu, S. Dong, Alternate Assemblies of Platinum Nanoparticles and Metalloporphyrins as Tunable Electrocatalysts for Dioxygen Reduction, *Langmuir*, 21 (2005) 323-329.
- [38] H.G. Tompkins, *A User's Guide to Ellipsometry*, Academic Press, INC. 1993.
- [39] H. Arwin, Optical-properties of thin-layers of bovine serum-albumin, gamma-globulin, and hemoglobin, *Applied Spectroscopy*, 40 (1986) 313-318.
- [40] R.F.M. de Almeida, L.M.S. Loura, A. Fedorov, M. Prieto, Nonequilibrium phenomena in the phase separation of a two-component lipid bilayer, *Biophysical Journal*, 82 (2002) 823-834.
- [41] N.J. de Mol, M.J.E. Fischer, *Surface Plasmon Resonance Methods and Protocols*, Humana Press 2010.
- [42] *Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors Methods and Applications, Surface Plasmon Resonance Based Sensors*, Springer 2003.
- [43] R.M. de Carvalho, S. Rath, L.T. Kubota, SPR - New tool for biosensors, *Quimica Nova*, 26 (2003) 97-104.
- [44] L. Liu, Y.-y. Chen, Y.-h. Meng, S. Chen, G. Jin, Improvement for sensitivity of biosensor with total internal reflection imaging ellipsometry (TIRIE), *Thin Solid Films*, 519 (2011) 2758-2762.

Capítulo 3

Formação *in situ* de ditiocarbamatos para a construção de biossensores

Parte do trabalho apresentado neste capítulo é objeto dos seguintes artigos:

- I. Almeida, V.C. Ferreira, M.F. Montemor, L.M. Abrantes, A.S. Viana, “One-pot approach to modify nanostructured gold surfaces through in situ dithiocarbamate linkages”, *Electrochimica Acta* 83 (2012) 311– 320
- I. Almeida, F. Henriques, M.D. Carvalho, A.S. Viana, “Carbon disulfide mediated self-assembly of Laccase/ iron oxide nanoconjugates on gold surfaces”, submetido

Têm sido desenvolvidas inúmeras estratégias para a preparação de superfícies para serem usadas como biossensores, onde a atividade biológica da biomolécula não seja comprometida, após a sua imobilização na superfície transdutora [1, 2]. A transferência eletrônica direta entre o centro catalítico do enzima e o eletrodo é frequentemente dificultada devido à estrutura tridimensional da proteína, que poderá impedir a orientação adequada ao transdutor, podendo originar a desnaturação da proteína após a sua adsorção na superfície do eletrodo [3, 4]. Desta forma, parâmetros como a orientação, distribuição, organização e proximidade dos enzimas com as superfícies transdutoras são de extrema importância para a preparação de interfaces para serem usadas como biossensores [5], sendo estes fatores afetados pelo método de imobilização usado.

Como referido no capítulo 1 deste trabalho, a imobilização de biomoléculas em suportes sólidos, incluindo em superfícies planas ou nanoestruturas, através de vários métodos tem sido amplamente explorada. Estes trabalhos incluem metodologias, tais como, a encapsulação sol-gel em matrizes inorgânicas [6], adsorção física, eletrostática ou covalente [7], ou através formação de polímeros [8] ou monocamadas auto-organizadas (SAMs), na presença de nanomateriais (por exemplo, nanopartículas de ouro) [9-12]. Vários estudos têm demonstrado que a formação *in situ* de ditiocarbamatos através da reação entre o CS₂ e grupos aminas, com ênfase nas aminas secundárias [13-16], mas também primárias, como aminoácidos e proteínas [17-19] pode ser utilizada como uma alternativa à formação de monocamadas auto-montadas em ouro [20]. A principal particularidade dos ditiocarbamatos em Au (111) é a ressonância eletrônica entre o azoto, carbono e enxofre [13, 21, 22], a qual é responsável pela forte interação com os substratos de ouro, devido a uma sobreposição de orbitais moleculares do metal e das espécies adsorvidas.

O objetivo do trabalho que será descrito neste capítulo foi desenvolver uma metodologia, simples, versátil e de um só passo reacional [17], para preparar eletrodos nanoestruturados, usando para tal a reação do CS₂ e compostos eletroativos contendo grupos amina, na presença de nanopartículas de ouro (AuNPs) de, aproximadamente, 20 nm ou nanopartículas de óxido de ferro (Fe₃O₄NPs) (diâmetros médios de 20 e 40 nm), em soluções orgânicas ou aquosas.

Com o propósito de testar esta metodologia para imobilizar biomoléculas, foram selecionados dois enzimas, a Glucose Oxidase e a Lacase. Estudou-se a sua atividade catalítica, como resultado da preservação da atividade biológica após o processo de imobilização, avaliando assim, a capacidade desta interface poder ser usada como um biossensor.

3.1 Eléttodos nanoestruturados – nanoprtículas de ouro e platina de ouro

Com base na forte de interação entre o Au e o enxofre, inicialmente foi estudada a reação de um só passo entre AuNPs, CS₂ e compostos eletroactivos “modelo” contendo grupos amina (amina secundária-epinefrina e um aminoácido-triptofano), e de seguida com o enzima Glucose Oxidase. Um esquema ilustrativo desta metodologia encontra-se representado na figura 3.1. Para efeitos comparativos e com o intuito de reforçar o potencial desta metodologia, foram efetuados ensaios similares na ausência de AuNPs ou utilizando uma monocamada de um alcanoditiol, em vez do CS₂, para imobilizar as AuNPs funcionalizadas.

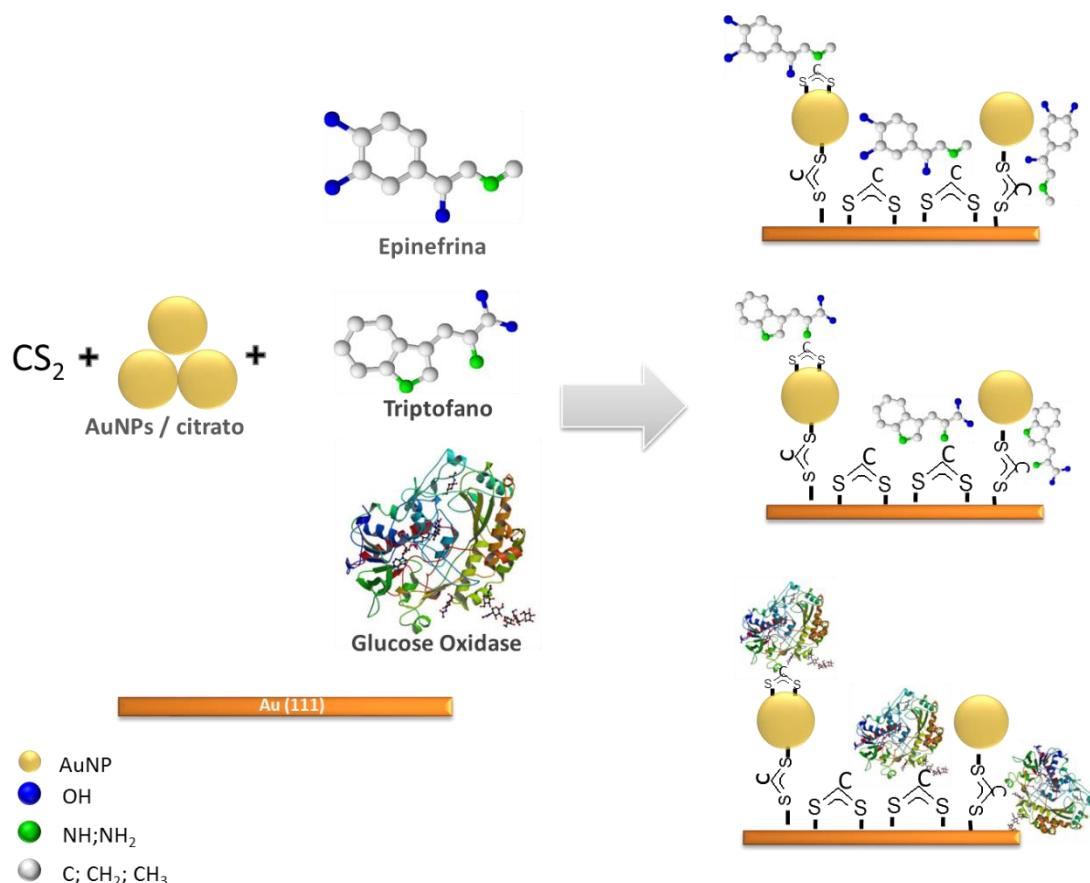


Figura 3.1 - Esquema representativo da metodologia usada para a funcionalização de superfícies de ouro com CS₂ (1 mM), AuNPs (4 nM), epinefrina (0.1 M) ou triptofano (0.1 M) ou Glucose Oxidase (1 mg/ml), durante 16 h, e o tipo de adsorbatos que poderão ter sido formados durante a reação de modificação. As reações foram preparadas em meio orgânico e aquoso, a 22°C e 4°C, respetivamente.

3.1.1 Reação entre o CS₂, epinefrina e triptofano

Os compostos eletroativos “modelo” utilizados na metodologia de um só passo foram a epinefrina e o triptofano. A epinefrina é uma catecolamina e um neurotransmissor no sistema nervoso central e a sua presença no organismo influencia o sistema cardíaco [23-25], enquanto o triptofano é um aminoácido essencial na estrutura das proteínas, com elevada relevância na alimentação humana responsável pela manutenção de um saldo positivo de azoto [26, 27]. Ambos podem ser detetados

por métodos eletroquímicos e segundo as reações de oxidação-redução descritas na figura 3.2.

Como verificado anteriormente [17], o processo redox do triptofano apresenta alguma complexidade. Está reportado que o triptofano na maioria das superfícies estudadas [28] apresenta apenas um único pico de oxidação, que é devido a uma reação irreversível que envolve dois elétrons, originando um intermediário metilenoimina extremamente reativo [29, 30]. Este intermediário pode ser facilmente atacado por grupos nucleófilos presentes na solução da reação, tal como a água com a formação de espécies, como a oxindolalanina, que podem apresentar alguma reversibilidade eletroquímica, embora a extensão da reação de redução seja muito menor do que a do processo de oxidação [26, 28].

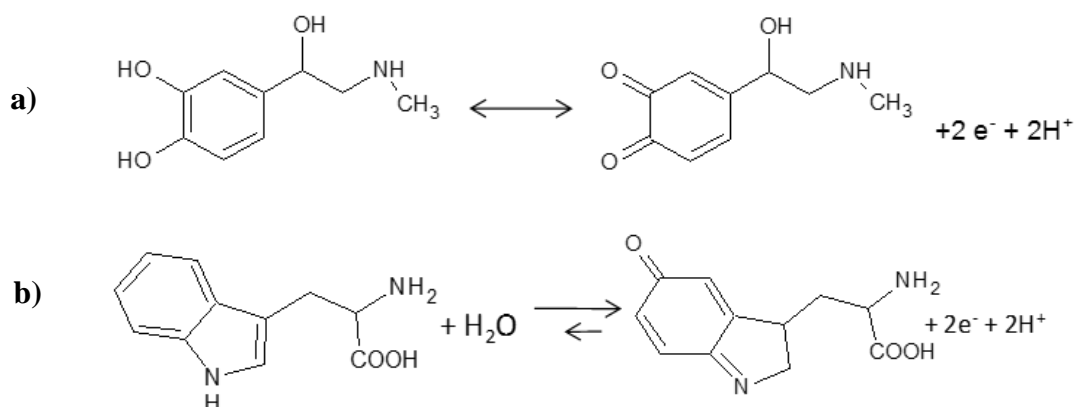


Figura 3.2 – Representação dos processos redox de a) epinefrina e b) do triptofano.

Os voltamogramas cíclicos obtidos para elétrodos de ouro modificados, após a reação da epinefrina e do triptofano com CS_2 em etanol, na presença e ausência de AuNPs, são mostrados nas figuras 3.3a e b, respectivamente. A tabela 3.1 compila os dados eletroquímicos obtidos. A resposta redox da epinefrina e a dependência linear dos picos catódico e anódico com a velocidade de varrimento (figura 3.3a) confirmou a ligação estável da epinefrina ao elétrodo, indicando que o processo redox não é controlado por difusão. Observou-se que na presença de AuNPs, os picos redox da epinefrina são praticamente simétricos ($\Delta E_p \approx 0$), com um potencial de meia-onda ($E_{1/2}$) desviado para valores mais negativos, comparativamente ao observado para os elétrodos de Au (111) modificados na ausência das AuNPs [17]. Estes dados indicaram

que a transferência eletrónica foi facilitada devido à presença das nanopartículas. Foram estimadas as coberturas superficiais dos compostos imobilizados nos elétrodos modificados, com base na integração da área dos picos anódicos, considerando a transferência de 2 eletrões durante a conversão eletroquímica da hidroquinona/quinona (esquema 3.1) [17, 23] e aplicando a equação 2 descrita na secção 2.4.3 do capítulo 2. A adição de AuNPs na reação preparada em etanol resultou, ainda, num aumento significativo na concentração superficial de epinefrina de, 1.3×10^{-10} para 4.0×10^{-10} mol cm⁻² (ca. 70 %), demonstrando a eficácia deste método para imobilizar moléculas pequenas em superfícies de Au (111).

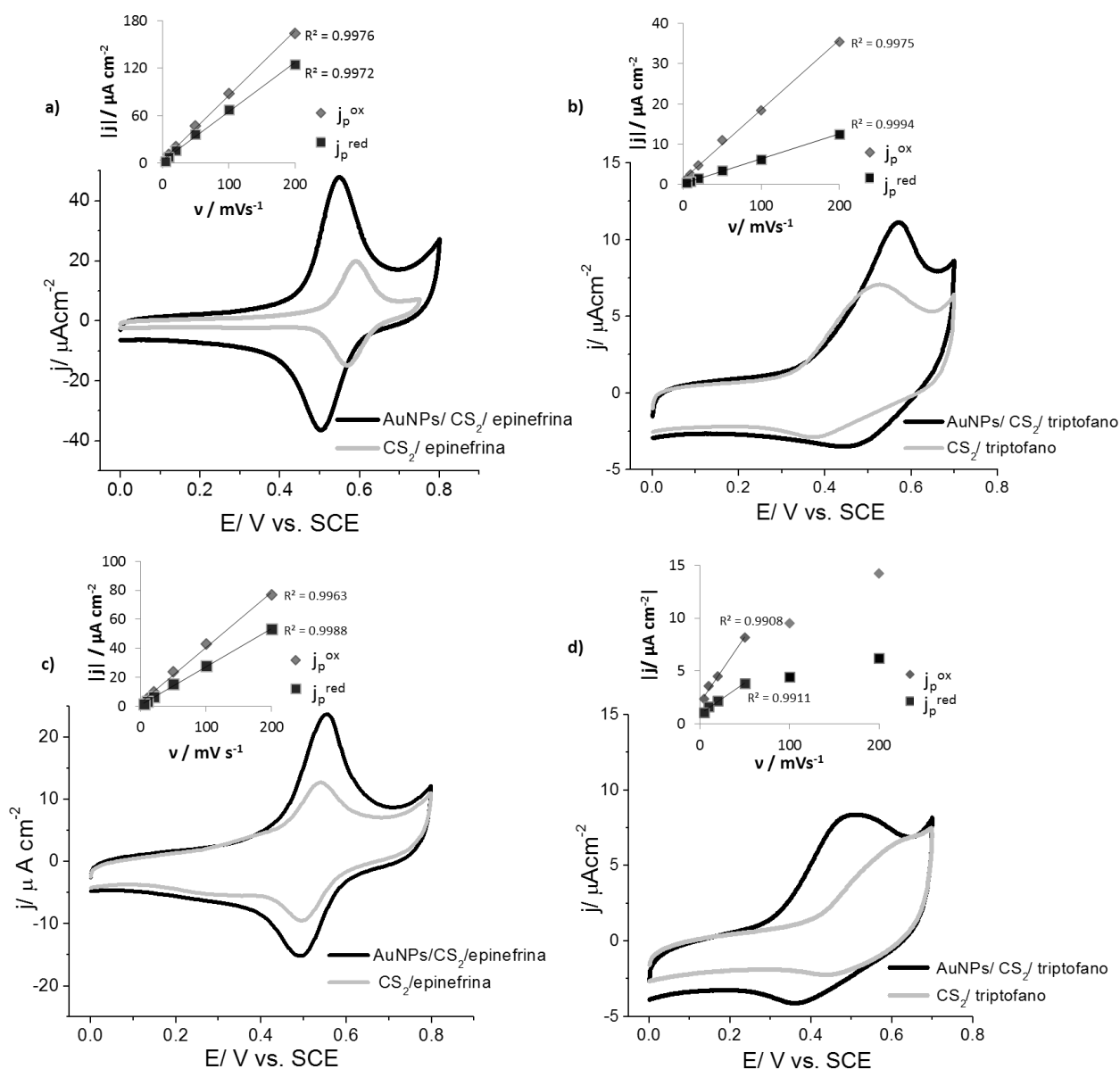


Figura 3.3 – Voltamogramas cíclicos do Au modificado, com CS₂/epinefrina e CS₂/triptofano, na presença e ausência de AuNPs: a) e b) em etanol; c) e d) em soluções aquosas (tampão fosfato (PB), pH 7.4), respetivamente); 0.1 M H₂SO₄, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; representação gráfica de j versus v para os eléctrodos modificados na presença de AuNPs.

Como mencionado anteriormente, o comportamento redox do triptofano em solução ou imobilizado não é linear [17] e na maior parte dos estudos, só é detetado um pico anódico, o qual é atribuído à reação irreversível de 2 eletrões com formação de um intermediário metileno-imina extremamente reativo [26, 29, 31], dando origem

a espécies que não podem ser eletroquimicamente reduzidas no processo de redução correspondente. Este comportamento explica a resposta não-simétrica obtida nos voltamogramas cíclicos mostrados na figura 3.3b, que mostram um pico anódico maior do que o catódico. Não obstante, a linearidade observada entre as correntes dos picos redox com a velocidade de varrimento no elétrodo modificado por AuNPs/CS₂/triptofano (figura 3.3b) é a esperada para uma transferência eletrónica não controlada por difusão, confirmando a adsorção do aminoácido na superfície do elétrodo. À semelhança do observado para a epinefrina, foi possível adsorver um maior número de moléculas de triptofano (por Au (111)) na presença de AuNPs (tabela 3.1). No entanto, a cobertura superficial é inferior à observada para epinefrina, e apenas aumentou cerca de 30 %, em relação ao Au (111) modificado sem NPs, provavelmente devido à elevada reatividade existente entre as amins secundárias e o CS₂, comparativamente à das amins primárias, como reportado anteriormente [17].

Tendo em conta que o principal objetivo do trabalho é a imobilização direta de biomoléculas, que requer meios aquosos, a modificação dos elétrodos utilizando a mesma metodologia (de um só passo reacional) com epinefrina e triptofano foi também testada em condições tamponadas (tampão fosfato, pH 7.4), e os voltamogramas cíclicos obtidos estão na figura 3.3c e d, respetivamente. Deste modo e comparando os resultados obtidos em meio orgânico e aquoso, verifica-se que a imobilização da epinefrina e do triptofano é mais eficaz em etanol do que em solução tampão fosfato, provavelmente devida à baixa solubilidade do CS₂ em solventes mais polares. No entanto, é visível que a reação também ocorre e que a presença das nanopartículas leva a um aumento significativo nas correntes dos picos redox de ambos os compostos (tabela 3.1). A relação linear entre a densidade de corrente dos picos e a velocidade de varrimento foi observada em ambos os elétrodos modificados, na presença de AuNPs, contudo para o triptofano a proporcionalidade só se verifica até 50 mV s⁻¹ (figura 3.3d), confirmando que o processo de transferência eletrónica no triptofano é um pouco mais complexo, fazendo-se notar a velocidades de varrimento mais elevadas. É importante salientar que a perda de linearidade entre a densidade de corrente e a velocidade de varrimento não está associada à perda de moléculas de triptofano adsorvido, como foi comprovado por varrimentos sucessivos na gama de potencial estudada. A percentagem de aumento de concentração superficial estimada

para ambos os elétrodos modificados com AuNPs foi de, aproximadamente, 70 %, revelando que a maior parte das moléculas de epinefrina e triptofano se adsorveram nas AuNPs.

O aumento das coberturas superficiais é uma consequência direta do aumento da área superficial disponível no elétrodo de Au (111) originada pela presença de nanopartículas. Os resultados obtidos por voltametria cíclica confirmaram a aplicabilidade desta metodologia para imobilizar compostos eletroativos contendo grupos amina, mostrando que esta metodologia exhibe um grande potencial para imobilizar proteínas na superfície de ouro, tendo em conta que estas possuem um grande número de aminas primárias e também secundárias.

Tabela 3.1 – Valores de $E_{1/2}$, ΔE_p e cobertura superficial obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos dos elétrodos modificados exibidos na figura 3.1.

Superfície modificada	Solvente	$E^{1/2} / V$	$\Delta E_p / V$	$\Gamma^{ox} (\times 10^{-10}) / (\text{mol} / \text{cm}^2)$
CS₂/ epinefrina	<i>Etanol</i>	0.53	0.02	1.3
	<i>PBS</i>	0.52	0.05	0.7
AuNPs/CS₂/ epinefrina	<i>Etanol</i>	0.52	0.05	4.0
	<i>PBS</i>	0.52	0.05	2.0
CS₂/triptofano	<i>Etanol</i>	0.43	0.14	0.8
	<i>PBS</i>	0.52	0.16	0.3
AuNPs/CS₂/triptofano	<i>Etanol</i>	0.51	0.12	1.1
	<i>PBS</i>	0.43	0.15	0.9

Para efeitos comparativos, testou-se a imobilização de AuNPs funcionalizadas com CS₂ e epinefrina numa superfície modificada com uma SAM de 1,6-hexanoditiol,

uma vez que se espera que o grupo tiol terminal interagir-se fortemente com as AuNPs. Testaram-se dois procedimentos que diferem apenas na modificação das AuNPs antes ou depois de terem sido colocadas em contato com a SAM de hexanoditiol. Os resultados obtidos na figura 3.4 a e b, demonstrando que os resultados melhores foram obtidos quando as nanopartículas se ligam ao grupo tiol sem estarem previamente funcionalizadas, tendo-se obtido uma quantidade superficial de epinefrina de 1.8×10^{-11} mol cm⁻², que é ligeiramente superior à obtida no eletrodo modificado com ditiol/(AuNPs/CS₂/Epinefrina) (8.7×10^{-12} mol cm⁻²). No entanto, tanto num caso ou noutro, o sinal eletroquímico da epinefrina foi bastante inferior aos obtidos na metodologia envolvendo o CS₂ (incluindo na ausência de AuNPs) (figura 3.3). Estes resultados podem estar relacionados com a estrutura das monocamadas de ditiol, pois devido à existência de um grupo tiol em cada extremidade, a ligação com o Au (111) pode ocorrer por apenas um tiol mas também por ambos os grupos SH e, neste caso, não será possível adsorver as AuNPs [32], logo a quantidade de AuNPs ligadas será significativamente inferior quando ligadas pelo CS₂.

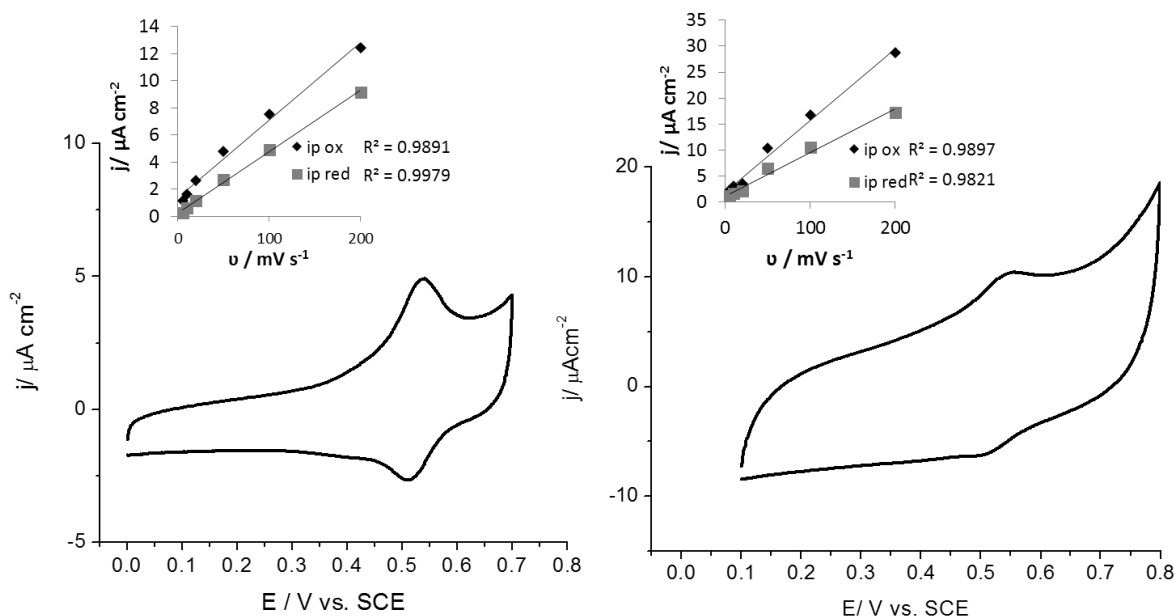


Figura 3.4 – Voltamogramas cíclicos do Au modificado com, a) 1,6-hexanoditiol, AuNPs e CS₂/epinefrina e b) 1,6-hexanoditiol, AuNPs/CS₂/epinefrina, em etanol; 0.1 M H₂SO₄, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; representação gráfica de j versus v .

Para provar que o CS₂ tem um papel crucial na estabilidade da ligação da epinefrina à AuNPs e das AuNPs ao eléctrodo de Au (111), foram realizados vários voltamogramas cíclicos a 50 mV s⁻¹. Na figura 3.5a estão apresentados os 2º e 10º ciclos do comportamento da epinefrina nos eléctrodos modificados com AuNPs e epinefrina na presença e ausência do CS₂, preparados em etanol. Como se pode constatar, na presença do CS₂ a resposta da epinefrina não sofreu alteração após o 10º ciclo, contudo não se verificou o mesmo para o eléctrodo preparado na ausência do CS₂. O número de moléculas de epinefrina fisicamente adsorvidas foi baixo, pois no 2º ciclo (figura 3.5b) já aparece o pico característico da oxidação do crómio, presente na camada intermédia dos substratos de ouro usados para estes estudos, e que é facilmente visível após vários varrimentos cíclicos em soluções ácidas. Estes resultados permitem comprovar que o CS₂ desempenha um papel fundamental nesta metodologia, promovendo uma ligação estável entre os compostos de epinefrina e de triptofano, as AuNPs e o Au (111).

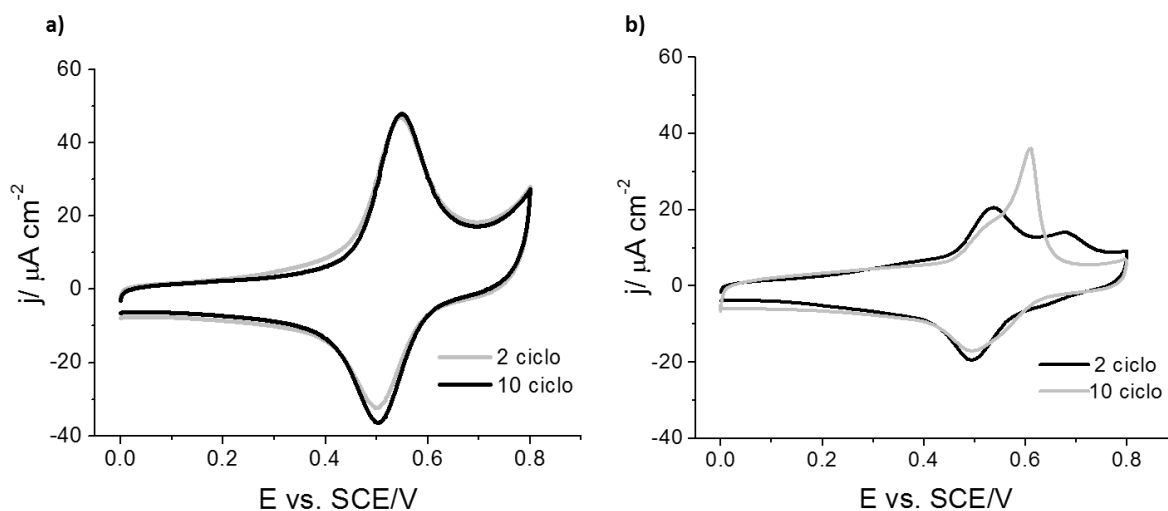


Figure 3.5 – Voltamogramas cíclicos (2º e 10º ciclos) do eléctrodo modificado com AuNPs e epinefrina na a) presença e b) ausência de CS₂, em 0.1 M H₂SO₄, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, exibindo o efeito do CS₂ na estabilidade dos eléctrodos modificados com nanopartículas.

A figura 3.1 esquematiza o tipo de modificações do eléctrodo de ouro esperadas nesta metodologia. Devido à espontaneidade desta reacção de formação *in situ* de

ditiocarbamatos em superfícies de ouro poderá haver mais do que um tipo de compostos imobilizados, tais como, i) algumas moléculas de CS₂ que não reagiram e que se ligam ao ouro através dos dois átomos de enxofre, ii) grupos ditiocarbamatos, resultantes da reação entre o CS₂ e epinefrina ou triptofano, sem ter ocorrido reação com as nanopartículas e iii) AuNPs funcionalizadas com CS₂/Epinefrina ou CS₂/triptofano, as quais deverão estar ligadas à superfície do eletrodo através de CS₂. Neste caso, um átomo de enxofre deverá estar ligado à nanopartícula e o outro ao eletrodo planar de Au.

A caracterização das monocamadas de ditiocarbamatos formados no ouro, foi complementada com estudos eletroquímicos de desadsorção redutiva do enxofre de superfície de ouro, usualmente usados para caracterizar SAMs de alcanotióis em Au, pois este tipo de estudos fornece informação qualitativa e quantitativa sobre, a organização, empacotamento e estabilidade da monocamada formada, fatores este que são fortemente dependentes da cristalinidade, densidade superficial da monocamada e do tipo de espécies de enxofre [21, 33-35].

Os voltamogramas cíclicos apresentados na figura 3.6 correspondem ao processo redutivo das SAMs formadas a partir do CS₂ ou CS₂/AuNPs, preparadas em soluções orgânicas (figura 3.6a) e aquosas (figura 3.6b). Na figura 3.6a detetou-se, para o eletrodo modificado com CS₂, um pico catódico a um potencial de - 0.92 V, que pode ser atribuído à desadsorção dos dois átomos de enxofre do CS₂ adsorvidos no Au (111). O potencial de redução observado para CS₂ (-0.920 V) é mais negativo do que o reportado para as SAMs de derivados de tiol de cadeia curta, tais como mercaptopropanol ($E_p^{red} = - 0.784$ V [36]) ou ácido mercaptopropiónico ($E_p^{red} = -0.800$ V [37]), o que demonstra a grande estabilidade da estrutura de ressonância entre o enxofre e carbono, como resultado de uma boa sobreposição das orbitais do ligando e a superfície de ouro.

Foi também detetado um pico mais largo a potenciais ligeiramente inferiores (- 0.98 V) e um pequeno “ombro” a -0.88 V nos eletrodos modificados na presença das AuNPs, indicando que podem coexistir dois ambientes distintos de átomos de enxofre. Quando o Au (111) foi modificado em água (figura 3.6b), na presença de AuNPs, detetaram-se também dois picos catódicos (-0.84 e -0.97 V) com um aumento da

densidade de corrente do pico, atribuído a um maior número de átomos de enxofre detetados do processo redutivo, quando as AuNPs estão presentes na reação.

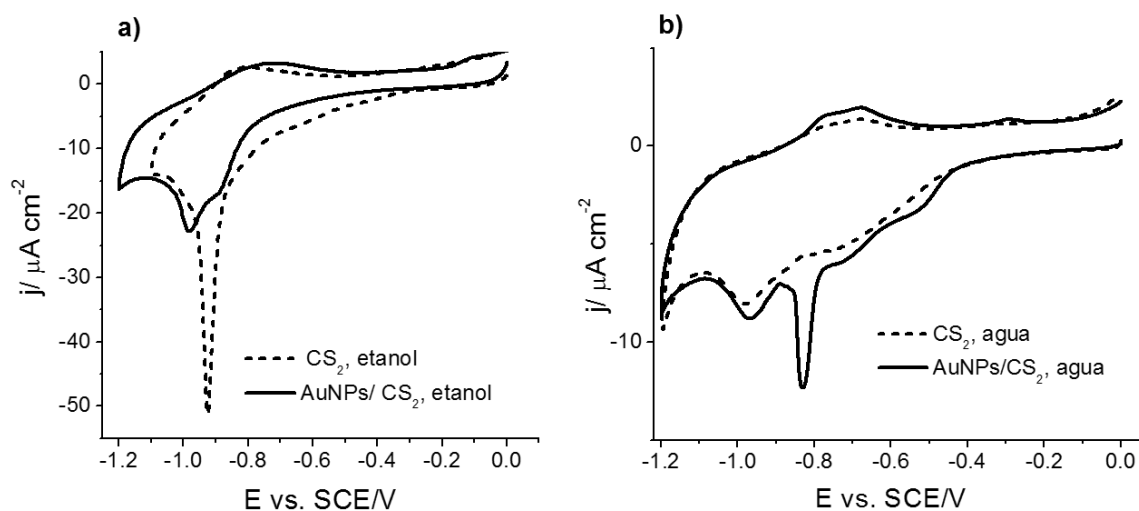


Figure 3.6 – Voltamogramas cíclicos dos elétrodos modificados com CS₂, na presença ou ausência das AuNPs, preparados em soluções a) orgânicas e b) aquosas; 0.1 M NaOH; $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Eletroquimicamente a desadsorção redutiva de SAMs de diaquilditiocarbamatos comerciais (dietil, hexilmetil, dibutil ditiocarbamatos) [17, 21], preparados em etanol, exibem um pico catódico (figura 3.7a) numa gama de potenciais que pode ir desde -0.75 (provavelmente devido a deslocalização de eletrões entre a estrutura de ressonância e o N, que pode conduzir a uma ligação mais fraca [16]) a -0.92 V. Este último valor de potencial (-0.92 V) é similar ao obtido para a SAM de CS₂ preparada nas mesmas condições (figura 3.6a). Constata-se assim que SAMs de diaquilditiocarbamatos, com diferentes comprimentos de cadeias, adsorvidos em ouro podem ter organizações diferentes sobre a superfície do elétrodo e por esse motivo exibem picos catódicos a diferentes potenciais [17, 21]. Estes resultados podem indicar que a estrutura de ressonância S₂-C-N não será o único fator a influenciar a estabilidade das monocamadas formadas em ouro (relativamente à ligação CS₂), uma vez que as interações π - π das cadeias alifáticas ou aromáticas entre os adsorbatos poderão influenciar a estabilidade de uma monocamada auto-montada. O resultado

eletroquímico da desadsorção da monocamada de CS₂/hexilmetilamina mostrou dois picos de redução, um mais negativo em -0.88 V e outro a - 0.80 V que coincidem com os observados para a SAM de hexilmetilditiocarbamato de Zn representado na figura 3.7a. Na figura 3.7b e c, são mostrados os voltamogramas cíclicos das desadsorções redutivas dos elétrodos modificados com CS₂/epinefrina e CS₂/triptofano, preparadas em etanol, na presença ou ausência de AuNPs. Observou-se que em todos os voltamogramas cíclicos aparece um pico catódico predominante com os potenciais ligeiramente desviados para potenciais mais positivos (tabela 3.2), ou seja, próximos dos valores de potencial observado para o dibutilditiocarbamato mas mais negativo que dietilditiocarbamato. Este comportamento sugere, de acordo com estudos anteriores [17] que a aromaticidade das moléculas deverá ser responsável pela estabilização da monocamada através das interações π entre as moléculas adjacentes.

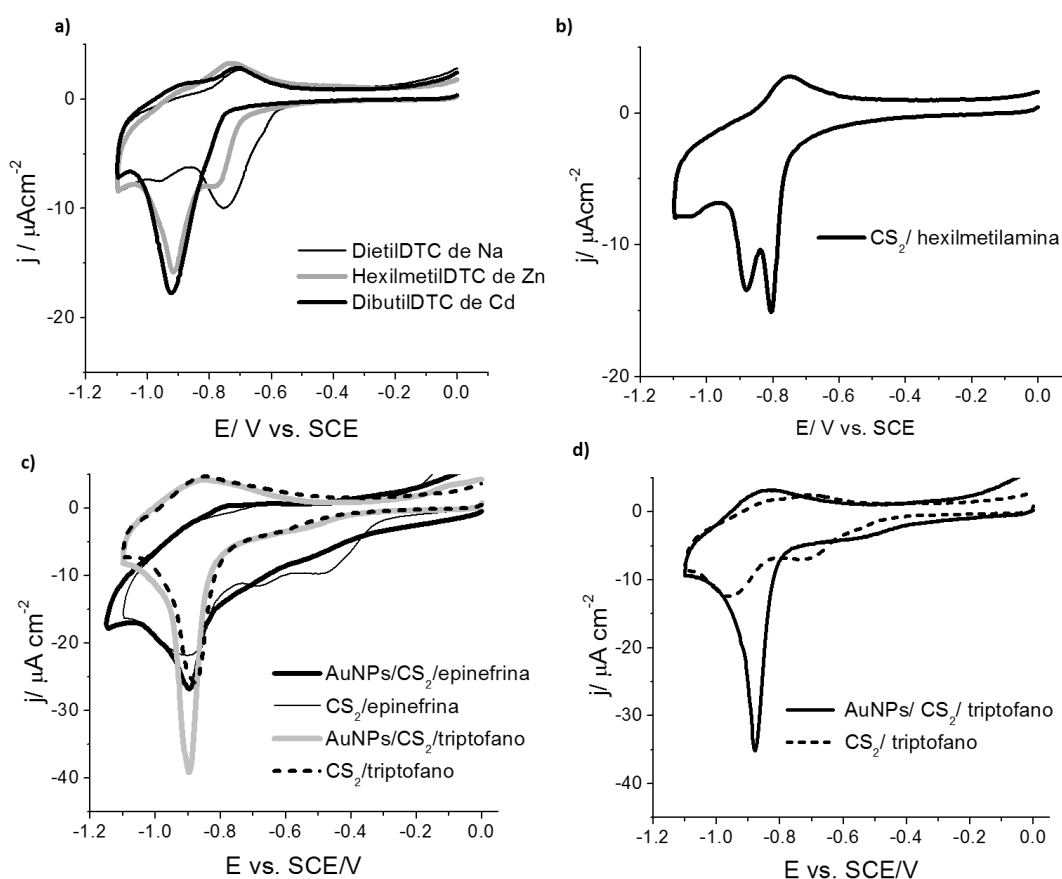
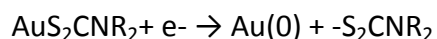


Figura 3.7 – Voltamogramas cíclicos em 0.1M NaOH, a $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ dos elétrodos modificados com, a) SAM de dietilditiocarbamato de Na, hexilmetilditiocarbamato de Zn e dibutilditiocarbamato de Cd, preparadas em etanol; b) CS₂ e hexilmetilamina, em

etanol, c) CS₂/epinefrina, na presença e ausência de AuNPs, preparados em etanol; CS₂/triptofano, com e sem AuNPs, em etanol; d) AuNPs/CS₂/triptofano, água; CS₂/triptofano, água.

A presença das AuNPs originou um aumento da densidade de corrente do pico e através da carga envolvida no processo de redução foi possível determinar a quantidade de átomos de enxofre que se desadsorveram neste processo. Na tabela 3.2 encontram-se descritas as quantidades de átomos de enxofre adsorvidas. O número de elétrons envolvido na desadsorção de uma molécula de CS₂ e de ditiocarbamato deverá ser próximo de 1. Foi reportado por Peter Morf e seus colaboradores [21] que a reação de desadsorção dos ditiocarbamatos em ouro deverá ser próximo de ½ elétron por átomo de enxofre (valor estimado por XPS), propondo a reação seguinte,



Nos elétrodos modificados na presença de AuNPs, foi também considerada a transferência de 1 elétron por molécula de CS₂/DTC ligada diretamente ao Au (111).

Tabela 3.2 – Valores dos potenciais de redução e cobertura de superfície obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos dos elétrodos modificados na figura 3.6 e 3.7.

Superfície modificada	CS ₂		DTC			CS ₂ /AuNPs		CS ₂ /epinefrina		CS ₂ /triptofano		AuNPs/CS ₂ /epinefrina		AuNPs/CS ₂ /triptofano	
	orgânico	aquoso	orgânico			orgânico	aquoso	orgânico	orgânico	aquoso	orgânico	orgânico	aquoso		
			dietil	hexilmetil	dibutil										
E _p ^{red} / V	-0.92	-0.97	-0.74 -0.95	-0.79 -0.92	-0.90	-0.88 -0.98	-0.84 -0.97	-0.90	-0.88	-0.96	-0.90	-0.90	-0.87		
Γ ^{red} (× 10 ⁻¹⁰)/ (mol cm ⁻²)*	8.6	1.4	4.0 2.3	1.4 3.5	8.7 3.5	8.8	1.2 1.0	6.4	10.4	3.5	10.7	14.7	12.7		

* Assumindo 1e⁻ por molécula CS₂ ou DTC;

Confrontando os valores de coberturas superficiais obtidos para os compostos eletroativos, epinefrina e triptofano, com os valores da quantidade de átomos enxofre desadsorvidos pode-se constatar que, i) em solução orgânica, o aumento da quantidade de moléculas de triptofano devido à presença de AuNPs (tabela 3.1), está em concordância com o aumento da cobertura de enxofre (26 %, tabela 3.2) e nos elétrodos modificados com a epinefrina e AuNPs, o aumento da concentração

superficial de átomos de enxofre é consideravelmente mais pequena (22 %) que obtida durante a conversão redox da epinefrina, sugerindo que a grande parte das moléculas de epinefrina estarão adsorvidas à superfície das AuNPs (tabela 3.1); ii) em soluções aquosas, a quantidade de átomos de enxofre no eletrodo modificado com CS₂/triptofano/AuNPs aumenta significativamente (~ 60 %), comparativamente ao eletrodo modificado com CS₂/triptofano, estando em concordância com a quantidade de moléculas de triptofano estimado (figura 3.6 d, tabela 3.1).

Estes resultados demonstram que, se o número de átomos de enxofre aumentou na presença de NPs, considerando que apenas um S do CS₂ está ligado ao ouro, a quantidade de átomos de enxofre detetada diz respeito não só aos átomos ligados diretamente ligados ao Au (111) mas também a alguns ligados às AuNPs nas imediações do eletrodo.

Com o objetivo de confirmar a presença dos compostos adsorvidos na superfície de ouro foram realizadas análises de XPS aos eletrodos modificados AuNPs/CS₂, CS₂/Epinefrina e AuNPs/CS₂/Epinefrina, que possibilitou a deteção das bandas de ionização dos elementos químicos dos compostos adsorvidos no ouro.

A figura 3.8 mostra a banda de energia de ionização S2p. A banda de ionização S2p nos eletrodos CS₂/epinefrina e CS₂ /AuNPs/ epinefrina ostenta a ligação típica metal-enxofre, e pode ser desdobrada em dois dubletos S2p_{3/2} e S2p_{1/2} com energia de ligação (BE) de 162.7 eV para S2p_{3/2} e 164 eV para S2p_{1/2}. Os valores de BE apresentados estão de acordo com a literatura para a formação *in situ* de ditiocarbamatos em ouro [13, 21], no entanto estão ligeiramente superiores aos descritos para SAMs de ditiocarbamatos puros (S2p_{3/2} ≈ 162 eV [21]) e um pouco inferiores aos encontrados para tióis ou dissulfuretos livres (≈ 163.7 eV [38, 39]). Da mesma forma que foi reportado para estruturas 2D e 3D (com nanopartículas) para SAMs de alcanotióis de cadeia curta [40], a BE S2p é similar nos eletrodos modificados na presença ou não de AuNPs. O espectro de XPS para o eletrodo modificado apenas com AuNPs e CS₂ (figura 3.8a) também revela a ligação ouro-enxofre com uma energia de ligação para S2p_{3/2} de 162.2 eV [41]. É de salientar que não foram detetados outras espécies de enxofre ou de azoto nestas amostras. Em contraste, as amostras contendo epinefrina exibem bandas de ionização N1s com BE de ~ 400.9 eV [42]. Todas as

amostras exibiram a banda C1s com BE ~ 285.9 eV [42]. Ambos os valores de BE da N1s e C1s estão próximos dos reportados para uma ligação C=N, deverá ser proveniente dos ditiocarbamatos [13, 21, 42]. Devido à baixa quantidade dos compostos adsorvidos nos elétrodos, não foi possível identificar com maior precisão as energias de ligação atribuídas à ligação Au-S₂C-N de um DTC e à ligação Au-S₂C do CS₂ numa mesma amostra, nem a distinção da ligação NP-S-C-S-Au (111), presente nos elétrodos modificados na presença de NPs. Não obstante, a informação qualitativa fornecida pelas energias de ligação confirmam uma ligação forte, com um caráter covalente, entre os átomos de enxofre e a superfície de ouro em todas as amostras estudadas.

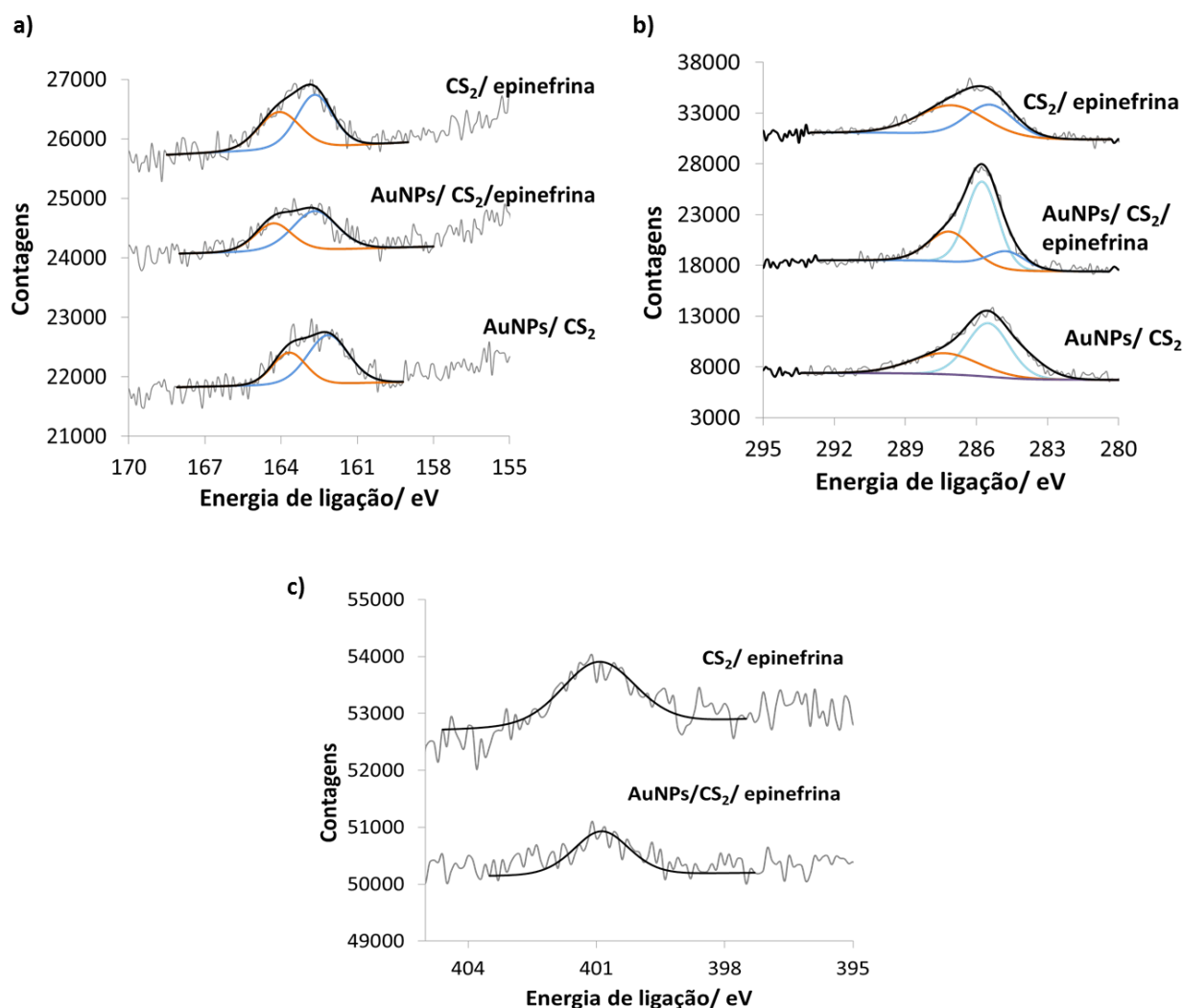


Figure 3.8 – Espetros de XPS das bandas de energias de ionização S_{2p}, C_{1s}, N_{1s} dos compostos imobilizados nos elétrodos com CS₂, epinefrina, na presença ou ausência de AuNPs.

Após a confirmação da reação em meio orgânico e aquoso com as AuNPs de 20 nm, empregou-se a metodologia às AuNPs de ~ 5 nm e PtNPs de ~ 3 nm. Nestes ensaios eletroquímicos, estudou-se o comportamento redox dos elétrodos modificados com a epinefrina e o triptofano, preparados em meio orgânico e aquoso no caso da epinefrina (na presença de AuNPs de 5 nm e PtNPs de 3 nm) e apenas em tampão fosfato pH 7.4 nos elétrodos modificados com as PtNPs e o triptofano. Estes estudos foram complementados com a caracterização da morfologia das superfícies preparadas.

Na figura 3.9a e b encontram-se os voltamogramas cíclicos obtidos para os elétrodos modificados com epinefrina (preparados em etanol e tampão fosfato pH 7.4, respetivamente), observando os processos redox da epinefrina juntamente a um aumento da densidade de corrente devido à presença das nanopartículas, independentemente da natureza da nanopartícula. Este tipo de comportamento é o esperado para a epinefrina [17], mostrando, mais uma vez, que a transferência dos 2 elétrões é precedida por uma protonação com o mesmo número de protões envolvidos no mecanismo de oxidação epinefrina. Por sua vez, na figura 3.9c e d é visualizado o comportamento eletroquímico esperado para o aminoácido estudado, tanto em meio orgânico como aquoso, verificando-se novamente a resposta assimétrica do aminoácido estudado, com a particularidade de, o valor absoluto de corrente para o pico da oxidação é muito maior do que o da reação de redução.

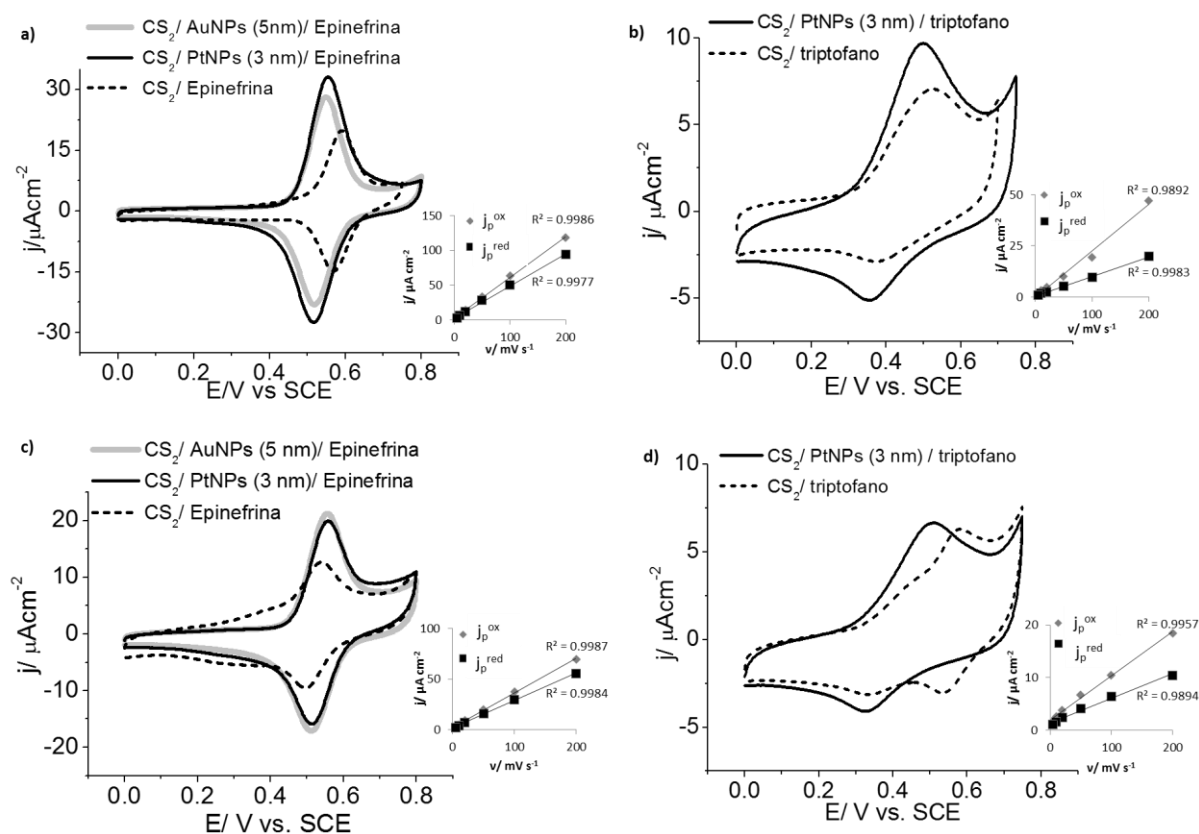


Figura 3.9 – Voltamogramas cíclicos do ouro modificado, com CS₂/epinefrina e CS₂/triptofano, na presença e ausência de Au e Pt NPs (5 e 3 nm): a) e b) em etanol; c) e d) em soluções aquosas (tampão fosfato, pH 7.4), respetivamente; 0.1 M H₂SO₄, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; representação gráfica de j versus v apenas para as superfícies modificadas com PtNPs (3 nm).

Os valores de cobertura superficial (processo de oxidação) e os parâmetros eletroquímicos ($E_{1/2}$ e ΔE_p) dos processos redox dos voltamogramas cíclicos representados na figura 3.9 encontram-se na tabela 3.3. Os resultados obtidos para os elétrodos modificados com epinefrina e Au e Pt NPs, preparados em meio orgânico e aquoso, (figura 3.9a e b, respetivamente) demonstram que os $E_{1/2}$ e ΔE_p observados são semelhantes aos determinados nas superfícies modificadas com AuNPs de 20 nm (figura 3.3), atribuídos à conversão das formas, hidroquinona/quinona, da epinefrina (figura 3.2). Nos ensaios eletroquímicos das superfícies funcionalizadas com triptofano, na presença apenas de PtNPs, observou-se, que a reação de oxidação do aminoácido

ocorreu em maior extensão do que a redução, como anteriormente verificado [17]. Através da determinação da cobertura superficial de elétrodos modificados, constatou-se que a quantidade imobilizada de cada composto é superior nos elétrodos modificados devido à presença de nanopartículas, comparativamente aos elétrodos modificados na ausência das NPs. Os resultados obtidos pelas Au e Pt NPs, tanto em meio orgânico como aquoso, quer com a epinefrina ou triptofano são bastante similares, corroborando as conclusões retiradas anteriormente, tanto sobre a estabilidade da ligação ditiocarbamato às nanopartículas (comprovada pela resposta linear entre a densidade de corrente dos picos dos processos redox e a velocidade de varrimento), como sobre o papel fundamental do CS₂ na adsorção de nanopartículas, especialmente em meio orgânico, demonstrando a aplicabilidade desta metodologia a outros tipos (natureza, tamanho) das nanopartículas.

Tabela 3.3 - Valores de $E_{1/2}$, ΔE_p e cobertura superficial obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos dos elétrodos modificados exibidos na figura 3.9.

Superfície modificada	Solvente	$E_{1/2} / V$	$\Delta E_p / V$	$\Gamma^{ox} (\times 10^{-10}) / (\text{mol}/\text{cm}^2)$	
CS₂/epinefrina	AuNPs	<i>Etanol</i>	0.53	0.02	1.3
		<i>PBS</i>	0.52	0.05	0.7
	PtNPs	<i>Etanol</i>	0.52	0.05	4.0
		<i>PBS</i>	0.52	0.05	2.0
CS₂/triptofano	PtNPs	<i>Etanol</i>	0.43	0.14	0.8
		<i>PBS</i>	0.52	0.16	0.3

A caracterização morfológica dos elétrodos modificados foi realizada por microscopia de força atômica (AFM) pois esta técnica permite comprovar com clareza a presença de nanoestruturas e avaliar a sua distribuição na superfície do elétrodo.

Na figura 3.10a é possível observar os terraços monoatômicos típicos do Au (111) juntamente com nanopartículas, possivelmente modificadas com CS₂/epinefrina,

com diâmetros médios de 34 ± 7 nm. Na figura 3.9b e c os diâmetros médios estimados para as AuNPs funcionalizadas com triptofano, preparadas em meio orgânico e aquoso, são de 33 ± 6 e 30 ± 8 nm, respetivamente. Este aumento do diâmetro das AuNPs, relativamente às AuNPs/citrato puras (22 ± 6 nm figura 3.10a), corrobora a modificação das AuNPs após o processo de incubação dos respetivos compostos.

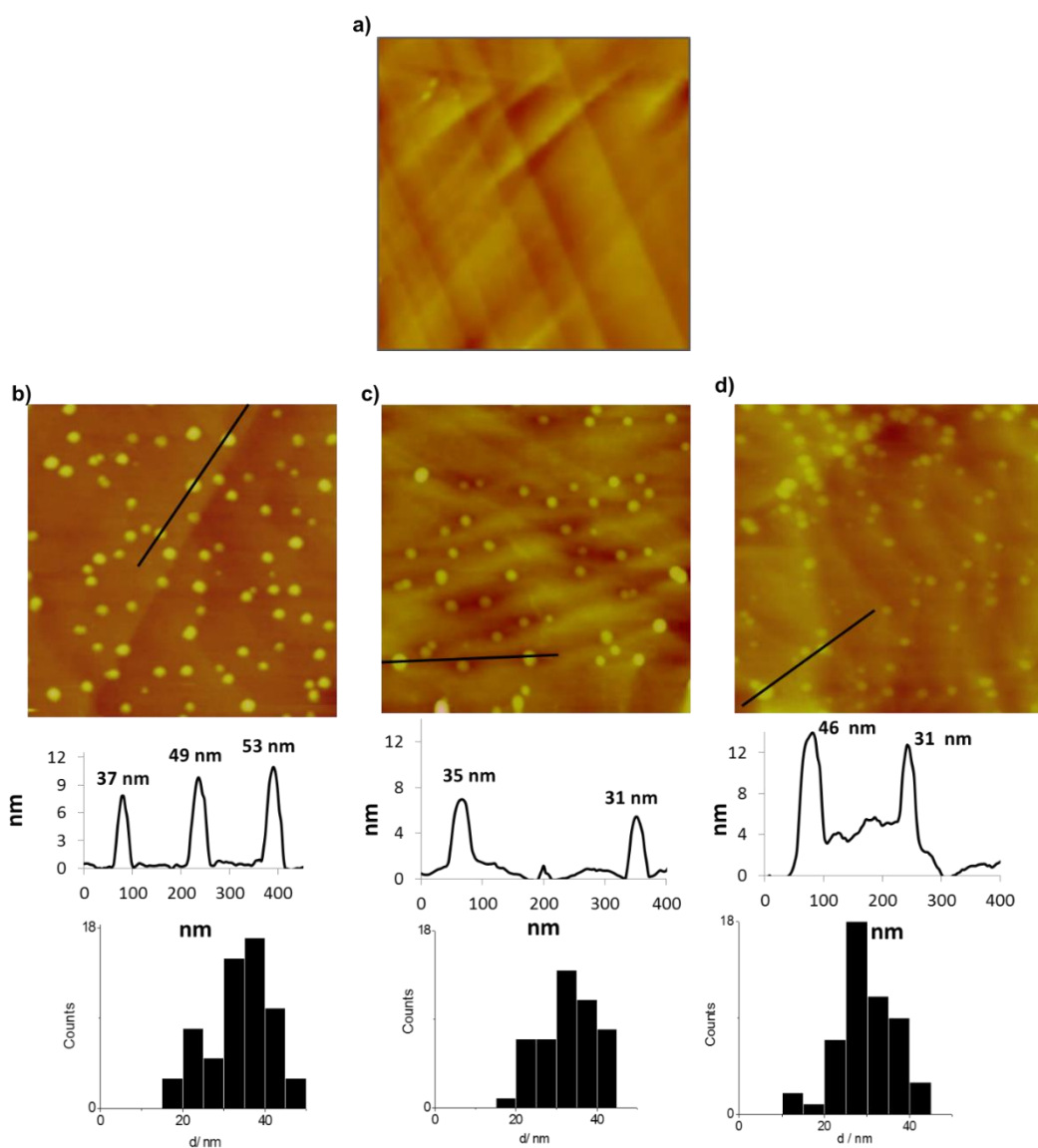


Figura 3.10 – Imagens de AFM (750×750 nm²) dos elétrodos modificados com a) AuNPs/ CS₂/epinefrina, etanol, z = 20 nm; b) AuNPs/CS₂/triptofano, etanol, z = 20 nm, e c) AuNPs/ CS₂/triptofano, água, z = 42 nm; Para cada imagem é apresentado um perfil e a distribuição de tamanho de partícula correspondente.

A morfologia dos elétrodos de ouro modificados através da reação entre CS₂, PtNPs (3 nm), epinefrina e triptofano preparados em meio orgânico e aquoso, foi também analisada por AFM. As imagens da figura 3.11 mostram a presença de nanopartículas na superfície de ouro e também de pequenos aglomerados, com tamanhos médios que variam entre 15 e 25 nm. Estes valores são ligeiramente elevados aos esperados para nanopartículas de 3 nm modificadas por moléculas com ~ 2 nm (tamanho aproximado da epinefrina determinado por ChemsSketch), no entanto este valor deverá estar afetado pela limitação da resolução lateral das pontas de AFM com cerca de 10-15 nm de diâmetros, o que poderá influenciar a medição de partículas com apenas alguns diâmetros de tamanho [43].

É de salientar que, comparativamente aos elétrodos modificados na presença de AuNPs de 20 nm, o número de partículas aumentou significativamente, no entanto a quantidade de composto (epinefrina e triptofano) imobilizada poderá ser inferior, tendo em conta os resultados eletroquímicos obtidos (valores absolutos de densidade de corrente dos processos redox e cobertura superficial).

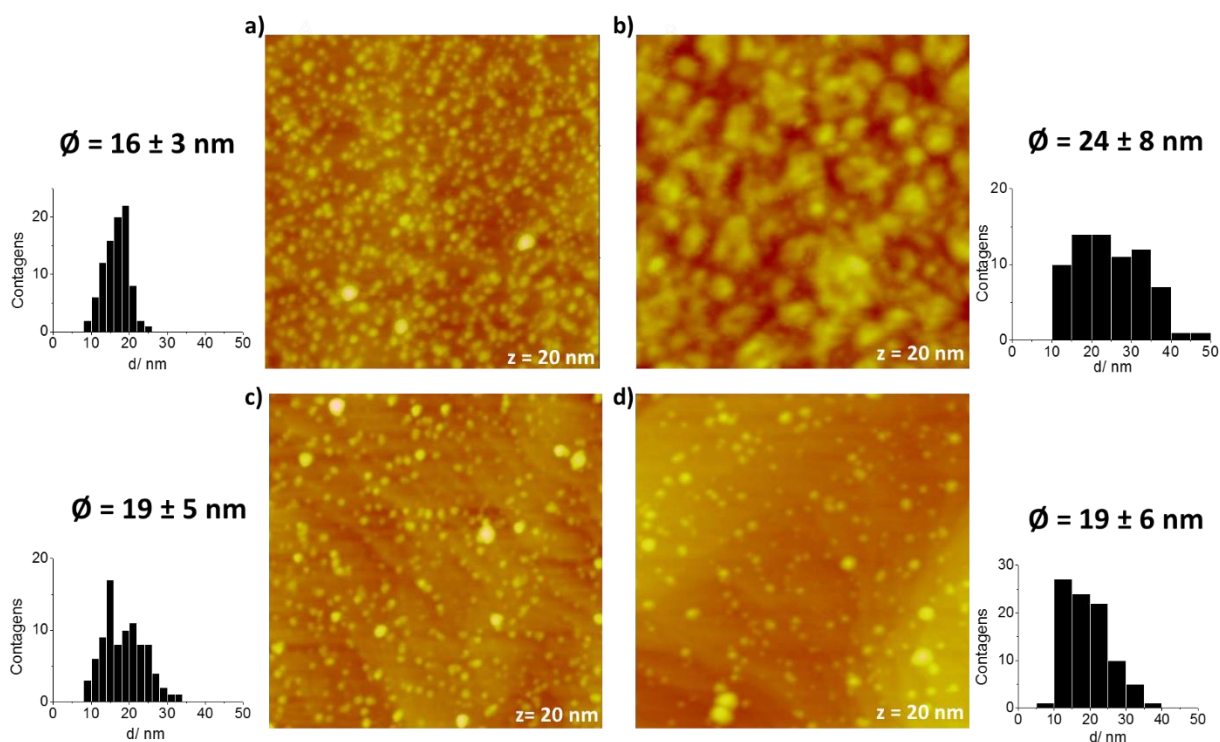


Figura 3.11 – Imagens de AFM ($750 \times 750 \text{ nm}^2$) dos elétrodos modificados, na presença de PtNPs, preparados em etanol ou tampão fosfato (pH 7.4), respetivamente: CS_2 /epinefrina (A e B), CS_2 /triptofano (C e D). Para cada imagem é apresentado um histograma com a distribuição de tamanho de partícula e o diâmetro médio determinado.

É possível visualizar nas imagens de AFM dos elétrodos modificados (figura 3.10 e 3.11) alguns espaços onde não estão ligadas NPs. Considerando a espontaneidade da metodologia empregue, supõe-se que estas zonas deverão corresponder a moléculas de CS_2 ou de ditiocarbamatos que não reagiram com as NPs. O motivo pelo qual algumas moléculas de CS_2 , que se ligaram demasiado rápido ao elétrodo, não terem reagido com os grupos amina poderá ser explicado, em parte, pelo fato de o CS_2 quando adsorvido diretamente na superfície do ouro não reagir, posteriormente, com os compostos eletroativos estudados. Presume-se que, devido à estrutura de ressonância formada na presença do elétrodo de ouro, pelo CS_2 , os átomos de carbono deverão ficar com excesso de carga negativa devido ao deslocamento de um par de eletrões, livre, de ambos os átomos de enxofre, logo a ligação das aminas não irá

ocorrer na mesma extensão que se ambos os compostos reagirem simultaneamente na presença do ouro.

A caracterização das nanopartículas metálicas (Au e Pt NPs) utilizadas neste trabalho (sintetizadas pelo método Turkevich e de Solla-Gullón, capítulo 2, secção 2.2.) foi inicialmente realizada por microscopia de transmissão eletrónica (TEM). Foi possível verificar, pelos histogramas da distribuição de tamanho que, o diâmetro médio das nanopartículas está de acordo com o esperado, tendo em conta o método de síntese utilizado para obter cada amostra.

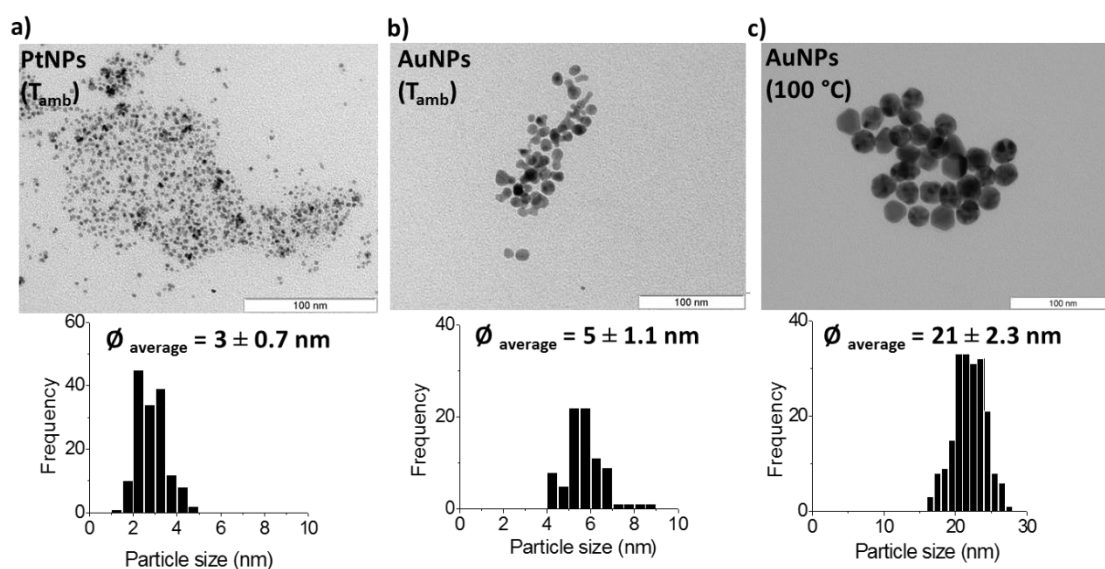


Figura 3.12 - Imagens das suspensões coloidais de nanopartículas metálicas utilizadas neste trabalho, preparadas pelos métodos de Solla-Gullón (T_{amb}) e de Turkevich (100°C).

As suspensões coloidais de AuNPs de 20 nm antes e após a formação de ditiocarbamatos foram também caracterizadas por AFM e por espectroscopia de UV-visível. Na figura 3.13 exibem-se as imagens obtidas, os perfis topográficos e os histogramas da distribuição de tamanhos das AuNPs. A partir destes resultados foi possível determinar que o diâmetro médio das AuNPs é de, aproximadamente, 22 nm. Observou-se que as AuNPs em contato com o CS_2 apresentam uma propensão para

formar pequenos agregados (~ 35 nm) (figura 3.12b). Contudo, na presença de composto contendo aminas, esta agregação foi minimizada, podendo visualizar-se nanopartículas de maior tamanho, (55 ± 13 nm e 60 ± 12 nm) que deverão corresponder as AuNPs funcionalizadas com CS₂ e epinefrina ou triptofano, respetivamente. Adicionalmente verificou-se que os diâmetros médios das AuNPs funcionalizadas ligadas à superfície do ouro (figura 3.10) são mais pequenos do que aqueles obtidos quando a reação ocorre em suspensão coloidal (figura 3.13), na ausência do eletrodo de Au (111) planar, mas maiores em comparação com os diâmetros de AuNPs puras. Este facto pode ser explicado pela rápida interação das AuNPs, CS₂ e epinefrina ou triptofano, e consequente adsorção à superfície do eletrodo evitando a agregação de AuNPs.

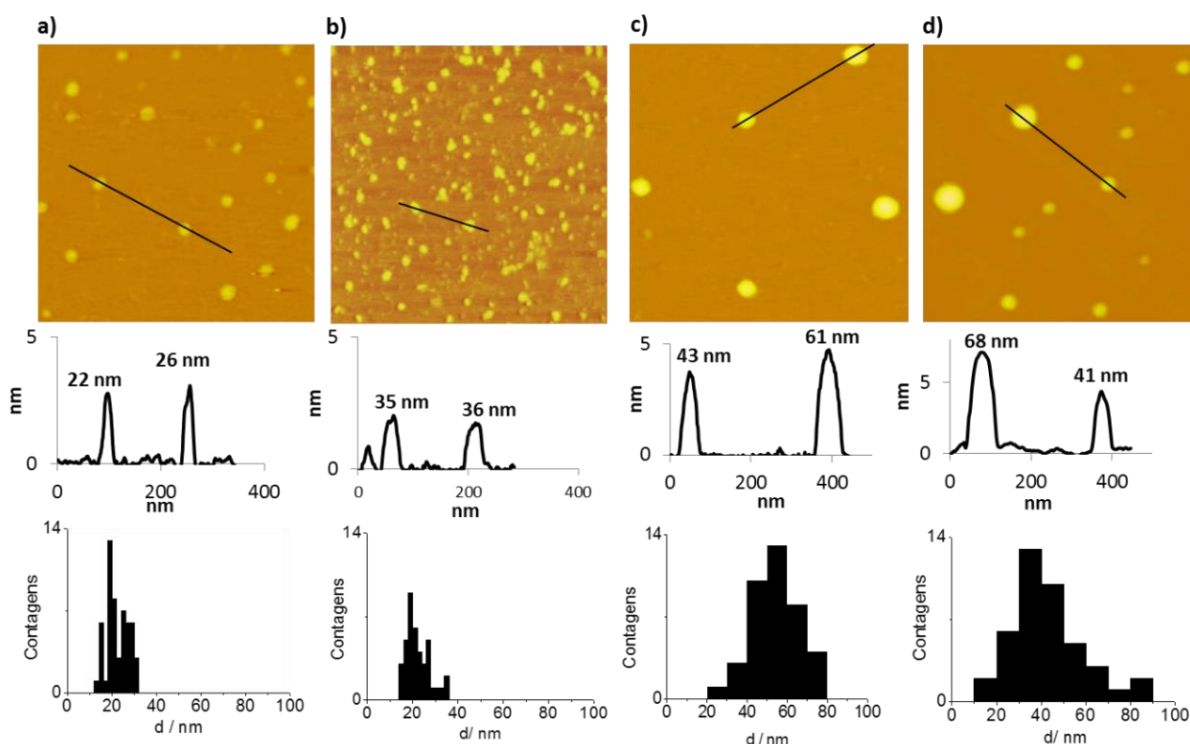


Figura 3.13 – Imagens topográficas obtidas por AFM (750×750 nm², $z = 15$ nm) da superfície de mica após deposição de uma gota das suspensões coloidais de a) AuNPs puras, b) AuNPs/CS₂, c) AuNPs/CS₂/epinefrina, d) AuNPs/CS₂/triptofano, preparadas em meio orgânico. Para cada imagem é apresentado um perfil e a distribuição de tamanho de partícula correspondente.

O espectro de UV-vis das AuNPs, com diâmetro médio de 20 nm, em suspensão coloidal exibe a banda característica deste tipo de nanomateriais a 522 nm (figura 3.10) [27], que está de acordo com o reportado para AuNPs com um diâmetro aproximado de 20 nm [26-28], corroborando os tamanhos médios observados nas imagens de AFM. Através dos espectros obtidos (figura 3.11), foi possível seguir a banda de ressonância do plasmão de superfície das AuNPs, onde se verificou a modificação desta e a possível formação de agregados, pelo desvio desta mesma banda para valores mais positivos. Os espectros obtidos para as suspensões coloidais das AuNPs modificadas exibem a banda entre os comprimentos de onda de 524 e 530 nm como esperado para as AuNPs com tamanhos entre 35 – 68 nm [44]. No espectro das AuNPs modificadas com CS₂ e epinefrina (fig 3.14) é de salientar o aparecimento de um banda a 650 nm, deverá ser atribuída à presença de agregados de AuNPs na suspensão na coloidal. Este facto poderá ter sido causado pela presença do CS₂ que pode promover a ligação de duas NPs através dos 2 átomos de enxofre, originado um conjunto de nanopartículas (agregados) de maiores dimensões.

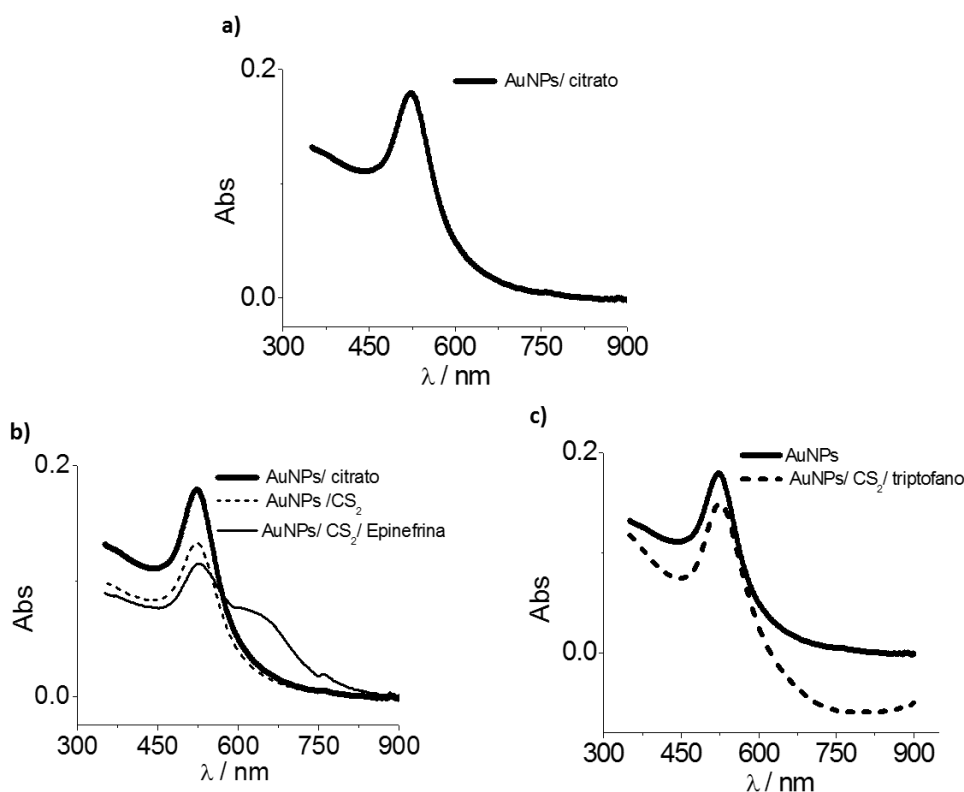


Figura 3.14 - Espectros de UV-visível das AuNPs (~ 20 nm) antes e após a reação com CS₂, CS₂ e epinefrina, CS₂ e triptofano e CS₂ e glucose oxidase, em suspensão coloidal, preparadas em meio aquoso.

Estes resultados possibilitaram demonstrar que tanto a epinefrina como o triptofano podem ser imobilizados, num só passo, com eficácia, na presença de AuNPs, em elétrodos de ouro planos, através da formação de grupos ditiocarbamatos. A adição de nanopartículas revelou-se particularmente importante para aumentar a cobertura dos compostos eletroativos, especialmente do aminoácido nos elétrodos preparados em meios aquosos, tal como foi confirmado pelos estudos redox e também através da quantidade total de átomos de enxofre desadsorvidos electroquimicamente da superfície do elétrodo. A caracterização morfológicas dos elétrodos suportam ainda as conclusões mencionadas anteriormente, reforçando a versatilidade e o sucesso da metodologia em meio aquoso para poder ser usada com outras nanopartículas (em particular, de metais não-nobres) e com compostos biológicos. Deste modo, testou-se a imobilização da glucose oxidase utilizando este procedimento de um só passo, avaliando-se a atividade catalítica do enzima após a sua imobilização no elétrodo.

3.1.2 Atividade catalítica da Glucose Oxidase

A glucose oxidase (GOx) possui um centro redox, o dinucleótido de flavina-adenina (FAD), que catalisa a oxidação da glucose a gluconolactona e tem sido extensamente estudada para monitorizar os níveis de glucose em diabéticos. Este enzima, possui, naturalmente, um grande número de aminoácidos, com amins primárias e secundárias, que podem ser imobilizadas através desta reação com o CS₂, pela formação *in situ* de ditiocarbamatos, na presença de AuNPs. A metodologia de imobilização envolveu a reação, num só passo, entre o CS₂ (1 mM), AuNPs (4 nM) e Glucose Oxidase (1 mg/ml), em meio aquoso e é ilustrada na figura 3.1.

A atividade catalítica do enzima foi estudada electroquimicamente através de três reações diferentes: i) redução do H₂O₂ formado, ii) oxidação do mediador redox que se reduziu para regenerar o enzima após oxidação do substrato e iii) reação de transferência eletrónica direta entre o centro ativo do enzima e o elétrodo. No

primeiro caso, a reação enzimática estudada, na presença de O₂ [45], permitiu detectar por voltametria cíclica a presença de H₂O₂ formado durante a reação enzimática, conforme as seguintes equações (13-15) e o esquema ilustrado na figura 3.15.

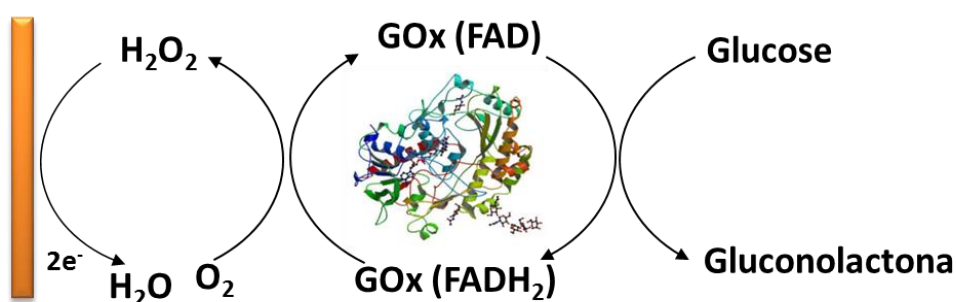
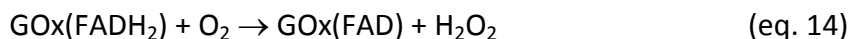


Figura 3.15 – Esquema representativo da reação da atividade enzimática da GOx na presença de O₂.

A figura 3.16 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo modificado com CS₂/AuNPs/GOx, em solução tampão fosfato saturada com O₂ e na presença de diversas concentrações de glucose (entre 0.5 e 35 mM). Foi possível observar um aumento do pico catódico ($E_p^{\text{red}} \sim -0.55\text{ V}$), com o aumento da concentração de glucose no eletrólito, atribuído à redução do H₂O₂. Na figura 3.16 é observada uma relação linear entre a concentração de glucose (de 0.5 a 31 mM) e o aumento da densidade de corrente do pico de redução do H₂O₂, indicando que a GOx imobilizada, depois de ter oxidado a glucose, reagiu com o O₂, produzindo quantidade suficiente de H₂O₂ para este ser detectado electroquimicamente. Este processo catódico foi também detectado a valores próximos aos observados nos voltamogramas cíclicos da figura 3.16 em superfícies modificadas com nanopartículas de Ag e GOx [45, 46] e em eletrodos de carbono mas com outro enzima imobilizado, a HRP [47].

Na ausência de GOx, para as concentrações de glucose de 1 e 35 mM, este processo de redução não é detectado (figura 3.16b), demonstrando-se que a GOx se encontra biologicamente ativa após a etapa de imobilização na superfície de ouro, na presença de CS₂ e de AuNPs.

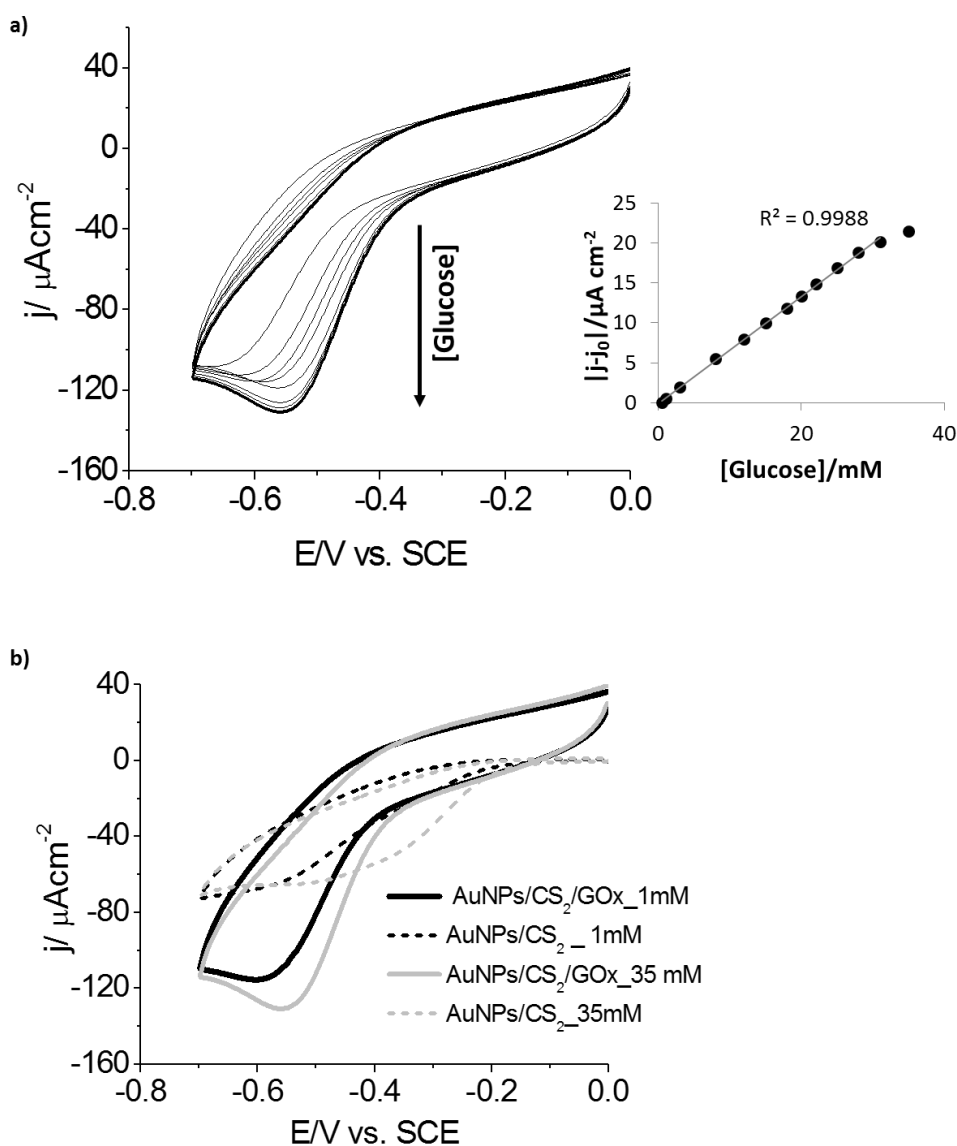


Figura 3.16 – Voltamogramas cíclicos de Au modificado com a) AuNPs/ CS₂/ GOx após adições sucessivas de Glucose; b) AuNPs/ CS₂/ GOx e AuNPs/CS₂, com 1 e 35 mM de glucose. Todos os ensaios foram registados a 50 mV s⁻¹, em solução de PB (pH 7.4).

De forma a estudar com maior precisão a resposta catalítica da superfície modificada com CS₂/AuNPs/GOx, recorreu-se ao uso de um mediador redox, de forma a facilitar e mediar a transferência eletrónica do par redox FAD/FADH₂ e o eletrodo.

As equações (16-18) descrevem o processo que ocorre numa superfície modificada com GOx, na presença de um mediador de transferência eletrónica [17, 48-50]. Neste trabalho foram utilizados dois mediadores redox, o ácido ferrocenomonocarboxílico (FMCA) e o ácido ferrocenodicarboxílico (FDCA).

Os derivados de ferroceno são dos compostos mais utilizados na mediação da reação enzimática entre a GOx e o substrato glucose [51, 52], visto que este tipo de compostos obedece aos principais requisitos que um mediador redox tem que possuir, tais como, reagir rapidamente com o enzima reduzido; apresentar uma cinética heterogénea reversível; ser independente do pH; ser estável nas suas formas oxidadas e reduzidas estáveis.

A GOx(FAD) oxida a glucose, formando a gluconolactona e posteriormente, a GOx(FADH₂) vai reagir com o ferroceno oxidado, reduzindo este, e oxidando-se (figura 3.17). O potencial a que ocorre este processo é o potencial correspondente à oxidação do ferroceno, pois este só reage com a GOx reduzida quando está no estado oxidado.

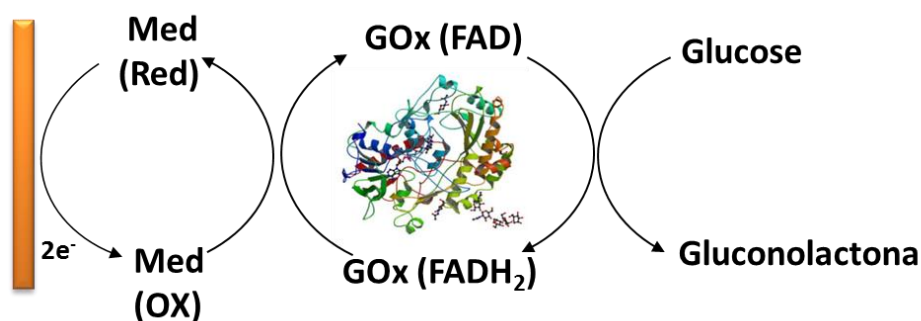
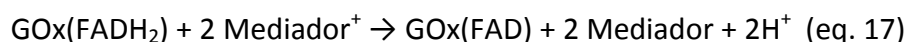
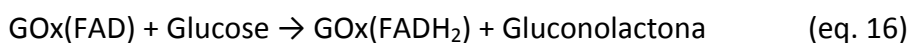


Figura 3.17 - Esquema representativo da reação da atividade enzimática da GOx na presença de um mediador redox

Na figura 3.18 encontram-se os voltamogramas cíclicos da resposta eletroquímica dos elétrodos modificados com CS₂, CS₂/GOx, CS₂/AuNPs e CS₃/AuNPs/GOx em solução tampão fosfato (pH 7.4) contendo 0.1 mM FDCA, a uma concentração fixa de glucose (0.5 mM). O voltamograma cíclico obtido para o elétrodo modificado com o CS₂ exhibe um processo redox reversível com E_{1/2} = 0.40 V e ΔE_p = 0.07 V, a uma velocidade de varrimento de 5 mVs⁻¹, atribuído à oxidação e redução do FDCA. Na presença de AuNPs, a densidade de corrente aumenta, devido ao aumento

da área superficial do eletrodo que está disponível para oxidar e reduzir o mediador. A corrente de oxidação da resposta catalítica do eletrodo com CS₂/GOx aumenta significativamente, contudo o maior aumento de sinal é observado no eletrodo modificado na presença das AuNPs. Este aumento do pico anódico do ferroceno é consequência reação enzimática da GOx com a glucose, demonstrando o sucesso desta metodologia na imobilização da GOx e na preservação da atividade biológica do enzima.

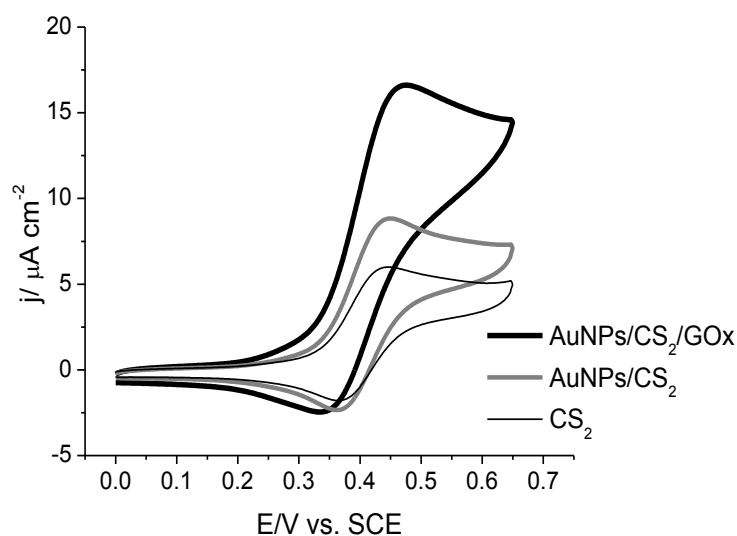


Figura 3.18 - Voltamogramas cíclicos do Au modificado com, a) CS₂/AuNPs/GOx, CS₂ e CS₂/AuNPs, a de 5 mV s⁻¹, em solução de PBS (pH 7.4), contendo 0.1 mM FDCA, com 0.50 mM Glucose

Os voltamogramas cíclicos apresentados na figura 3.19 mostram a resposta enzimática da GOx imobilizada via CS₂ no eletrodo, na presença de AuNPs, após várias adições de substrato. Observou-se o aumento da densidade de corrente do processo de oxidação do FMCA até uma concentração de 50 mM de glucose (figura 3.19). Nestes ensaios foi testado um mediador redox diferente do utilizado nos ensaios anteriores, pois observou-se que a baixa solubilidade do FDCA em soluções tamponadas dificultava a obtenção de resultados após várias adições de glucose. O pico anódico observado a 0.33 V é atribuído à reação de oxidação do ferroceno a catião ferricínio, devido à oxidação enzimática da glucose a gluconolactona, aumentando linearmente (figura 3.19) com sucessivas adições de glucose. A gama de

resposta do elétrodo modificado é entre 3 e 30 mM, obtendo-se a partir desta concentração um patamar estável de corrente que corresponde à saturação do enzima. A representação de Michaelis-Menten é exibida na figura 3.19b, permite a determinação da sensibilidade do biossensor e da determinação da constante de Michaelis-Menten (K_M^{app}), através da linearização de Lineweaver-Burk (figura 3.19b). Os valores de K_M^{app} e da sensibilidade são de 21 mM e $274 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, respetivamente.

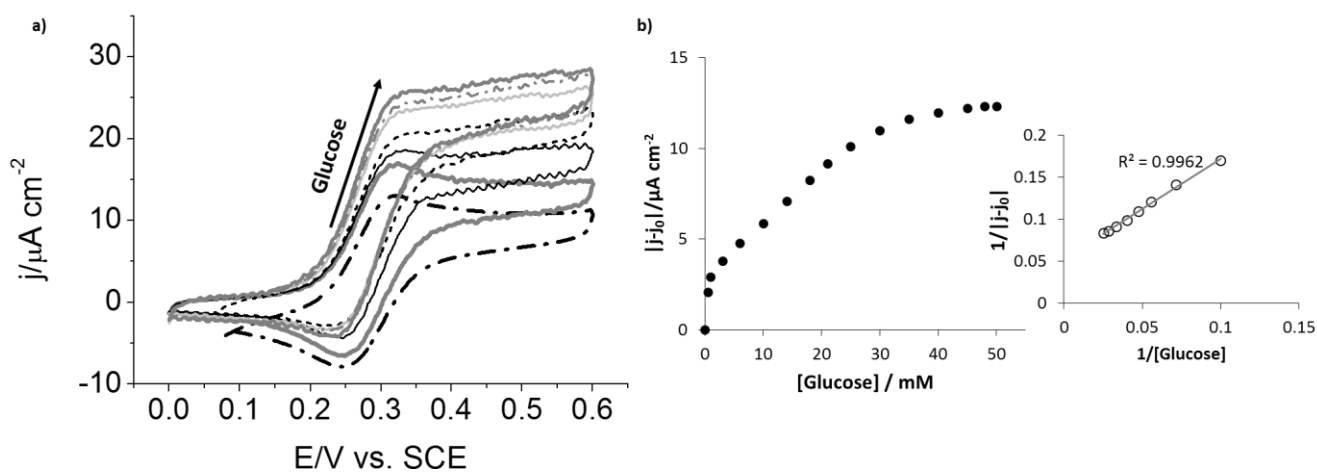


Figura 3.19 – a) Voltamogramas cíclicos do Au modificado com $\text{CS}_2/\text{AuNPs}/\text{GOx}$, a 5 mV s^{-1} , em solução de PBS (pH 7.4), contendo 0.1 mM FMCA, após sucessivas adições de glucose (0-50 mM); b) Representação da curva de Michaelis-Menten, $|j-j_0|$ vs. $[\text{glucose}]$; c) Representação gráfica da Linearização Lineweaver – Burk, $1/|j-j_0|$ vs. $1/[\text{glucose}]$; $y = (1.190 \pm 0.030)_x + (0.053 \pm 0.002)$.

O valor de K_M^{app} é inferior ao reportado na literatura para a GOx em solução, 33 mM [53] e consistente com os valores descritos para a GOx imobilizada por outros métodos tais como, sol-gel [54] (22 mM), formação filmes de polipirrolo [55] (19 mM) ou de Nafion (14.91 mM) [56]. A sensibilidade estimada a partir da representação de Michaelis-Menten é significativamente superior à reportada para elétrodos de carbono vítreo com GOx e nanopartículas de NdPO_4 [3], ou polímeros condutores [57]. Estes resultados demonstram que o processo de imobilização do enzima não prejudicou a sua atividade biológica, mantendo o seu centro ativo disponível para catalisar a glucose.

Para efeitos comparativos, foram realizados ensaios catalíticos com o eléctrodo modificado com CS₂ e GOx na ausência de nanopartículas (figura 3.20), usando o FMCA como mediador. Como se pode observar, as densidades de corrente são significativamente inferiores comparativamente às obtidas nos eléctrodos modificados na presença de AuNPs, no entanto a densidade de corrente do pico de oxidação do mediador aumenta com o aumento da quantidade de glucose em solução, indicando que a GOx permanece ativa na superfície do eléctrodo e que catalisa o substrato até ficar saturada. Os parâmetros analíticos determinados pela curva de Michaelis-Menten representada na figura 3.20b forneceram informação sobre a gama linear a que o biossensor responde, 3 a 30 mM com uma sensibilidade de 48 mA M⁻¹ cm⁻², enquanto a partir Linearização Lineweaver – Burk exibida na figura 3.20c, determinou-se uma K_M^{app} do enzima imobilizado, que é de 21 mM. Como referenciado anteriormente, este valor encontra-se da gama descrita na literatura para a GOx adsorvida nos eléctrodos [56, 58], no entanto é bastante próximo do estimado para o eléctrodo modificado na presença de AuNPs. Este facto pode ser justificado pelo nível de afinidade entre a GOx e a glucose (enzima-substrato) ser similar para ambos os eléctrodos, obtendo-se valores K_M^{app} próximos.

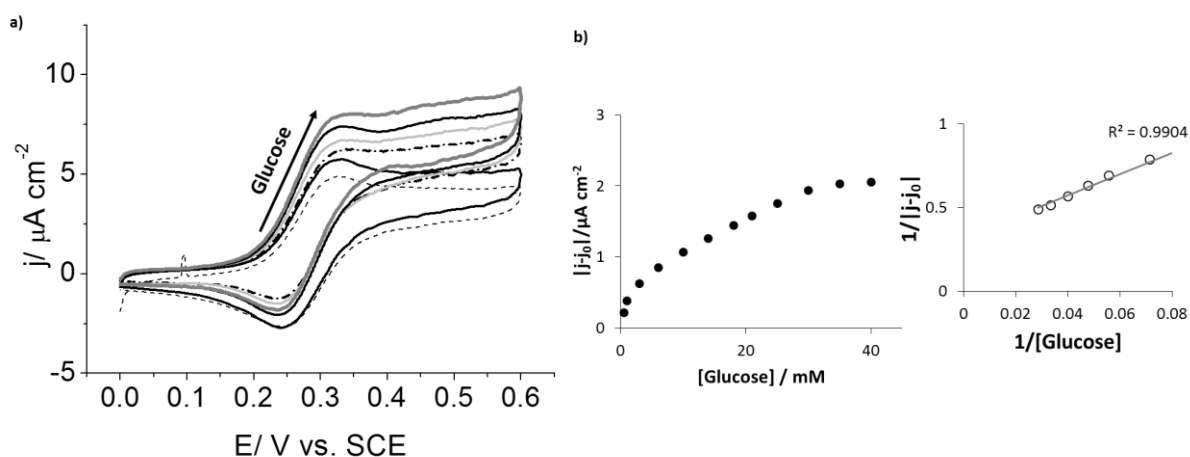


Figura 3.20 – a) Voltamogramas cíclicos do Au modificado com CS₂/GOx, a 5 mV s⁻¹, em solução de PBS (pH 7.4), contendo 0.1 mM ácido ferrocenocarboxílico, após sucessivas adições de glucose (0-40 mM); b) Representação da curva de Michaelis-Menten, |j-j₀| vs. [glucose]; c) Representação gráfica da Linearização Lineweaver – Burk, 1/|j-j₀| vs. 1/[glucose]; $y = (6.361 \pm 0.280)_x + (0.310 \pm 0.164)$.

Uma das principais vantagens da utilização de AuNPs na modificação dos elétrodos é não só aumentar a área superficial do elétrodo mas também poder facilitar, devido à sua estrutura eletrónica, a transferência eletrónica direta entre o centro ativo do enzima e o elétrodo de ouro (eq. 19, figura 3.21). Contudo, esta reação de transferência eletrónica direta entre o centro ativo FAD e a superfície de ouro é dificultada por diversos fatores, tais como, a orientação do enzima e do centro ativo após a sua imobilização, distância entre o centro ativo e o elétrodo, presença de mediadores “naturais” (O₂) [51].

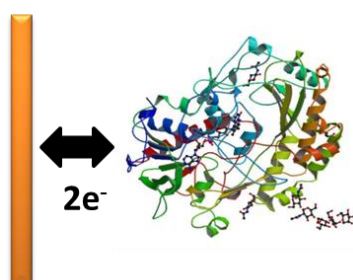


Figura 3.21 – Esquema representativo da transferência eletrónica direta entre a GOx e a superfície do elétrodo

Os voltamogramas cíclicos registados na ausência de oxigénio estão representados na figura 3.22, foram obtidos em tampão fosfato salino (PBS pH 7.4). Os processos detetados a -0.23 V e a -0.19 V, apesar de não serem muito notórios a velocidades mais baixas, deverão ser atribuídos à reação redox do FAD/FADH₂ do enzima [59]. Lo Gorton e seus colaboradores [60, 61] reportam diversos estudos onde investigam os processos redox do FAD, descrevendo que os potenciais mais prováveis de se verificar a reação redox a -0.21 V, em condições de pH semelhantes. Considerando que o FAD não se encontra covalentemente ligado à GOx, este pode, devido ao processo de adsorção, libertar-se do enzima e ficar livre ou ligar-se a outro local mais próximo do elétrodo. Desta forma poderá considerar-se que o FAD da GOx poderá ter-se ligado, ou às AuNPs ou à superfície do elétrodo, facilitando a ocorrência, especialmente, da reação de redução a FADH₂ [60-62].

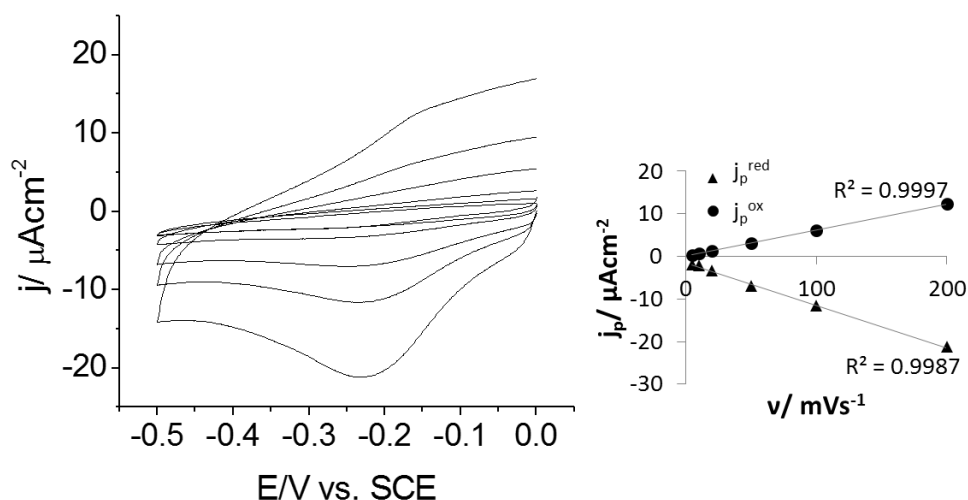


Figura 3.22 - Voltamogramas cíclicos do Au modificado com CS₂ /AuNPs/GOx, a várias velocidades de varrimentos (5-200 mV s⁻¹) em PB (pH 7.4) e a representação gráfica de j_p versus v .

Nos ensaios realizados não ausência de AuNPs (figura 3.23), não foi detetado este processo redox, corroborando que a presença das nanoestruturas deverá facilitar a ocorrência desta reação. A densidade de corrente de redução e oxidação aumenta linearmente com a velocidade de varrimento (figura 3.22a) sugerindo que o processo redox deverá ser um processo de superfície controlado por transferência de carga, envolvendo a transferência de dois elétrões, como é descrito na equação 7 e ilustrado no esquema da figura 3.21.

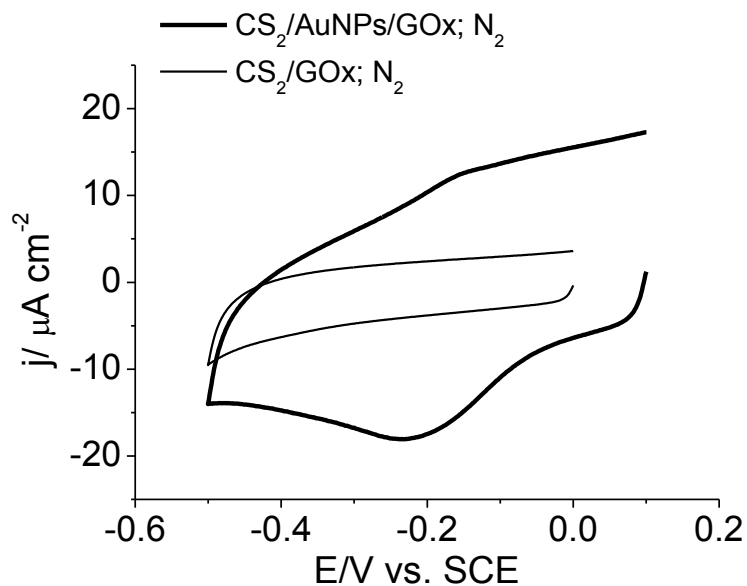


Figura 3.23 - Voltamogramas cíclicos do eléctrodo modificado com, CS_2 /AuNPs/GOx em solução tampão-fosfato PB (pH 7.4) e CS_2 /GOx, a 200 mVs^{-1} , em solução PB desarejada com N_2 .

A morfologia dos eléctrodos modificados com CS_2 /AuNPs/GOx, obtidas por AFM, são apresentadas na figura 3.24. Foi possível observar que a superfície do Au (111) está coberta com um filme com glóbulos com dimensões de $40 \pm 6 \text{ nm}$, que exibem um grande contraste na imagem de fase. Estas estruturas podem ser atribuídas às AuNPs biofuncionalizadas com CS_2 /GOx, considerando que na superfície modificada apenas com CS_2 /GOx (figura 3.25) [17] estas não foram visíveis.

As figuras 3.26a e b foram obtidas após a colocação de uma gota da suspensão coloidal de AuNPs e GOx, com e sem CS_2 , numa superfície de mica. Foi possível constatar o aumento do diâmetro das AuNPs modificadas na presença de CS_2 e GOx, relativamente às AuNPs puras (figura 3.13), apresentando formas bastante distintas. Devido à larga distribuição de diâmetros das AuNPs modificadas com CS_2 e GOx, representou-se o seu tamanho segundo uma distribuição bimodal Gaussiana, obtendo os máximos em 42 e 75 nm. É de notar que, na ausência de CS_2 , as AuNPs apresentam diâmetros similares aos verificados sem qualquer tipo de modificação (figura 3.26), validando a importância do CS_2 nesta reacção de biofuncionalização de superfícies de ouro.

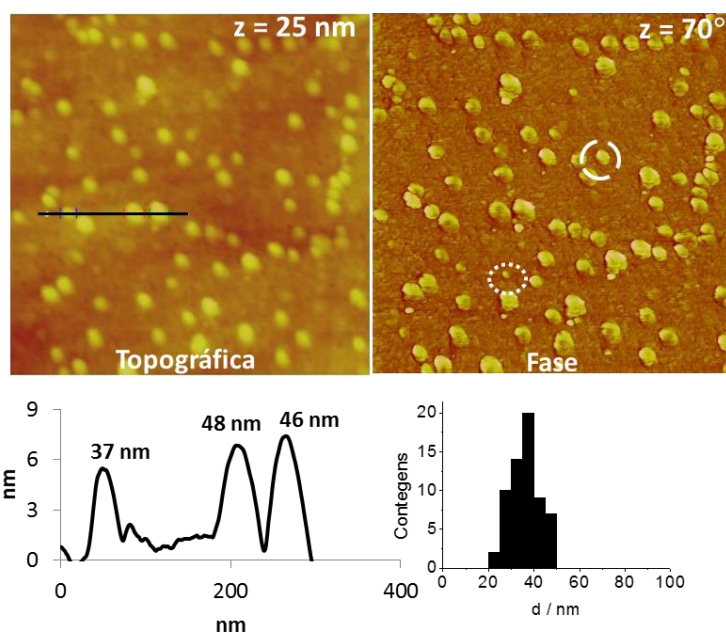


Figura 3.24 – Imagens de AFM de topografia e de fase dos eléctrodos modificados com AuNPs/CS₂/GOx, ($750 \times 750 \text{ nm}^2$), com o perfil e a distribuição de tamanho de partícula correspondente.

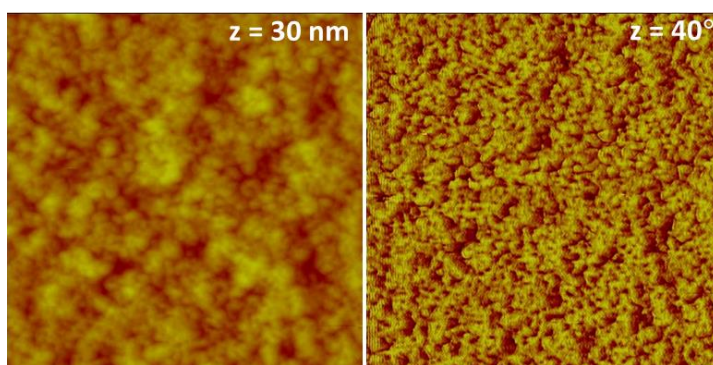


Figura 3.25 – Imagens de AFM ($750 \times 750 \text{ nm}^2$) de topografia e de fase das superfícies de ouro modificadas com CS₂/GOx,.

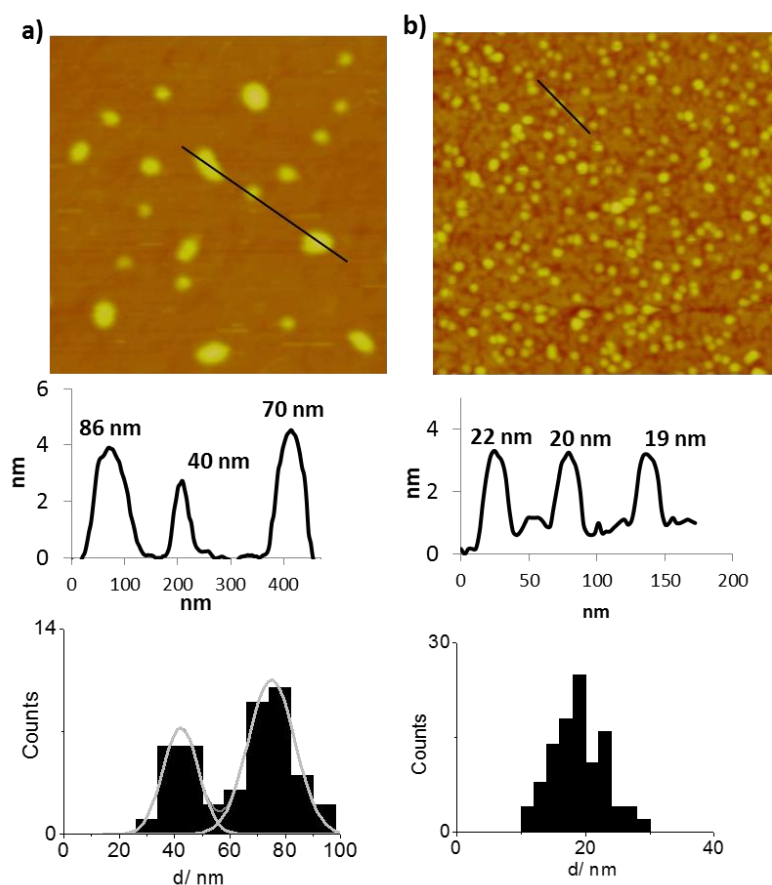


Figura 3.26 – Imagens de AFM ($750 \times 750 \text{ nm}^2$) da superfície de mica após a colocação de uma gota das AuNPs modificadas com glucose oxidase ($z = 15 \text{ nm}$) na presença a) e ausência b) de CS_2 . Os perfis topográficos e os correspondentes histogramas da distribuição são mostrados para cada imagem. O histograma da figura 3.21b foi ajustado com base numa distribuição Gaussiana bimodal.

Nos espectros de UV-vis da figura 3.27 observaram-se desvios do comprimento de onda da banda de ressonância do plasmão de superfície das AuNPs ($\sim 20 \text{ nm}$), localizada a $\sim 520 \text{ nm}$, para valores de comprimento de onda ligeiramente maiores (529 nm) e diminuição da intensidade da banda, ambos originados pelo aumento do tamanho das AuNPs devido a adsorção dos compostos.

Em analogia ao discutido na secção 3.1.1, as AuNPs modificadas com CS_2 e GOx e adsorvidas nos elétrodos de ouro apresentam diâmetros menores e formas menos irregulares do que os observados em mica, como mostrado na figura 3.24a, o que deve ser uma consequência da rápida adsorção das AuNPs no Au (111).

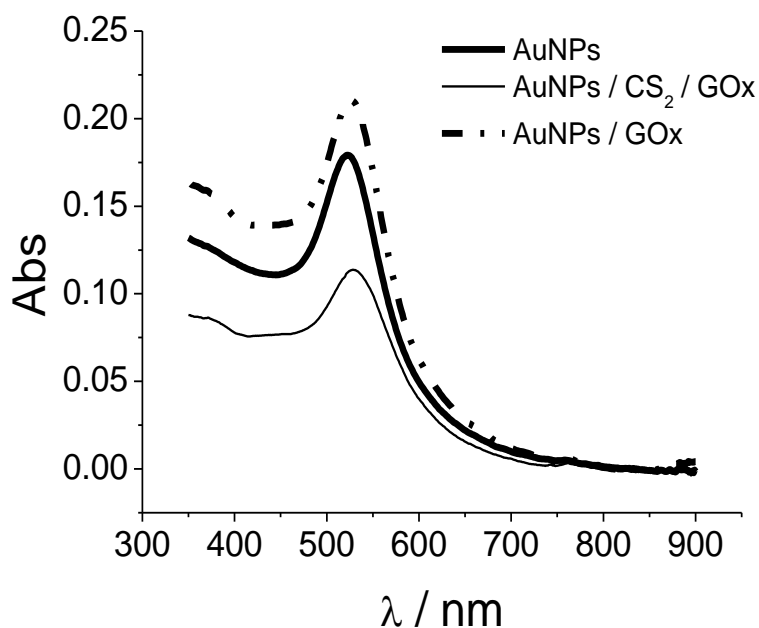


Figura 3.27 – Espectros de UV-visível das AuNPs (~ 20 nm) antes e após modificação com CS₂/GOx e apenas GOx, em suspensão coloidal.

A imobilização da GOx num só passo *via* CS₂ e na presença de AuNPs, e a preservação da sua atividade biológica foi comprovada pelos resultados obtidos por voltametria cíclica, seguindo-se o aumento significativo da oxidação do mediador de ferroceno e a redução de H₂O₂ formado, com a adição de glucose. A caracterização morfológica dos elétrodos modificados suporta a viabilidade desta metodologia simples. A utilização deste método simples e versátil terá certamente impacto na preparação de biossensores, relativamente aos métodos existentes, podendo ser aplicado com outros enzimas e com outro tipo de nanomateriais, como é demonstrado de seguida.

3.2 Nanoestruturas magnéticas de óxido de ferro

A investigação sobre a imobilização de biomoléculas em superfícies semicondutoras de óxidos metálicos, tais como, nanopartículas magnéticas, tem vindo a aumentar, uma vez que estes nanomateriais, aliados às suas características superparamagnéticas, asseguram a preservação das propriedades de reconhecimento

biológico de enzimas em conjunto com uma amplificação do sinal eletroquímico [63-66]. As nanopartículas de óxidos metálicos apresentam uma excelente biocompatibilidade, grande área superficial específica e uma boa condutividade à nanoescala, que permite uma ligação eficiente dos centros catalíticos das proteínas [23, 67-69]. As nanopartículas magnéticas, tais como Fe_3O_4 (magnetite) e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (magemite), têm-se apresentado como uns dos candidatos mais promissores para o desenvolvimento de biossensores [70-72]. Estas podem ser facilmente preparadas por métodos de co-precipitação dos íons de Fe (III) e Fe (II) em soluções ácidas ou básicas, o que irá conferir às nanopartículas de magnetite propriedades hidrofílicas, com carga positiva ou carga negativa, respetivamente [73]. O solvente e compostos de revestimento são cuidadosamente escolhidos, de forma a evitar a agregação das partículas e atestar a formação de nanopartículas com tamanhos uniformes, e permitindo a funcionalização da superfície do óxido de ferro [74-77]. A qualidade da funcionalização da superfície das nanopartículas é crucial para uma eficiente aplicação deste tipo de plataformas em dispositivos biomédicos [78].

A formação *in situ* de ditiocarbamatos (DTC) já foi apresentada na secção anterior como uma alternativa ao uso de monocamadas auto-montadas de alcanotióis em ouro para imobilizar biomoléculas. A interação entre as espécies de enxofre e óxidos metálicos foi recentemente discutida [79], destacando-se a relação qualitativa entre o hiato ótico dos óxidos metálicos e sua reatividade perante o enxofre. Quanto menor o hiato ótico de um óxido de ferro (como é o caso de Fe_3O_4 , cerca de 2.1) [80], maior é a interação com radicais de enxofre, uma vez que é mais fácil mover os eletrões de valência. Naturalmente, no caso dos óxidos com hiato ótico semelhante, existem outros fatores implícitos, tais como a morfologia, o número de centros metálicos e a presença e tipo de interstícios vazios de oxigénio, etc, que também determinam a interação com o enxofre. A eficiente ligação de tióis a nanopartículas de óxido de ferro foi provada pelo revestimento formado pelo aminoácido cisteína nas nanopartículas de Fe_3O_4 [81].

Recentemente, foi também demonstrado que, à semelhança das nanopartículas de ouro [18], o dissulfureto de carbono pode ser usado para ligar nanopartículas de óxido de ferro a um elétrodo de ouro. As superfícies electrocatalíticas foram testadas com sucesso para a reação de redução de oxigénio [82].

Neste trabalho, é proposto o uso de nanopartículas de óxido de ferro e a metodologia de um só passo anteriormente apresentada para modificar quimicamente superfícies de ouro com agregados nanocatalíticos de Lacase e Fe_3O_4 . Esta reação simples baseia-se, em primeiro lugar, na formação *in situ* de ditiocarbamatos, pela reação entre grupos NH_2 e CS_2 que se ligarão a nanopartículas de Fe_3O_4 , e em segundo lugar, sobre as moléculas de CS_2 livres que ligam as nanopartículas modificadas à superfície. O esquema ilustrativo da metodologia de modificação de superfícies de ouro proposta neste trabalho é apresentado na figura 3.28. Moléculas pequenas contendo grupos amina (epinefrina e a hexilmetilamina) foram utilizadas para demonstrar o conceito da metodologia proposta, assim como o enzima Lacase é utilizado visando a preparação de um biossensor sensível a catálise do ABTS.

O enzima Lacase é um oxidorreductase que contém quatro átomos de cobre classificados em T1, T2 e T3, capazes de catalisar a oxidação de orto e paradifenóis, polifenóis, bem como de alguns iões inorgânicos, em simultâneo com a redução de oxigénio a água [83]. Existem alguns estudos que relatam metodologias de imobilização de compostos biológicos, na sua maioria utilizando a glucose oxidase, em nanopartículas de Fe_3O_4 , por meio de, ligações de covalentes [66, 70, 84], deposição camada-sob-camada [85] ou através de métodos de polimerização [86]. Muito embora já existam alguns estudos sobre a atividade catalítica da Lacase adsorvida covalentemente sobre a superfície das nanopartículas magnéticas, a maioria destes trabalhos utilizam nanopartículas de Fe_3O_4 revestidas com SiO_2 [70, 86-88] e o glutaraldeído é o agente de ligação mais usado. A formação de filmes espontâneos de polidopamina é outra das metodologias que tem sido utilizada para funcionalizar nanopartículas de Fe_3O_4 com biomoléculas [70, 72]. Na maior parte destes procedimentos, os enzimas ligados às nanopartículas são depositados por *drop-casting* em elétrodos de carbono vítreo, avaliando-se electroquimicamente a sua atividade catalítica.

A resposta catalítica da Lacase imobilizada nos elétrodos modificados neste trabalho foi testada para a deteção de 2,2' - azino -bis (ácido 3 - etilbenzotiazolina - 6 - sulfónico (ABTS). Considerando que o tamanho das nanopartículas de magnetite podem desempenhar um efeito direto no seu grau de oxidação e, por conseguinte, sobre a composição química e a condutividade (razão entre $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) das

nanopartículas, investigou-se dois tamanhos de diâmetro médio (20 e 40 nm) e avaliou-se o seu desempenho eletroquímico.

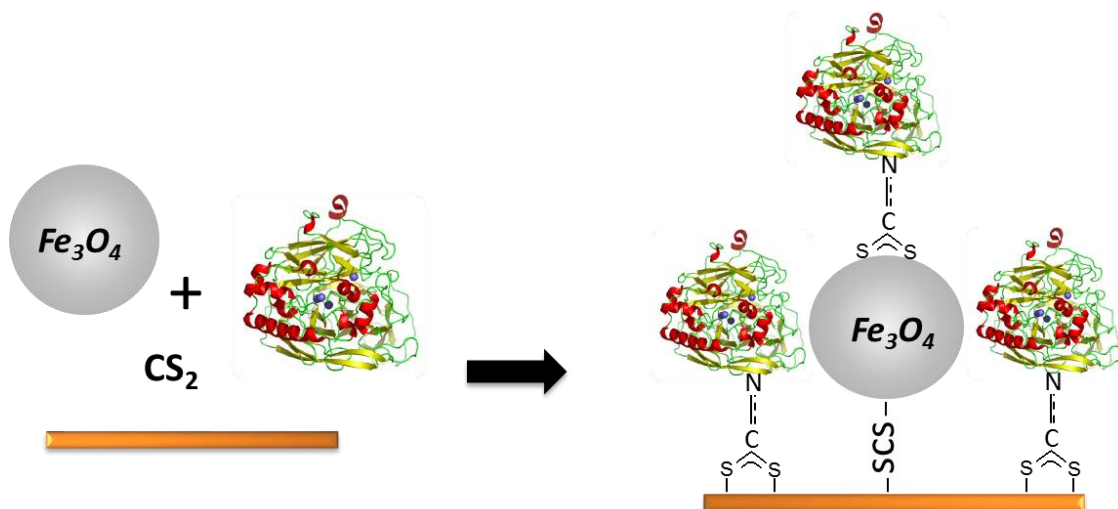


Figura 3.28 - Esquema representativo da metodologia usada para a funcionalização de superfícies de ouro com CS_2 (1 mM), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (3 mg/mL), Lacase (1mg/ml).

3.2.1 Caracterização morfológica e estrutural das nanopartículas de Fe_3O_4

Inicialmente, caracterizou-se as nanopartículas em suspensão coloidal por duas técnicas de microscopia, TEM e AFM. A figura 3.29 mostra as imagens obtidas por ambas as técnicas das nanopartículas de Fe_3O_4 preparadas em autoclave a 200°C durante 3 e 24 h, com os correspondentes histogramas e perfis topográficos. Os histogramas da distribuição de tamanho (A e B) exibem diâmetros médios com 20 ± 5 nm e 41 ± 9 nm, os quais são perfeitamente coincidentes com os perfis traçados nas imagens de AFM. Para simplificação, as amostras de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ foram identificadas com os valores de 20 e 40 nm.

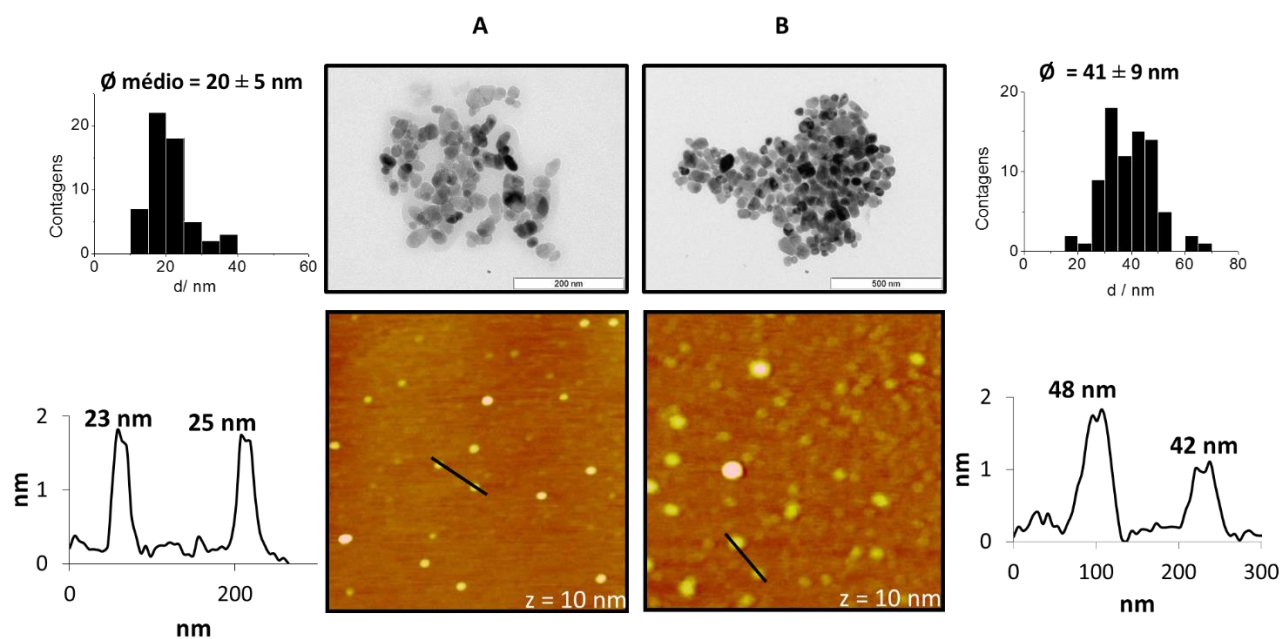


Figura 3.29 – Imagens das Fe₃O₄NPs preparadas em autoclave a 200°C durante 3 h (A) e 24 h (B); linha superior: imagens de TEM e os correspondentes histogramas; linha inferior: imagens de AFM ($1.0 \times 1.0 \mu\text{m}^2$) das suspensões aquosas das nanopartículas de Fe₃O₄NPs, após colocação e secagem de uma gota numa superfície de mica e os perfis topográficos correspondentes.

Os difratogramas obtidos por raios-X das amostras de Fe₃O₄NPs são apresentados na figura 3.30. Todos os picos de difração foram atribuídos à estrutura cúbica da magnetite, confirmando a pureza de ambas as amostras. O pico intenso a 35.426° é conferido ao índice de Miller (311) do Fe₃O₄, como esperado para esta superfície de óxido metálico [81, 82, 89]. Os parâmetros da célula unitária foram estimados para as nanopartículas de 20 e 40 nm, $a = 8.386(5)$ Å e $a = 8.394(3)$ Å, respetivamente e estão de acordo com estudos anteriores [82, 89], confirmando a dependência do parâmetro da célula unitária com o tamanho médio da partícula. A amostra que foi aquecida a 200°C durante 24 h mostra um parâmetro de célula ($a = 8.394(5)$ Å) próximo ao da magnetite pura (em massa) ($a = 8.396$ Å), o que está consistente com a presença de uma superfície menos oxidada, esperada para nanopartículas de maiores dimensões, devido à baixa razão área/volume superficial.

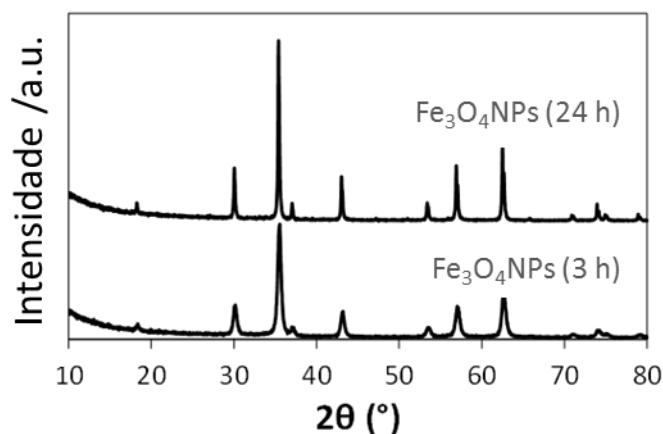


Figura 3.30 – Difratoograma de raios-X das nanopartículas de Fe₃O₄NPs sintetizadas com tratamento térmico durante 3 e 24 h.

3.2.2 Formação de ditiocarbamatos em suspensão coloidal

A amina secundária, hexilmetilamina (HMA), foi usada para reagir com o CS₂ e Fe₃O₄NPs (40 nm) para confirmar a funcionalização das Fe₃O₄NPs em suspensão coloidal via formação *in situ* de grupos ditiocarbamatos. A caracterização por UV-visível das suspensões aquosas e coloidais da CS₂, HMA, Fe₃O₄NPs (40 nm) e CS₂/Fe₃O₄NPs/HMA são apresentados na figura 3.31.

As nanopartículas de Fe₃O₄ de 40 nm, em suspensão coloidal, absorvem na gama de comprimentos de onda estudados, como reportado anteriormente [82]. A HMA exibe duas bandas de absorção nesta região, uma mais intensa a 250 e uma mais pequena a 288 nm (figura 3.31), enquanto as moléculas de CS₂ absorvem a um comprimento de onda de, aproximadamente, 315 nm [19], cuja intensidade é conhecida por diminuir significativamente ao longo do tempo, na presença de grupos amina. As nanopartículas modificadas, após a reação com o CS₂, e HMA, foram exaustivamente lavadas, com o auxílio de um magnet, e re-suspendidas em tampão fosfato. A presença de bandas de absorção típicas para os ditiocarbamatos foram detetadas no espectro das Fe₃O₄NPs modificadas (linha vermelha, figura 3.31), através da visualização das bandas de 255 e 281 nm, consistentes com o reportado em outros estudos (260 e 290 nm) [15].

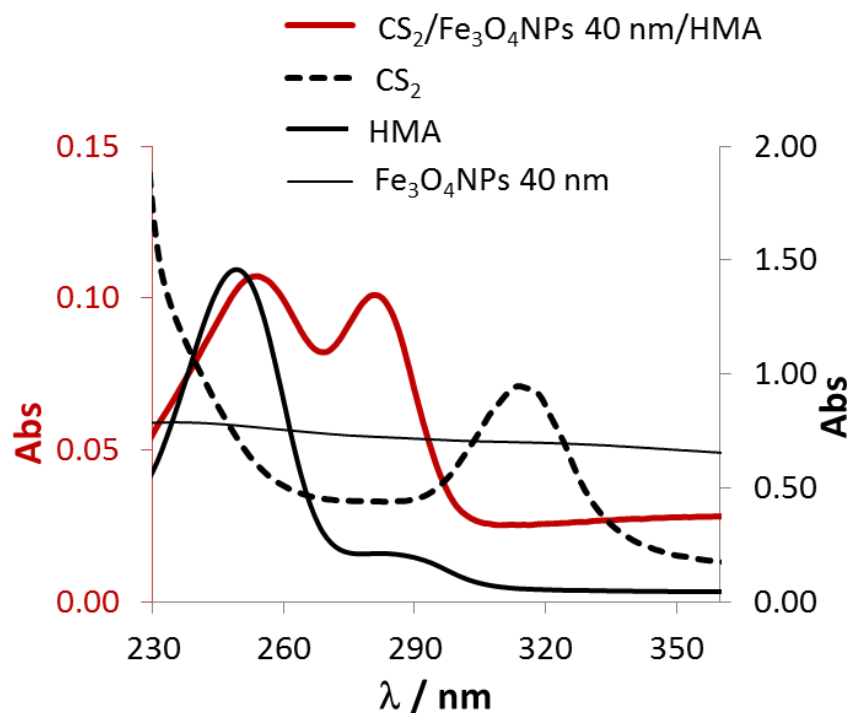


Figura 3.31 – Espectros de UV-visível para, CS_2 , HMA, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (40 nm) e $\text{CS}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}/\text{HMA}$; (as concentrações dos compostos são: 0.25 mM de CS_2 , 0.50 mM de HMA) em tampão fosfato.

3.2.3. Eléttodos modificados com compostos “modelo”

O estudo da reatividade entre o CS_2 e os grupos amina com formação *in situ* de grupos de ditiocarbamatos nas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ foi efetuado usando uma molécula “modelo”, a epinefrina, já estudada na secção 3.1 deste capítulo. A voltametria cíclica foi usada para investigar a funcionalização de eléctrodos de ouro com as $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ modificadas.

Inicialmente e para provar a imobilização das $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ através CS_2 investigou-se a resposta eletroquímica, em condições ácidas, dos eléctrodos modificados com CS_2 e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (40 nm). Os processos redox detetados ($E_p^{\text{ox}} = 0.53 \text{ V}$ e $E_p^{\text{red}} = 0.41 \text{ V}$) demonstraram ser estáveis numa gama de potencial após vários ciclos, o que corresponde a uma transferência electrónica que não é controlada por difusão. A dependência linear das correntes do pico anódico com a velocidade de varrimento é mostrada na figura 3.32a. Para efeitos comparativos também foi registado o

voltamograma cíclico correspondente à superfície de ouro modificada com CS₂ (na ausência de NPs). O processo é atribuído à conversão eletroquímica do Fe^(II)/Fe^(III) das Fe₃O₄NPs, que apesar de não se encontrar bem documentada para nanopartículas de magnetite, é consistente com os valores dos potenciais registrados para magnetite maciça [90]. Adicionalmente, foi obtido um comportamento eletroquímico semelhante (2º e 10º ciclos) no eletrodo modificado com CS₂/Fe₃O₄NPs (40 nm) em solução tampão fosfato (pH 7.4), observando-se um pequeno desvio dos potenciais para valores mais positivo (0.47 e 0.39 V), como é possível verificar no voltamograma cíclico representado na figura 3.33. As superfícies modificadas com nanopartículas de magnetite de 40 nm mostraram-se estáveis durante os ensaios eletroquímicos, após o varrimento de repetidos ciclos de potencial (10º ciclo é mostrado na figura 3.32) e realizados em solução ácida, como também foi demonstrado pela relação linear obtida entre as densidades de corrente e a velocidade de varrimento. Esta estabilidade poderá ser devido à formação espontânea de um revestimento orgânico de moléculas de CS₂ à superfície das nanopartículas e a uma ligação estável das nanopartículas ao eletrodo de ouro plano criada pelo CS₂.

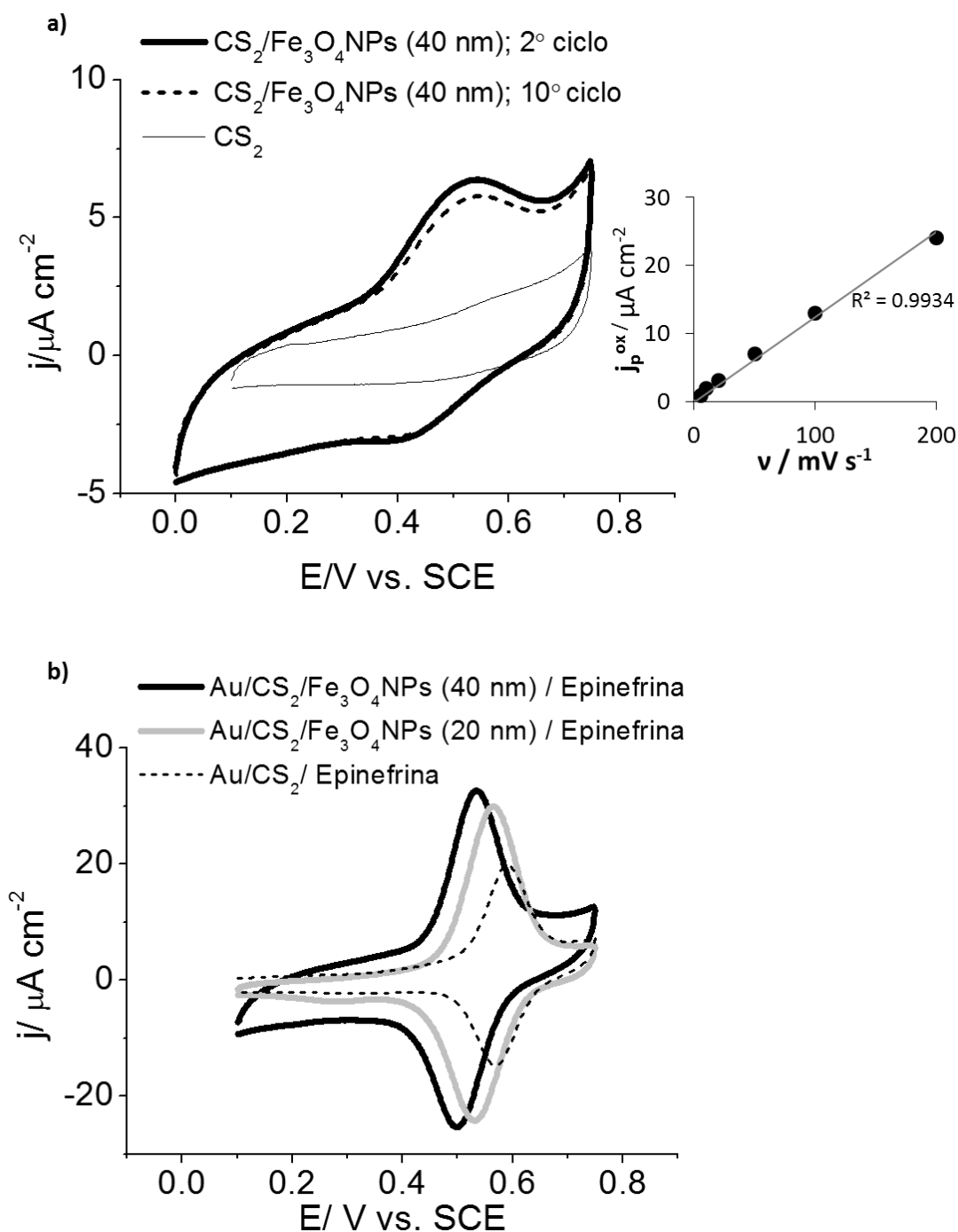


Figura 3.32 – Voltamogramas cíclicos (2º e 10º ciclos) dos elétrodos modificados com a) CS₂/Fe₃O₄NPs (40 nm), em 0.1 M H₂SO₄, a 50 mVs⁻¹; j_p^{ox} versus v ; b) CS₂/Epinefrina com e sem Fe₃O₄NPs, in 0.1 M H₂SO₄ e $v = 50 mV s^{-1}$. Os elétrodos modificados foram preparados em soluções aquosas.

Na figura 3.32b são apresentados os estudos redox das superfícies modificadas na presença de epinefrina com e sem $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (20, 40 nm), preparados em meio aquoso (tampão fosfato pH 7.4). Verificou-se que na presença de NPs, os picos de oxidação e redução, atribuídos às formas redox da epinefrina, hidroquinona/quinona [17, 18], apresentam um $\Delta E_p \sim 0.03$ V e um $E_{1/2}$ desviado para valores mais negativos, comparativamente ao elétrodo de Au (111) modificado, na ausência de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ ($E_{1/2} = 0.58$ V). Os valores de $E_{1/2} = 0.55$ e $E_{1/2} = 0.51$ V foram obtidos para as $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ de 20 e 40 nm, respetivamente, indicando que o processo de transferência eletrónica da epinefrina, que está adsorvida às NPs, foi facilitado, principalmente na presença das NPs maiores, que apresentam uma superfície menos oxidada, comparativamente às NPs de menores dimensões.

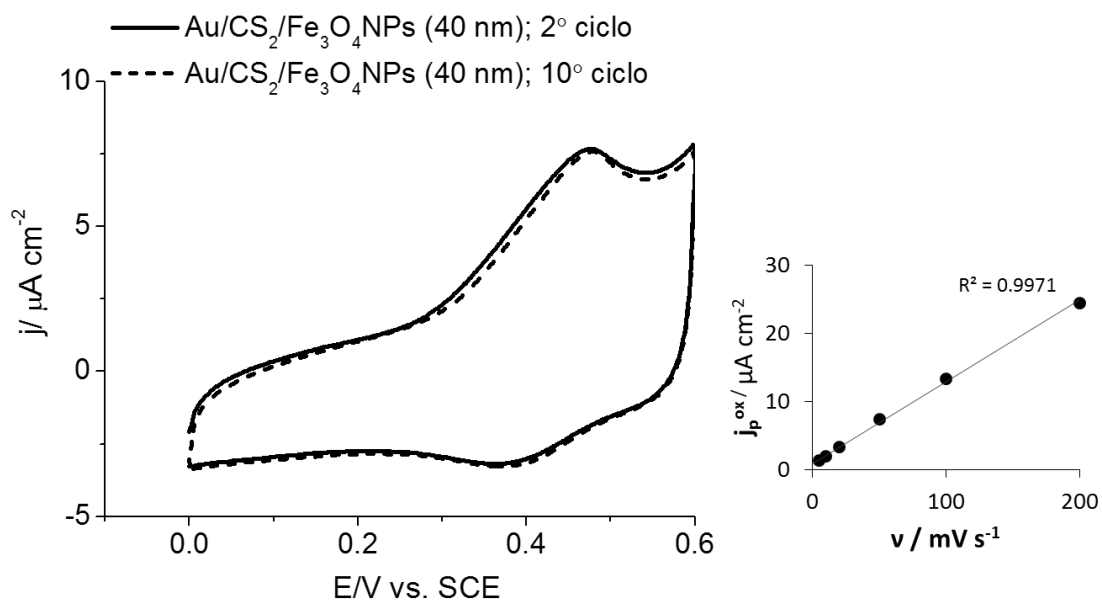


Figura 3.33 – Voltamogramas cíclicos (2^o e 10^o ciclos) das superfícies de ouro funcionalizadas com $\text{CS}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (40 nm), preparadas em soluções aquosas de tampão fosfato (pH 7.4), obtidas a 50 mV s^{-1} ; representação gráfica de j_p^{ox} versus v .

A velocidade de varrimento de 50 mVs^{-1} utilizada para traçar os voltamogramas cíclicos mostrados na figura 3.32b dos elétrodos modificados com nanopartículas de magnetite e epinefrina não permite distinguir entre os dois processos redox da epinefrina e das $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$. No entanto, a velocidades de varrimentos inferiores

(5 mV s^{-1}), estes processos podem ser claramente detetados tanto em pH 1 como a pH 7.4 (figura 3.34). Os processos redox das $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ foram designados como I, em que a pH 1, $E_{1/2}(\text{I}) = 0.40 \text{ V}$ e a pH 7.4 é 0.31 V , enquanto os da conversão eletroquímica da epinefrina foram designados como II, com $E_{1/2} = 0.56$ e 0.16 V , a pH 1 e 7, respetivamente. Enquanto os picos redox das $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ não alteram significativamente o seu potencial com a alteração do pH, a resposta redox da epinefrina muda drasticamente, como é esperado para uma transferência eletrónica de $2e^-$ e 2H^+ [17, 18]. Estes resultados corroboram a atribuição dos processos eletroquímicos das $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ e da catecolamina, comprovando a presença de ambos os adsorbatos na superfície do eléctrodo. A cobertura superficial da epinefrina foi estimada com base na integração dos processos de oxidação (figura 3.32b), considerando o envolvimento de 2 eletrões na conversão eletroquímica da hidroquinona/quinona. A adição das NPs na reação origina um aumento substancial da quantidade de epinefrina adsorvida nos eléctrodos de 1.5×10^{-10} (sem NPs) para 2.5×10^{-10} (NPs de 20 nm) e 2.7×10^{-10} (NPs de 40 nm) mol cm^{-2} , demonstrando a eficiência da metodologia de um só passo para imobilizar compostos amina.

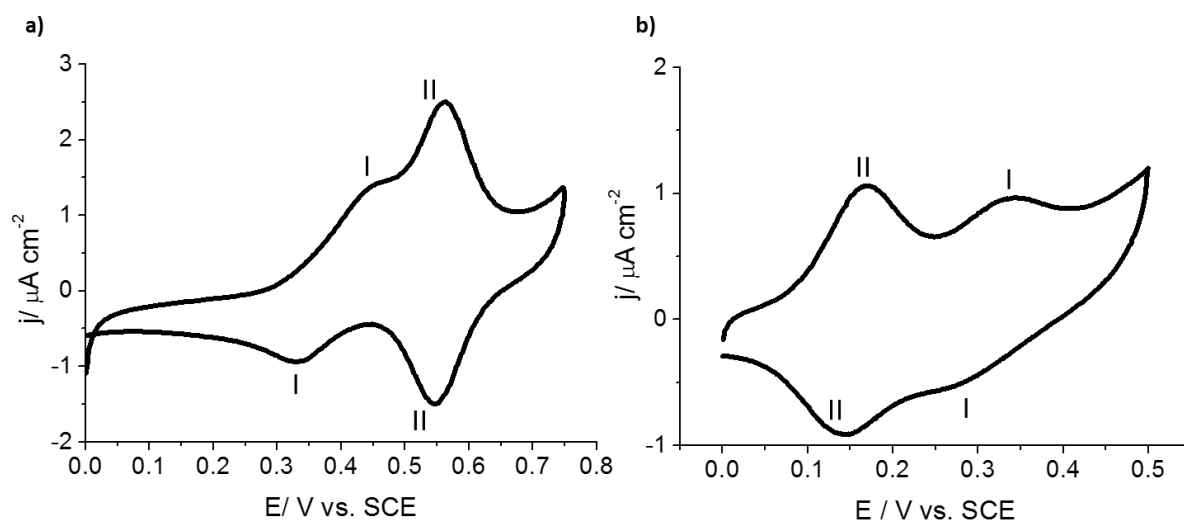


Figura 3.34 – Voltamogramas cíclicos dos eléctrodos modificados com CS_2 , epinefrina e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (20 nm) em a) $0.1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ (pH 1) e b) solução tampão fosfato (pH 7.4), registados a 5 mV s^{-1} .

Foram realizados estudos de desadsorção redutiva do eletrodo modificado com CS₂/Fe₃O₄NPs, com o intuito de confirmar que as nanopartículas estão ligadas à superfície de ouro plano, através dos átomos de enxofre do CS₂. Os voltamogramas cíclicos obtidos estão representados na figura 3.35, onde foi possível detetar dois picos catódicos a -0.92 V e -0.77, os quais deverão indicar possivelmente a presença de diferentes ambientes de enxofre, de acordo com o anteriormente verificado no sistema com AuNPs [18]. De acordo com Cohen e seus colaboradores [81], a adsorção de enxofre de nanopartículas de óxido de ferro deverá ocorrer principalmente através da ligação química Fe-S .

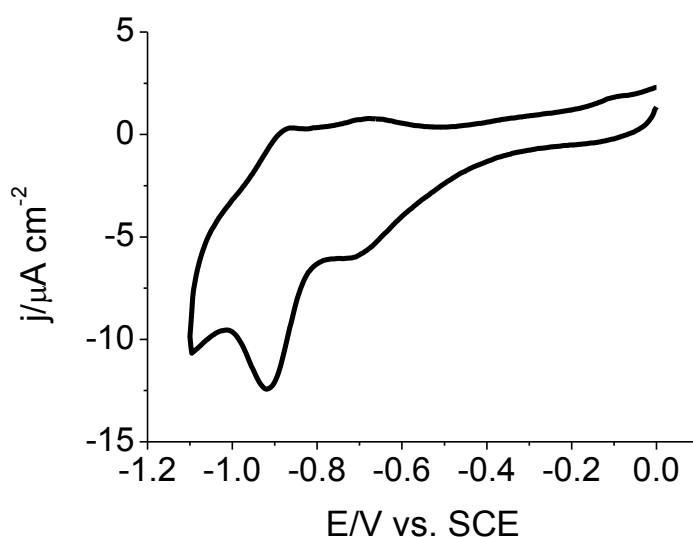


Figura 3.35 – Voltamogramas cíclicos dos eletrodos modificados com CS₂/Fe₃O₄NPs (40 nm) preparados em solução aquosas (tampão fosfato, pH 7.4), registados a 20 mV s⁻¹ em 0.1 M NaOH.

3.2.4. Atividade enzimática de nanoconjugados de Lacase

Como referido anteriormente, a Lacase foi o enzima escolhido para a imobilização, juntamente com as Fe₃O₄NPs, em superfícies de ouro, uma vez que é conhecida por catalisar compostos fenólicos e que as suas propriedades catalíticas

podem ser significativamente aumentadas quando combinada com nanopartículas semicondutoras.

A análise morfológica foi realizada por AFM aos elétrodos modificados com i) CS_2 e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (40 nm) (figura 3.36), CS_2 , $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (40 nm), Lacase e $\text{CS}_2/\text{Lacase}$. Através das imagens apresentadas na figura 3.36a, foi possível distinguir nanopartículas individualizadas e diversos aglomerados à superfície do ouro. A espontaneidade desta metodologia e o excesso de CS_2 presente durante a reação de modificação, além de permitir que se liguem nanopartículas individuais ao Au (111), poderá promover a ligação entre nanopartículas (cada átomo de enxofre liga uma nanopartícula) em suspensão, formando nanoagregados que se ligam também ao elétrodo. A imagem do elétrodo modificado com $\text{CS}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (40 nm)/Lacase exibida na figura 3.36b, mostra uma superfície totalmente coberta com nanoestruturas dispersas em duas populações com tamanhos distintos, uma entre 40 e 80 nm, consistente com os conjuntos $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ funcionalizadas adsorvidas ao ouro, e outra com dimensões menores, até ca. 20 nm, atribuída às moléculas individuais de Lacase ligadas pelo CS_2 , conforme proposto na representação esquemática da figura 3.28. Para efeitos comparativos é apresentada uma imagem de AFM do elétrodo modificado apenas com Lacase e CS_2 (figura 3.33c). Observou-se que a superfície do elétrodo está coberta com pequenas estruturas globulares (cerca de 14 a 20 nm), consistente com o esperado por AFM para moléculas individuais de Lacase (tendo em conta os efeitos da convulsão da ponta utilizadas nas imagens de AFM, que podem ampliar ligeiramente o diâmetro do enzima) [91].

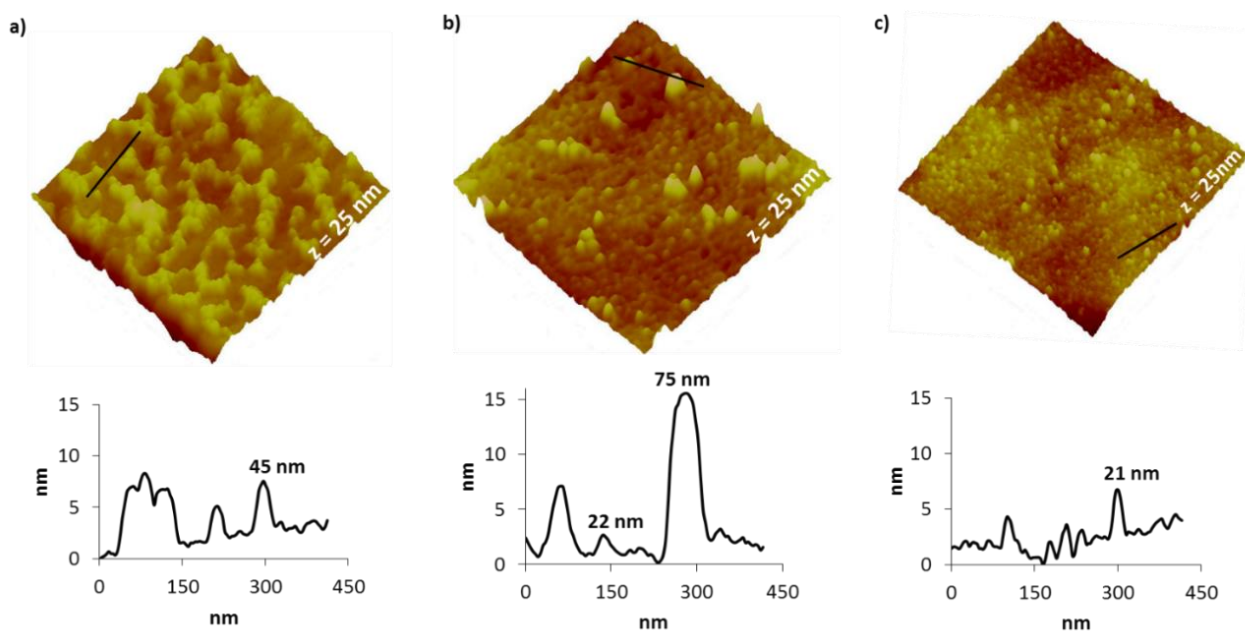
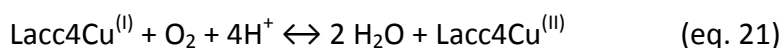


Figura 3.36 – Imagens ($1.0 \times 1.0 \mu\text{m}^2$) obtidas por AFM da morfologia dos elétrodos modificados com a) $\text{CS}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (40 nm), b) $\text{CS}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (40 nm)/Lacase e c) $\text{CS}_2/\text{Lacase}$, com o correspondente perfil topográfico em cada imagem.

De acordo com as equações (20-23) descritas de seguida [92] e como ilustrado no esquema da figura 3.37, a Lacase oxida o ABTS e recupera a sua forma oxidada através da reação simultânea da redução de O_2 a H_2O . O ABTS oxidado é reduzido na superfície do elétrodo, sendo esta a reação eletroquímica estudada por voltametria cíclica e cronoamperometria.



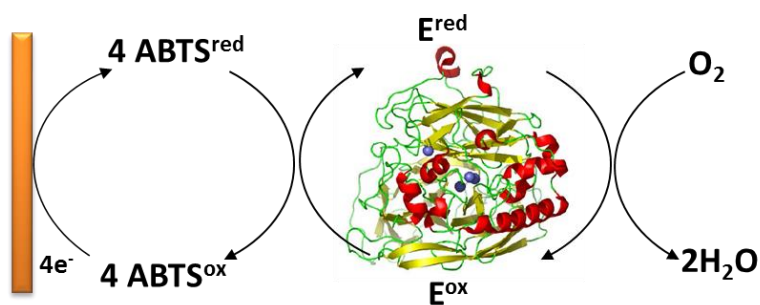


Figura 3.37 – Representação esquemática da atividade catalítica da Lacase para a deteção de ABTS.

A atividade enzimática da Lacase diretamente adsorvida no eléctrodo ou imobilizado pelo CS_2 , na presença ou ausência das $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (20 e 40 nm) para detetar o ABTS foi realizada em solução tampão citrato-fosfato (pH 4.6). A este valor de pH, a conversão redox de 0.5 mM ABTS em ouro foi detetada a $E_{1/2} = 0.46 \text{ V}$ ($\Delta E_p = 0.12 \text{ V}$), como é observado no voltamograma cíclico exibido na figura 3.38.

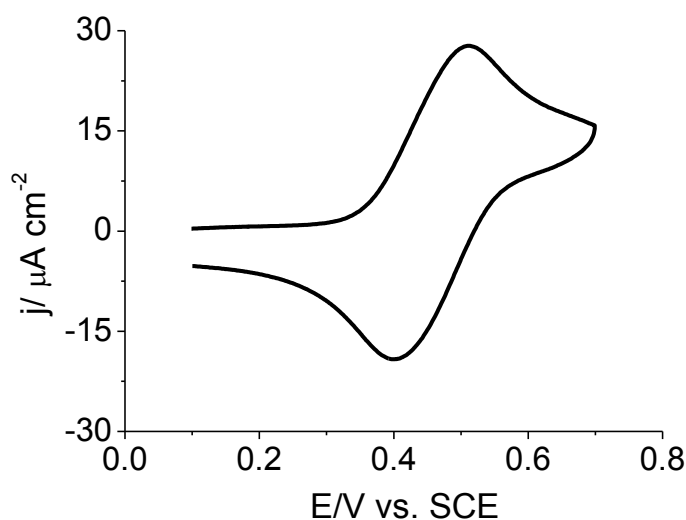


Figura 3.38 – Voltamograma cíclico de 0.5 mM de ABTS numa superfície de Au (111) registado a 20 mV s^{-1} , em tampão citrato-fosfato pH 4.6.

O papel fundamental do CS₂ no processo de imobilização das nanopartículas de óxido de ferro e da Lacase foi comprovado pela resposta eletroquímica mostrada na figura 3.39a. O eletrodo modificado com apenas Fe₃O₄NPs e Lacase não exibiu comportamento catalítico na presença de 10 μM ABTS, indicando que o enzima não se encontra biologicamente ativo. Por outro lado, quando as NPs estão ligadas ao ouro pelo CS₂, na ausência de Lacase, foi possível detectar ambos os processos redox do ABTS, provavelmente devido à presença das NPs de 40 nm, que levou a um aumento da área superficial e uma transferência eletrônica facilitada.

No eletrodo modificado com CS₂ e Lacase (figura 3.39b), observou atividade catalítica da Lacase com o aumento da concentração de ABTS. Apesar dos baixos valores de densidade de corrente baixos detectados nesta superfície, não foram visíveis picos de oxidação. Estes valores aumentaram claramente quando as Fe₃O₄NPs (20 e 40 nm) foram adicionadas à reação de modificação do eletrodo (figura 3.39b e c, respetivamente). A melhor resposta catalítica foi obtida na presença das Fe₃O₄NPs de 40 nm, com uma sensibilidade de 88 mA M⁻¹ cm⁻² que pode ser suportada pelo aumento da transferência eletrônica entre o enzima e o eletrodo, na presença do ABTS, proporcionada pela estrutura eletrônica da magnetite.

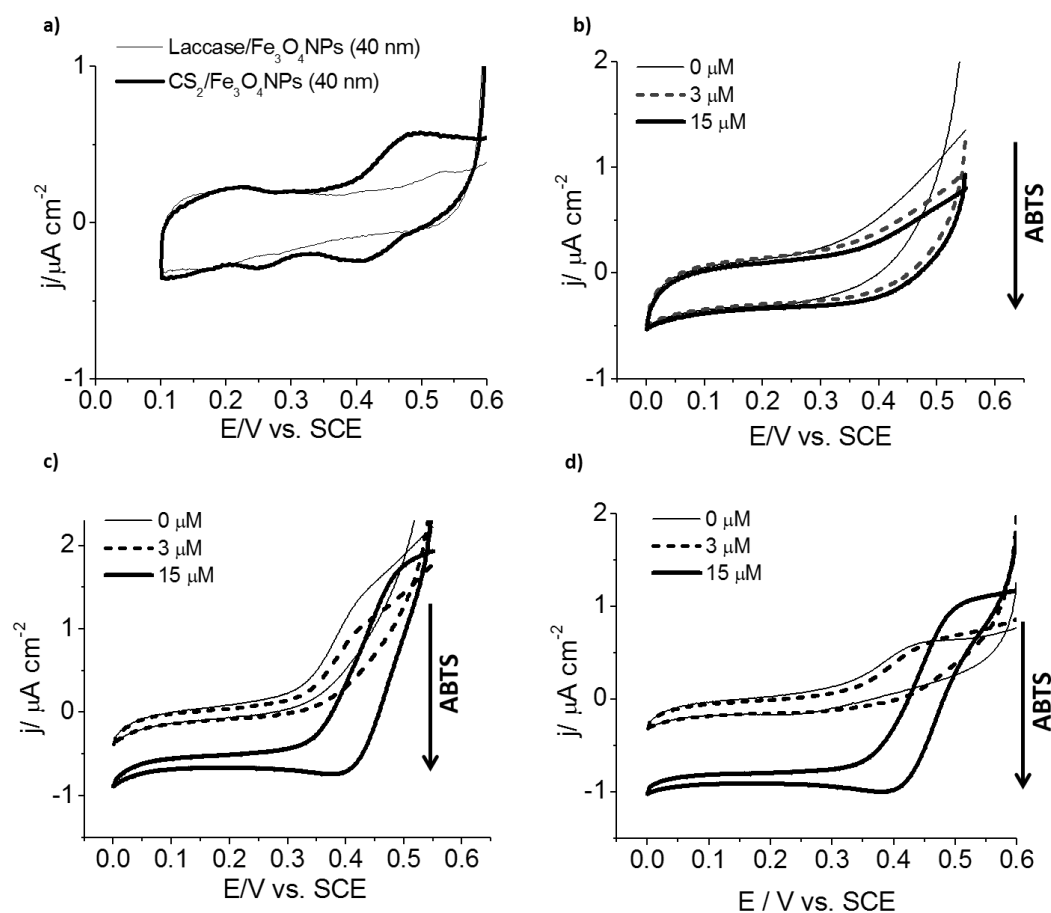


Figura 3.39 – a) Voltamogramas cíclicos das superfícies modificadas com a) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (40 nm)/Lacase e $\text{CS}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (40 nm) na presença de $10 \mu\text{M}$ de ABTS; b) $\text{CS}_2/\text{Lacase}$, c) $\text{CS}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (20 nm)/Lacase e d) $\text{CS}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (40 nm)/Lacase. Na figura 3.39b, c e d, os cronoamperogramas registados a diferentes concentrações de ABTS foram adicionados à solução. Todos os ensaios foram realizados em citrato-fosfato pH 4.6, a 5 mV s^{-1}

Para uma determinação mais precisa dos parâmetros analíticos da reação catalítica do enzima, foram registados diversos cronoamperogramas, a 0.41 V , dos eléctrodos modificados com $\text{CS}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (40 nm)/Lacase (figura 3.40a). Observou-se na figura 3.40b um aumento em valor absoluto da densidade de corrente com ao aumento da concentração de ABTS. A representação da curva de Michaelis-Menten está ilustrada na figura 3.40a, tem sido estimada uma sensibilidade de $100 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. A partir da linearização de Lineweaver-Burk foi determinada a constante de Michaelis-Menten, K_M^{app} , de $62 \mu\text{M}$. Este valor é comparável com os valores

reportados para a Lacase imobilizada com atividade catalítica (entre 15 e 90 μM) [93-95] e aos da Lacase em solução [96] para a detecção do ABTS. Estes resultados refletem a bioafinidade entre o enzima imobilizado e o substrato.

Como é evidente, a partir da figura 3.40c, o enzima imobilizado nas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ de 40 nm exibiu o melhor comportamento catalítico, cerca de 70% superior ao observado para o $\text{Au}/\text{CS}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (20 nm)/Lacase ($28 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) com uma gama linear até a 15 μM .

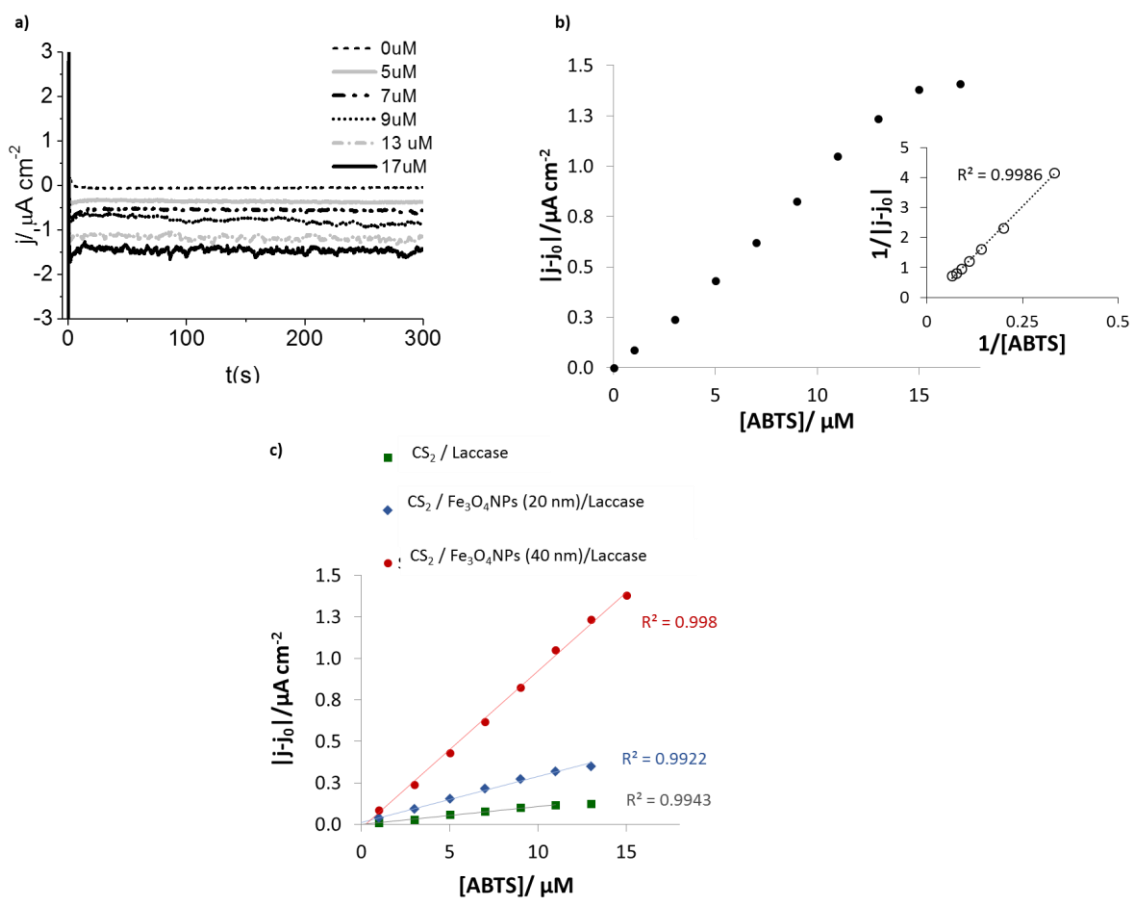


Figura 3.40 – a) Cronoamperogramas dos elétrodos com $\text{CS}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (40 nm)/Lacase obtidos à medida que a concentração de ABTS aumenta; b) Representação da curva de $|j-j_0|$ versus $[\text{ABTS}]$; representação da Lineweaver–Burk ($y = (12.996 \pm 0.2212)_x - (0.210 \pm 0.0376)$); c) representação gráfica de $|j-j_0|$ versus $[\text{ABTS}]$ dos cronoamperogramas obtidos para os elétrodos modificados com $\text{CS}_2/\text{Laccase}$, $\text{CS}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (20 nm) /Lacase e $\text{CS}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (40 nm) /Lacase. Todos os ensaios foi efetuados em solução tampão citrato-fosfato (pH 4.6), a um potencial de 0.41 V.

Os resultados são totalmente consistentes com o melhor desempenho eletrocatalítico verificado para a reação de redução de oxigênio exibido pelas Fe₃O₄NPs de 40 nm, quando comparado com as de 20 nm, reportado recentemente [82].

Os resultados apresentados na figura 3.40c mostram inequivocamente, que o eletrodo modificado na ausência de nanopartículas exibiu uma sensibilidade significativamente inferior (11 mA M⁻¹ cm⁻²), com a saturação da enzima a uma concentração de 11 μM de ABTS.

Outros autores revelaram valores de sensibilidade entre 35 e 75 mA M⁻¹ cm⁻² para superfícies de platina ou grafite modificadas com Lacase [97, 98], também para o ABTS. No entanto, se considerarmos que a Lacase *Trametes versicolor* usada neste trabalho tem 0.92 U/mg, que é um valor bastante inferior ao da Laccase utilizada noutros estudos catalíticos, a sensibilidade de 100 mA M⁻¹ cm⁻² obtida, empregando esta metodologia de imobilização de enzimas, foi bastante elevada.

Com este trabalho foi possível demonstrar uma melhoria considerável no desempenho catalítico dos eletrodos modificados com Lacase na presença de nanopartículas de óxido de ferro, especialmente para as nanopartículas de magnetite de 40 nm (maior grau de pureza). Foi ainda observado que, para uma superfície modificada seguindo o mesmo procedimento de modificação envolvendo o CS₂, Lacase e nanopartículas de ouro, que a presença destas nanoestruturas não favorecem positivamente a atividade catalítica do enzima (figura 3.41), reforçando que as propriedades particulares das Fe₃O₄NPs beneficiam a preservação da bioatividade da Lacase.

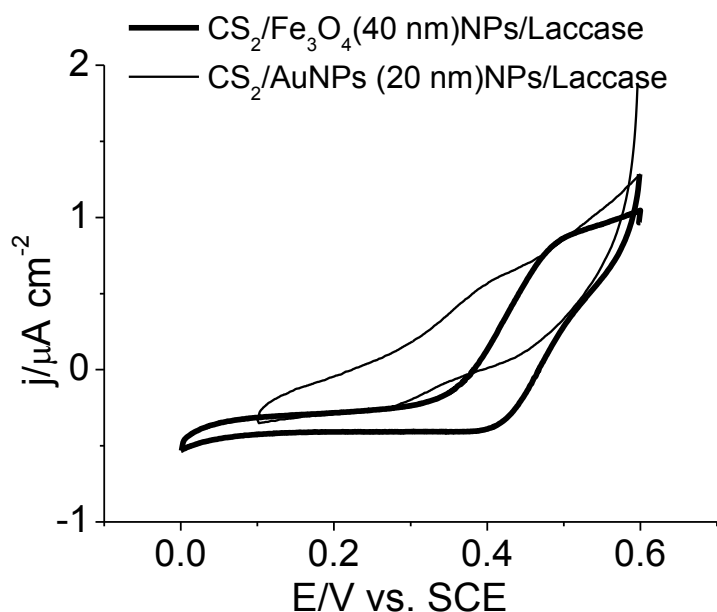


Figura 3.41 - Voltamogramas cíclicos das superfícies modificadas com CS₂/Fe₃O₄NPs (40 nm)/Lacase e CS₂/AuNPs (20 nm)/Lacase, na presença de 10 μM de ABTS na solução de citrato-fosfato (pH 4.6), registados a 5 mV s⁻¹.

Com o objetivo de estimar a cobertura superficial da Lacase imobilizada no eléctrodo de ouro, a resposta eletroquímica do eléctrodo modificado com CS₂/Fe₃O₄NPs (40 nm)/Lacase em solução desarejada de citrato-fosfato a pH 4.6 (figura 3.42). Os voltamogramas cíclicos foram registados a diferentes velocidades, de 5 a 200 mV s⁻¹. A velocidades de varrimento mais elevadas (100 mV s⁻¹), foi possível observar dois picos redox com $E_{1/2} = 0.26$ V e $\Delta E_p = 0.06$ V. Estes valores estão em concordância com os reportados para a transferência eletrónica direta de um dos centros ativos de Cu (Cu^{II} / Cu^I) da Lacase (*Trametes versicolor*) a valores de pH semelhantes [99]. Foi ainda possível detetar outro processo redox ($E_{1/2}$ de ~ 0.50 $\Delta E_p = 0.04$ V), que deverá estar associado à presença de Fe₃O₄NPs (figura 3.43).

A Lacase *Trametes versicolor* é classificada como um enzima de potencial alto, em que um dos Cu (T1) é reduzido e oxidado a $E_{1/2}$ de ~ 0.54 V (0.78 V vs. NHE) [100]. No entanto, foi reportado que a transferência eletrónica heterogénea de uma Lacase de potencial alto (*T. hirsuta*) e a superfície do ouro ocorre a um potencial próximo de

0.16 V (0.4 vs. NHE). Este processo redox foi atribuído a outro átomo de Cu (T2), o qual foi comparado a valores obtido para Lacase de potencial alto e baixo que deverá corresponder a um mecanismo redox complexo envolvendo os centros trinucleares de Cu (T2-T3) [100]. Deste modo, os processos redox detetados nos voltamogramas cíclicos da figura 3.42 deverão corresponder a um processo redox semelhante.

A dependência linear entre j^{ox} e j^{red} versus de varrimento exibida na figura 3.42 indicou que, primeiro, a transferência eletrônica é um processo de superfície controlado por transferência de carga e, segundo, a estabilidade dos nanoconjugados de Fe_3O_4 /Lacase na superfície do elétrodo.

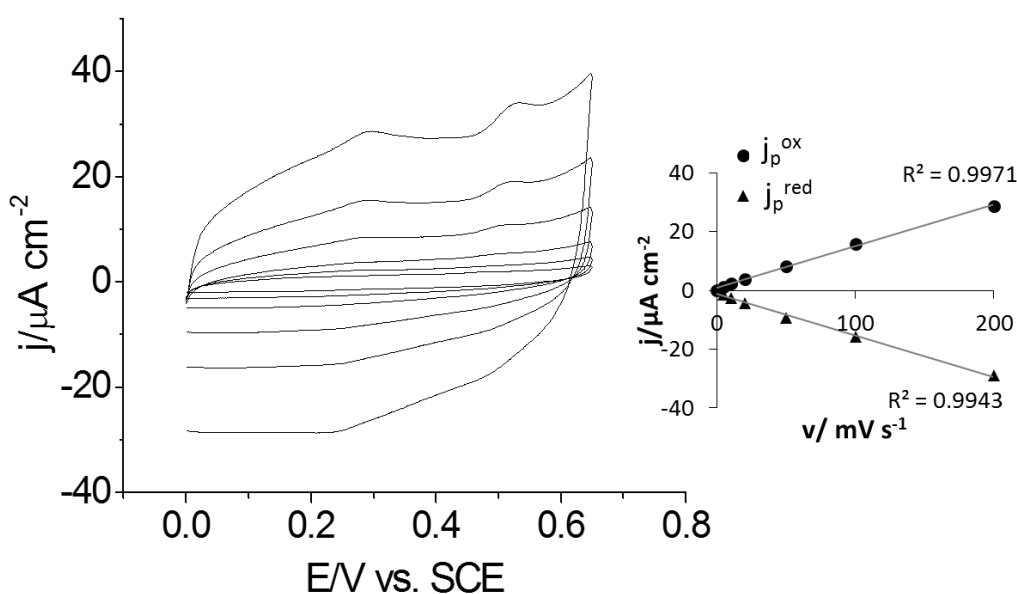


Figura 3.42 – Voltamogramas cíclicos do elétrodo modificado com CS_2/Fe_3O_4NPs (40 nm)/Laccase em solução tampão citrato-fosfato (pH 4.6) medidos a diferentes velocidades de varrimento, 5 – 200 $mV s^{-1}$.

A concentração superficial de Lacase no elétrodo modificado por CS_2 e Fe_3O_4NPs (40 nm) foi estimada com base na integração dos processos de oxidação (figura 3.42 da Lacase, considerando que houve apenas a transferência de um eletrão no centro de Cu T2. Foi estimado um valor de $2 \times 10^{-11} mol cm^{-2}$, valor este significativamente superior ao teoricamente determinado para uma monocamada de

enzima (4.3×10^{-12} mol cm⁻²) [99] e ao reportado para a Lacase imobilizada numa superfície de ouro modificada com uma SAM de um derivado de um alcanotiol [5] mas consistente com o obtido para a Lacase imobilizada em nanoporos de ouro depositados num eléctrodo de carbono vítreo [99]. Estes resultados demonstram a eficácia da metodologia usada para preparar eléctrodos de ouro com Lacase e nanopartículas de magnetite com atividade catalítica para o ABTS.

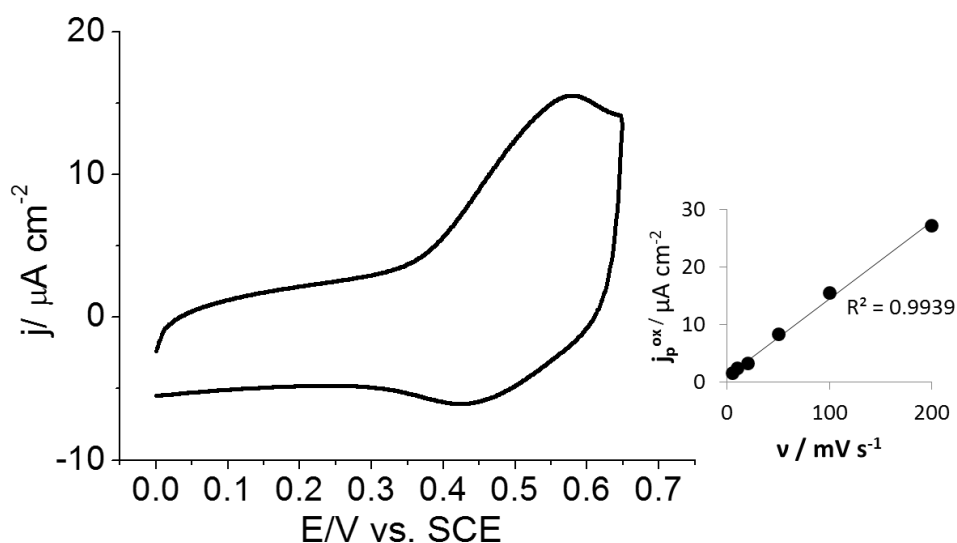


Figura 3.43 – Voltamogramas cíclicos das superfícies de ouro modificada com CS₂/Fe₃O₄NPs (40 nm), preparadas em soluções aquosas de tampão citrato-fosfato (pH 4.6), obtidas a 100 mV s⁻¹; representação de j_p^{ox} versus v .

Estes resultados provaram a biocompatibilidade das Fe₃O₄NPs para a adsorção de enzimas, especialmente as nanopartículas de maiores dimensões, pois estas possuem uma superfície menos oxidada, como demonstrado pelo difratograma de raios-X exibido na figura 3.30, facilitando a ligação do CS₂/Lacase.

3.3 Referências bibliográficas

- [1] J.J. Gooding, R. Wibowo, J.Q. Liu, W.R. Yang, D. Losic, S. Orbons, F.J. Mearns, J.G. Shapter, D.B. Hibbert, Protein electrochemistry using aligned carbon nanotube arrays, *Journal of the American Chemical Society*, 125 (2003) 9006-9007.
- [2] A.J. Cunningham, *Introduction to Bioanalytical Sensors*, John Wiley & Sons Inc.
- [3] Q. Sheng, K. Luo, L. Li, J. Zheng, Direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on NdPO₄ nanoparticles/chitosan composite film on glassy carbon electrodes and its biosensing application, *Bioelectrochemistry*, 74 (2009) 246-253.
- [4] I.R. M. Fujihira, J.F. Rusling, *Modified Electrodes - Encyclopedia of Electrochemistry*, A.J. Bard, M. Stratmann (Eds.) ed., Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA 2007.
- [5] J.F. Cabrita, L.M. Abrantes, A.S. Viana, N-hydroxysuccinimide-terminated self-assembled monolayers on gold for biomolecules immobilisation, *Electrochimica Acta*, 50 (2005) 2117-2124.
- [6] C.M. Silveira, S.P. Gomes, A.N. Araujo, M.C.B.S.M. Montenegro, S. Todorovic, A.S. Viana, R.J.C. Silva, J.J.G. Moura, M.G. Almeida, An efficient non-mediated amperometric biosensor for nitrite determination, *Biosensors & Bioelectronics*, 25 (2010) 2026-2032.
- [7] C. Shan, H. Yang, D. Han, Q. Zhang, A. Ivaska, L. Niu, Graphene/AuNPs/chitosan nanocomposites film for glucose biosensing, *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (2010) 1070-1074.
- [8] M. Gerard, A. Chaubey, B.D. Malhotra, Application of conducting polymers to biosensors, *Biosensors & Bioelectronics*, 17 (2002) 345-359.
- [9] M. Zayats, B. Willner, I. Willner, Design of amperometric biosensors and biofuel cells by the reconstitution of electrically contacted enzyme electrodes, *Electroanalysis*, 20 (2008) 583-601.
- [10] R. Gao, J. Zheng, Amine-terminated ionic liquid functionalized carbon nanotube-gold nanoparticles for investigating the direct electron transfer of glucose oxidase, *Electrochemistry Communications*, 11 (2009) 608-611.
- [11] A.-L. Morel, R.-M. Volmant, C. Méthivier, J.-M. Krafft, S. Boujday, C.-M. Pradier, Optimized immobilization of gold nanoparticles on planar surfaces through alkyldithiols and their use to build 3D biosensors, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81 (2010) 304-312.
- [12] U. Saxena, M. Chakraborty, P. Goswami, Covalent immobilization of cholesterol oxidase on self-assembled gold nanoparticles for highly sensitive amperometric detection of cholesterol in real samples, *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2011) 3037-3043.
- [13] Y. Zhao, W. Perez-Segarra, Q.C. Shi, A. Wei, Dithiocarbamate assembly on gold, *Journal of the American Chemical Society*, 127 (2005) 7328-7329.
- [14] A.L. Eckermann, J.A. Shaw, T.J. Meade, Kinetic Dispersion in Redox-Active Dithiocarbamate Monolayers, *Langmuir*, 26 (2010) 2904-2913.
- [15] H. Zhu, D.M. Coleman, C.J. Dehen, I.M. Geisler, D. Zemlyanov, J. Chmielewski, G.J. Simpson, A. Wei, Assembly of dithiocarbamate-anchored monolayers on gold surfaces in aqueous solutions, *Langmuir*, 24 (2008) 8660-8666.
- [16] R. Cao, Jr., A. Diaz, R. Cao, A. Otero, R. Cea, M.C. Rodriguez-Arguelles, C. Serra, Building layer-by-layer a Bis(dithiocarbamato)copper(II) complex on Au{111} surfaces, *Journal of the American Chemical Society*, 129 (2007) 6927-6930.
- [17] I. Almeida, A.C. Cascalheira, A.S. Viana, One step gold (bio)functionalisation based on CS₂-amine reaction, *Electrochimica Acta*, 55 (2010) 8686-8695.
- [18] I. Almeida, V.C. Ferreira, M.F. Montemor, L.M. Abrantes, A.S. Viana, One-pot approach to modify nanostructured gold surfaces through *in situ* dithiocarbamate linkages, *Electrochimica Acta*, 83 (2012) 311-320.
- [19] Y. Niu, A.I. Matos, L.M. Abrantes, A.S. Viana, G. Jin, Antibody Oriented Immobilization on Gold using the Reaction between Carbon Disulfide and Amine Groups and Its Application in Immunosensing, *Langmuir*, 28 (2012) 17718-17725.

- [20] B.-W. Park, D.-S. Kim, D.-Y. Yoon, Surface modification of gold electrode with gold nanoparticles and mixed self-assembled monolayers for enzyme biosensors, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28 (2011) 64-70.
- [21] P. Morf, F. Raimondi, H.G. Nothofer, B. Schnyder, A. Yasuda, J.M. Wessels, T.A. Jung, Dithiocarbamates: Functional and versatile linkers for the formation of self-assembled monolayers, *Langmuir*, 22 (2006) 658-663.
- [22] R.D. Weinstein, J. Richards, S.D. Thai, D.M. Omiatek, C.A. Bessel, C.J. Faulkner, S. Othman, G.K. Jennings, Characterization of self-assembled monolayers from lithium dialkyldithiocarbamate salts, *Langmuir*, 23 (2007) 2887-2891.
- [23] S.-M. Chen, J.-Y. Chen, V.S. Vasantha, Electrochemical preparation of epinephrine/Nafion chemically modified electrodes and their electrocatalytic oxidation of ascorbic acid and dopamine, *Electrochimica Acta*, 52 (2006) 455-465.
- [24] H.M. Zhang, X.L. Zhou, R.T. Hui, N.Q. Li, D.P. Liu, Studies of the electrochemical behavior of epinephrine at a homocysteine self-assembled electrode, *Talanta*, 56 (2002) 1081-1088.
- [25] L. Wang, J.Y. Bai, P.F. Huang, H.J. Wang, L.Y. Zhang, Y.Q. Zhao, Self-assembly of gold nanoparticles for the voltammetric sensing of epinephrine, *Electrochemistry Communications*, 8 (2006) 1035-1040.
- [26] K.-J. Huang, C.-X. Xu, W.-Z. Xie, W. Wang, Electrochemical behavior and voltammetric determination of tryptophan based on 4-aminobenzoic acid polymer film modified glassy carbon electrode, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74 (2009) 167-171.
- [27] B. Fang, Y. Wei, M. Li, G. Wang, W. Zhang, Study on electrochemical behavior of tryptophan at a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes embedded cerium hexacyanoferrate, *Talanta*, 72 (2007) 1302-1306.
- [28] G.-P. Jin, X.-Q. Lin, The electrochemical behavior and amperometric determination of tyrosine and tryptophan at a glassy carbon electrode modified with butyrylcholine, *Electrochemistry Communications*, 6 (2004) 454-460.
- [29] N.T. Nguyen, M.Z. Wrona, G. Dryhurst, Electrochemical oxidation of tryptophan, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 199 (1986) 101-126.
- [30] C.G. Nan, Z.Z. Feng, W.X. Li, D.J. Ping, C.H. Qin, Electrochemical behavior of tryptophan and its derivatives at a glassy carbon electrode modified with hemin, *Analytica Chimica Acta*, 452 (2002) 245-254.
- [31] G.P. Jin, X.Q. Lin, The electrochemical behavior and amperometric determination of tyrosine and tryptophan at a glassy carbon electrode modified with butyrylcholine, *Electrochemistry Communications*, 6 (2004) 454-460.
- [32] V.C. Ferreira, A.F. Silva, L.M. Abrantes, Electrochemical and Morphological Characterization of New Architectures Containing Self-Assembled Mono layers and Au-NPs, *Journal of Physical Chemistry C*, 114 (2010) 7710-7716.
- [33] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, G.M. Whitesides, Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology, *Chemical Reviews*, 105 (2005) 1103-1169.
- [34] A. Ulman, Formation and structure of self-assembled monolayers, *Chemical Reviews*, 96 (1996) 1533-1554.
- [35] J.F. Cabrita, A.S. Viana, C. Eberle, F.-P. Montforts, A. Mourato, L.M. Abrantes, Electrooxidation of pyrrole-terminated self-assembled lipoic acid derivatives, *Surface Science*, 603 (2009) 2458-2462.
- [36] C.K. Rhee, Y.N. Kim, Structural evolution of self-assembled monolayer of 1-mercapto-2-propanol on Au(111) in N₂ flow: an electrochemical and STM study, *Applied Surface Science*, 228 (2004) 313-319.
- [37] R. Meunier-Prest, G. Legay, S. Raveau, N. Chiffot, E. Finot, Potential-assisted deposition of mixed alkanethiol self-assembled monolayers, *Electrochimica Acta*, 55 (2010) 2712-2720.

- [38] O. Cavalleri, G. Gonella, S. Terreni, M. Vignolo, P. Pelori, L. Floreano, A. Morgante, M. Canepa, R. Rolandi, High resolution XPS of the S 2p core level region of the L-cysteine/gold interface, *Journal of Physics-Condensed Matter*, 16 (2004) S2477-S2482.
- [39] M.C. Bourg, A. Badia, R.B. Lennox, Gold-sulfur bonding in 2D and 3D self-assembled monolayers: XPS characterization, *Journal of Physical Chemistry B*, 104 (2000) 6562-6567.
- [40] F.v. Wrochem, F. Scholz, A. Schreiber, H.-G. Nothofer, W.E. Ford, P. Morf, T. Jung, A. Yasuda, J.M. Wessels, Structure and Conductance of Aromatic and Aliphatic Dithioacetamide Monolayers on Au(111), *Langmuir*, 24 (2008) 6910-6917.
- [41] S. Ramsaywack, S. Martic, S. Milton, L. Gates, A.S. Grant, M. Labib, A. Decken, H.-B. Kraatz, Synthesis and Surface Investigations of N-Substituted 2,5-Dithio-7-azabicyclo 2.2.1 heptanes on Gold Surfaces, *Journal of Physical Chemistry C*, 116 (2012) 7886-7896.
- [42] N. Graf, E. Yegen, T. Gross, A. Lippitz, W. Weigel, S. Krakert, A. Terfort, W.E.S. Unger, XPS and NEXAFS studies of aliphatic and aromatic amine species on functionalized surfaces, *Surface Science*, 603 (2009) 2849-2860.
- [43] S.S. Wong, A.T. Woolley, T.W. Odom, J.L. Huang, P. Kim, D.V. Vezenov, C.M. Lieber, Single-walled carbon nanotube probes for high-resolution nanostructure imaging, *Applied Physics Letters*, 73 (1998) 3465-3467.
- [44] W. Haiss, N.T.K. Thanh, J. Aveyard, D.G. Fernig, Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra, *Analytical Chemistry*, 79 (2007) 4215-4221.
- [45] W. Lu, Y. Luo, G. Chang, X. Sun, Synthesis of functional SiO₂-coated graphene oxide nanosheets decorated with Ag nanoparticles for H₂O₂ and glucose detection, *Biosensors & Bioelectronics*, 26 (2011) 4791-4797.
- [46] A.S. Rad, A. Mirabi, E. Binaian, H. Tayebi, A Review on Glucose and Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Modified Electrode Included Silver Nanoparticles, *International Journal of Electrochemical Science*, 6 (2011) 3671-3683.
- [47] A. Attar, M.E. Ghica, A. Amine, C.M.A. Brett, Poly(neutral red) based hydrogen peroxide biosensor for chromium determination by inhibition measurements, *Journal of Hazardous Materials*, 279 (2014) 348-355.
- [48] S.X. Zhang, N. Wang, Y.M. Niu, C.Q. Sun, Immobilization of glucose oxidase on gold nanoparticles modified Au electrode for the construction of biosensor, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 109 (2005) 367-374.
- [49] S. Zhao, K. Zhang, Y. Bai, W. Yang, C. Sun, Glucose oxidase/colloidal gold nanoparticles immobilized in Nafion film on glassy carbon electrode: Direct electron transfer and electrocatalysis, *Bioelectrochemistry*, 69 (2006) 158-163.
- [50] S.X. Zhang, N. Wang, H.J. Yu, Y.M. Niu, C.Q. Sun, Covalent attachment of glucose oxidase to an Au electrode modified with gold nanoparticles for use as glucose biosensor, *Bioelectrochemistry*, 67 (2005) 15-22.
- [51] A.S. Sabine Borgmann, Sebastian Neugebauer, Wolfgang Schuhmann, *Advances in Electrochemical Science and Engineering*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA ed.2011.
- [52] A. Chaubey, B.D. Malhotra, Mediated biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 17 (2002) 441-456.
- [53] S.B. Bankar, M.V. Bule, R.S. Singhal, L. Ananthanarayan, Glucose oxidase — An overview, *Biotechnology Advances*, 27 (2009) 489-501.
- [54] B. Wang, B. Li, Q. Deng, S. Dong, Amperometric Glucose Biosensor Based on Sol-Gel Organic-Inorganic Hybrid Material, *Analytical Chemistry*, 70 (1998) 3170-3174.
- [55] D.W.M. Arrigan, P.N. Bartlett, A scanning force microscopy study of poly(phenol) films containing immobilized glucose oxidase, *Biosensors and Bioelectronics*, 13 (1998) 293-304.
- [56] K.I. Ozoemena, T. Nyokong, Novel amperometric glucose biosensor based on an ether-linked cobalt(II) phthalocyanine-cobalt(II) tetraphenylporphyrin pentamer as a redox mediator, *Electrochimica Acta*, 51 (2006) 5131-5136.

- [57] L. Zhang, C. Zhou, J. Luo, Y. Long, C. Wang, T. Yu, D. Xiao, A polyaniline microtube platform for direct electron transfer of glucose oxidase and biosensing applications, *Journal of Materials Chemistry B*, 3 (2015) 1116-1124.
- [58] B.-Y. Wu, S.-H. Hou, F. Yin, J. Li, Z.-X. Zhao, J.-D. Huang, Q. Chen, Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer assembly of multilayer films composed of chitosan, gold nanoparticles and glucose oxidase modified Pt electrode, *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2007) 838-844.
- [59] D. Wang, L. Chen, Facile direct electron transfer in glucose oxidase modified electrodes, *Electrochimica Acta*, 54 (2009) 4316-4320.
- [60] C. Schulz, R. Kittl, R. Ludwig, L. Gorton, Direct Electron Transfer from the FAD Cofactor of Cellobiose Dehydrogenase to Electrodes, *Acs Catalysis*, 6 (2016) 555-563.
- [61] A. Cipri, C. Schulz, R. Ludwig, L. Gorton, M. del Valle, A novel bio-electronic tongue using different cellobiose dehydrogenases to resolve mixtures of various sugars and interfering analytes, *Biosensors & Bioelectronics*, 79 (2016) 515-521.
- [62] S. Demin, E.A.H. Hall, Breaking the barrier to fast electron transfer, *Bioelectrochemistry*, 76 (2009) 19-27.
- [63] C.X. Guo, Z.M. Sheng, Y.Q. Shen, Z.L. Dong, C.M. Li, Thin-Walled Graphitic Nanocages As a Unique Platform for Amperometric Glucose Biosensor, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2 (2010) 2481-2484.
- [64] T. Shimomura, T. Itoh, T. Sumiya, T.-a. Hanaoka, F. Mizukami, M. Ono, Amperometric detection of phenolic compounds with enzyme immobilized in mesoporous silica prepared by electrophoretic deposition, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 153 (2011) 361-368.
- [65] C.-J. Cai, M.-W. Xu, S.-J. Bao, C. Lei, D.-Z. Jia, A facile route for constructing a graphene-chitosan-ZrO₂ composite for direct electron transfer and glucose sensing, *RSC Advances*, 2 (2012) 8172-8178.
- [66] L. Yang, X. Ren, F. Tang, L. Zhang, A practical glucose biosensor based on Fe₃O₄ nanoparticles and chitosan/nafion composite film, *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (2009) 889-895.
- [67] E. Katz, I. Willner, J. Wang, Electroanalytical and Bioelectroanalytical Systems Based on Metal and Semiconductor Nanoparticles, *Electroanalysis*, 16 (2004) 19-44.
- [68] L.M. Rossi, A.D. Quach, Z. Rosenzweig, Glucose oxidase-magnetite nanoparticle bioconjugate for glucose sensing, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380 (2004) 606-613.
- [69] X. Huang, X. Meng, F. Tang, L. Li, D. Chen, H. Liu, Y. Zhang, J. Ren, Mesoporous magnetic hollow nanoparticles - protein carriers for lysosome escaping and cytosolic delivery, *Nanotechnology*, 19 (2008).
- [70] J. Hu, B. Yuan, Y. Zhang, M. Guo, Immobilization of laccase on magnetic silica nanoparticles and its application in the oxidation of guaiacol, a phenolic lignin model compound, *RSC Advances*, 5 (2015) 99439-99447.
- [71] Y. Li, C. Qin, C. Chen, Y. Fu, M. Ma, Q. Xie, Highly sensitive phenolic biosensor based on magnetic polydopamine-laccase-Fe₃O₄ bionanocomposite, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 168 (2012) 46-53.
- [72] M. Martin, P. Salazar, R. Villalonga, S. Campuzano, J.M. Pingarron, J.L. Gonzalez-Mora, Preparation of core-shell Fe₃O₄@poly(dopamine) magnetic nanoparticles for biosensor construction, *Journal of Materials Chemistry B*, 2 (2014) 739-746.
- [73] R.M.C.U. Schwertmann, *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*, Wiley-VCH ed.2003.
- [74] S.-L. Tie, Y.-Q. Lin, H.-C. Lee, Y.-S. Bae, C.-H. Lee, Amino acid-coated nano-sized magnetite particles prepared by two-step transformation, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 273 (2006) 75-83.

- [75] R.Y. Hong, T.T. Pan, H.Z. Li, Microwave synthesis of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles used as a precursor of nanocomposites and ferrofluids, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 303 (2006) 60-68.
- [76] A. Goodarzi, Y. Sahoo, M.T. Swihart, P.N. Prasad, Aqueous ferrofluid of citric acid coated magnetite particles, in: P. Guyot-Sionnest, H. Mattoussi, Z.L. Wang (Eds.) *Quantum Dots, Nanoparticles and Nanowires 2004*, pp. 129-134.
- [77] D.K. Kim, M. Mikhaylova, Y. Zhang, M. Muhammed, Protective coating of superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *Chemistry of Materials*, 15 (2003) 1617-1627.
- [78] C. Tudisco, F. Bertani, M.T. Cambria, F. Sinatra, E. Fantechi, C. Innocenti, C. Sangregorio, E. Dalcanale, G.G. Condorelli, Functionalization of PEGylated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles with tetraphosphonate cavitanol for biomedical application, *Nanoscale*, 5 (2013) 11438-11446.
- [79] J.A. Rodriguez, J. Hrbek, Interaction of Sulfur with Well-Defined Metal and Oxide Surfaces: Unraveling the Mysteries behind Catalyst Poisoning and Desulfurization, *Accounts of Chemical Research*, 32 (1999) 719-728.
- [80] M. Iwamoto, T. Abe, Y. Tachibana, Control of bandgap of iron oxide through its encapsulation into SiO₂-based mesoporous materials, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 155 (2000) 143-153.
- [81] H. Cohen, A. Gedanken, Z. Zhong, One-Step Synthesis and Characterization of Ultrastable and Amorphous Fe₃O₄ Colloids Capped with Cysteine Molecules, *The Journal of Physical Chemistry C*, 112 (2008) 15429-15438.
- [82] I. Almeida, S.G. Mendo, M.D. Carvalho, J.P. Correia, A.S. Viana, Catalytic Co and Fe porphyrin/Fe₃O₄ nanoparticles assembled on gold by carbon disulfide, *Electrochimica Acta*, 188 (2016) 1-12.
- [83] K. Piontek, M. Antorini, T. Choinowski, Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers, *Journal of Biological Chemistry*, 277 (2002) 37663-37669.
- [84] R. Rawal, S. Chawla, Devender, C.S. Pundir, An amperometric biosensor based on laccase immobilized onto Fe₃O₄NPs/cMWCNT/PANI/Au electrode for determination of phenolic content in tea leaves extract, *Enzyme and Microbial Technology*, 51 (2012) 179-185.
- [85] D. Cao, N. Hu, Direct electron transfer between hemoglobin and pyrolytic graphite electrodes enhanced by Fe₃O₄ nanoparticles in their layer-by-layer self-assembly films, *Biophysical Chemistry*, 121 (2006) 209-217.
- [86] Y. Zhang, G.-M. Zeng, L. Tang, D.-L. Huang, X.-Y. Jiang, Y.-N. Chen, A hydroquinone biosensor using modified core-shell magnetic nanoparticles supported on carbon paste electrode, *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2007) 2121-2126.
- [87] X. Shi, W. Gu, B. Li, N. Chen, K. Zhao, Y. Xian, Enzymatic biosensors based on the use of metal oxide nanoparticles, *Microchimica Acta*, 181 (2013) 1-22.
- [88] L. Tang, G. Zeng, J. Liu, X. Xu, Y. Zhang, G. Shen, Y. Li, C. Liu, Catechol determination in compost bioremediation using a laccase sensor and artificial neural networks, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391 (2008) 679-685.
- [89] M.D. Carvalho, F. Henriques, L.P. Ferreira, M. Godinho, M.M. Cruz, Iron oxide nanoparticles: the Influence of synthesis method and size on composition and magnetic properties, *Journal of Solid State Chemistry*, 201 (2013) 144-152.
- [90] P. Encinas, L. Lorenzo, M.L. Tascon, M.D. Vazquez, P. Sanchezbatanero, ELECTROCHEMICAL STUDY OF IRON(II) AND IRON(III) COMPOUND MIXTURES IN THE SOLID-STATE - APPLICATION TO MAGNETITE CHARACTERIZATION, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 371 (1994) 161-166.
- [91] K. Saal, V. Sammelselg, A. Löhmus, E. Kuusk, G. Raidaru, T. Rinke, A. Rinke, Characterization of glucose oxidase immobilization onto mica carrier by atomic force microscopy and kinetic studies, *Biomolecular Engineering*, 19 (2002) 195-199.

- [92] I. Zawisza, J. Rogalski, M. Opallo, Electrocatalytic reduction of dioxygen by redox mediator and laccase immobilized in silicate thin film, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 588 (2006) 244-252.
- [93] G. Bayramoglu, M. Yilmaz, M.Y. Arica, Preparation and characterization of epoxy-functionalized magnetic chitosan beads: laccase immobilized for degradation of reactive dyes, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33 (2010) 439-448.
- [94] D. Rochefort, L. Kouisni, K. Gendron, Physical immobilization of laccase on an electrode by means of poly(ethyleneimine) microcapsules, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 617 (2008) 53-63.
- [95] O. Yamak, N.A. Kalkan, S. Aksoy, H. Altinok, N. Hasirci, Semi-interpenetrating polymer networks (semi-IPNs) for entrapment of laccase and their use in Acid Orange 52 decolorization, *Process Biochemistry*, 44 (2009) 440-445.
- [96] F. Xu, W. Shin, S.H. Brown, J.A. Wahleithner, U.M. Sundaram, E.I. Solomon, A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1292 (1996) 303-311.
- [97] D. Quan, Y. Kim, W. Shin, Characterization of an amperometric laccase electrode covalently immobilized on platinum surface, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 561 (2004) 181-189.
- [98] A. Jarosz-Wilkolazka, T. Ruzgas, L. Gorton, Amperometric detection of mono- and diphenols at *Cerrena unicolor* laccase-modified graphite electrode: correlation between sensitivity and substrate structure, *Talanta*, 66 (2005) 1219-1224.
- [99] H. Qiu, C. Xu, X. Huang, Y. Ding, Y. Qu, P. Gao, Adsorption of laccase on the surface of nanoporous gold and the direct electron transfer between them, *Journal of Physical Chemistry C*, 112 (2008) 14781-14785.
- [100] S. Shleev, A. Christenson, V. Serezhenkov, D. Burbaev, A. Yaropolov, L. Gorton, T. Ruzgas, Electrochemical redox transformations of T1 and T2 copper sites in native *Trametes hirsuta* laccase at gold electrode, *Biochemical Journal*, 385 (2005) 745-754.

Capítulo 4

Eléttodos modificados com nanopartículas magnéticas e compostos organometálicos – Estudo da reação de redução do oxigénio

Parte do trabalho apresentado neste capítulo é objeto do seguinte artigo:

- I. Almeida, S.G. Mendo, M.D. Carvalho, J.P. Correia, A.S. Viana, “Catalytic Co and Fe porphyrin/Fe₃O₄ nanoparticles assembled on gold by carbon disulfide”, *Electrochimica Acta* 188 (2016) 1–12

As metaloporfirinas são facilmente encontradas numa grande diversidade de sistemas biológicos, tais como os centros ativos de algumas proteínas [1] e são uma das classes de moléculas organometálicas mais atrativas direcionadas para a catálise de oxigénio, devido às suas propriedades eletrocatalíticas e à sua estabilidade [2-5]. O tamanho do macrociclo é perfeito para ser coordenado a um número elevado de iões metálicos [1] e a possibilidade de alterar esses centros metálicos, bem como os grupos substituintes do macrociclo, permite ter uma grande variedade deste tipo de compostos com características catalíticas distintas.

A reação de redução de oxigénio (*oxygen reduction reaction*, ORR) tem particular importância em diversos dispositivos tecnológicos, tais como em células de combustível. A eficiência energética neste tipo de sistemas é gerida pelo número de eletrões transferidos na ORR. Neste contexto, as metaloporfirinas de Fe e Co têm sido extensivamente exploradas, dado que a porfirina de Fe catalisa a redução do O₂, através da transferência de 4 eletrões, a água, enquanto que a porfirina de Co promove a ORR, via 2 eletrões, a H₂O₂ [6].

Uma das estratégias mais comuns utilizadas para a ligação covalente de metaloporfirinas em superfícies de eléctrodo é a formação de monocamadas auto-montadas (SAMs) *via* derivatização de porfirinas com grupos âncora específicos, tais como, moléculas com grupos enxofre [7-10], bem como ácidos fosfónicos [11], estendendo a imobilização de porfirinas a superfícies de óxidos metálicos [12]. Outras metodologias envolvem a preparação de SAMs contendo adsorbatos com grupos terminais imidazolo, os quais se ligam covalentemente a diversas metaloporfirinas [13], ou a ligação covalente de metaloporfirinas a eléctrodos de ouro modificados com dimercaptoalcanos [14].

As propriedades físico-químicas de nanomateriais (razão área/volume superficial, propriedades condutoras, biocompatibilidade, etc), tais como as nanopartículas (NPs) metálicas (Au, Pt, Pd) [15-18] e de óxidos metálicos (M_xFe_{3-x}O₄; M= Fe, Cu, Co, Mn) [19] ou nanotubos de carbono [20] têm um papel fundamental na ORR. Os eléctrodos de ouro modificados com nanopartículas de Au revelam melhor desempenho catalítico para a ORR, em contraste com o observado em superfícies planas de Au com orientação preferencial (111), através da formação de H₂O₂ envolvendo a

transferência de 2 elétrões a baixos sobrepotenciais, desde que o tamanho de partícula esteja na gama nanométrica [21].

Quando as propriedades das metaloporfirinas são conjugadas com as dos nanomateriais [2, 22], surgem grandes benefícios em termos catalíticos. Geralmente, ocorre um aumento da quantidade dos centros catalíticos na superfície do eléttodo bem como um melhoramento no processo de transferência eletrónica, sendo ambos os fatores importantes na eletrocatalise [2, 23].

Dentro dos nanomateriais de óxidos metálicos, as nanoprtículas de Fe_3O_4 têm sido muito exploradas devido às suas propriedades magnéticas, catalíticas e elétricas excepcionais, geradas pelo confinamento dos elétrões na sua estrutura cristalina, elevadas razões superfície/volume, possibilidade de funcionalização da uma superfície modificada, eficiência catalítica e forte capacidade de adsorção [24]. No entanto, estas nanoprtículas oxidam-se facilmente ao ar e dissolvem-se em meios ácidos. Deste modo, têm sido desenvolvidos diversos métodos para criar revestimentos (moléculas orgânicas pequenas, surfactantes, polímeros, biomoléculas, sílica ou compostos metálicos) [25] adequados para assegurar a estabilidade das nanoprtículas de Fe_3O_4 , especialmente em meio ácido. Outra vantagem da criação de revestimentos em nanoprtículas de magnetite, por exemplo, uma “coroa” de ouro, é a de facilitar a funcionalização das mesmas, através de ligações fortes entre os derivados de enxofre e o Au [26, 27].

O objetivo do trabalho apresentado envolveu o estudo da capacidade do CS_2 para ligar nanoprtículas de Fe_3O_4 , de ca. 20 e 40 nm de diâmetro médio, funcionalizadas com metaloporfirinas (Fe e Co) à superfície de Au (111), preservando e/ou melhorando as propriedades eletrocatalíticas das metaloporfirinas. Estas metaloporfirinas possuem dois grupos de ácidos carboxílicos disponíveis para se ligarem fortemente a superfícies de óxidos metálicos [28] e também a superfícies de ouro [29].

De acordo com o proposto no esquema 4.1, a imobilização de nanoprtículas via CS_2 ocorrerá através da ligação do enxofre à nanoprtícula, enquanto o outro enxofre serve de ponte para ligar a nanoprtícula ao eléttodo de ouro plano. De modo a validar este método de imobilização para as nanoprtículas de magnetite, foram também preparados eléttodos modificados com AuNPs de diversos tamanhos (5, 20, e

40 nm) e metaloporfirinas, comparando a sua atividade catalítica. O que distingue a metodologia de modificação aqui descrita é o fato de ser simples, versátil e, num só passo, criar agregados tridimensionais catalíticos de nanopartículas metálicas e de óxidos metálicos, funcionalizadas com metaloporfirinas.

Utilizou-se ainda uma outra metodologia de imobilização, mais “clássica”, recorrendo a uma SAM de 1,6-hexanoditiol, em vez de se usar o CS₂, para ligar os bionanoconjugados de nanopartículas/metaloporfirinas. Neste tipo de procedimento, para além de terem sido usadas as AuNPs de 20 nm também foram testadas nanopartículas de Pt com diâmetros médios de 3 nm, e um outro composto organometálico, um derivado da vitamina B₁₂. O desempenho catalítico dos eléctrodos modificados com o 1,6-hexanoditiol foi comparado ao observado com os sistemas preparados com o CS₂.

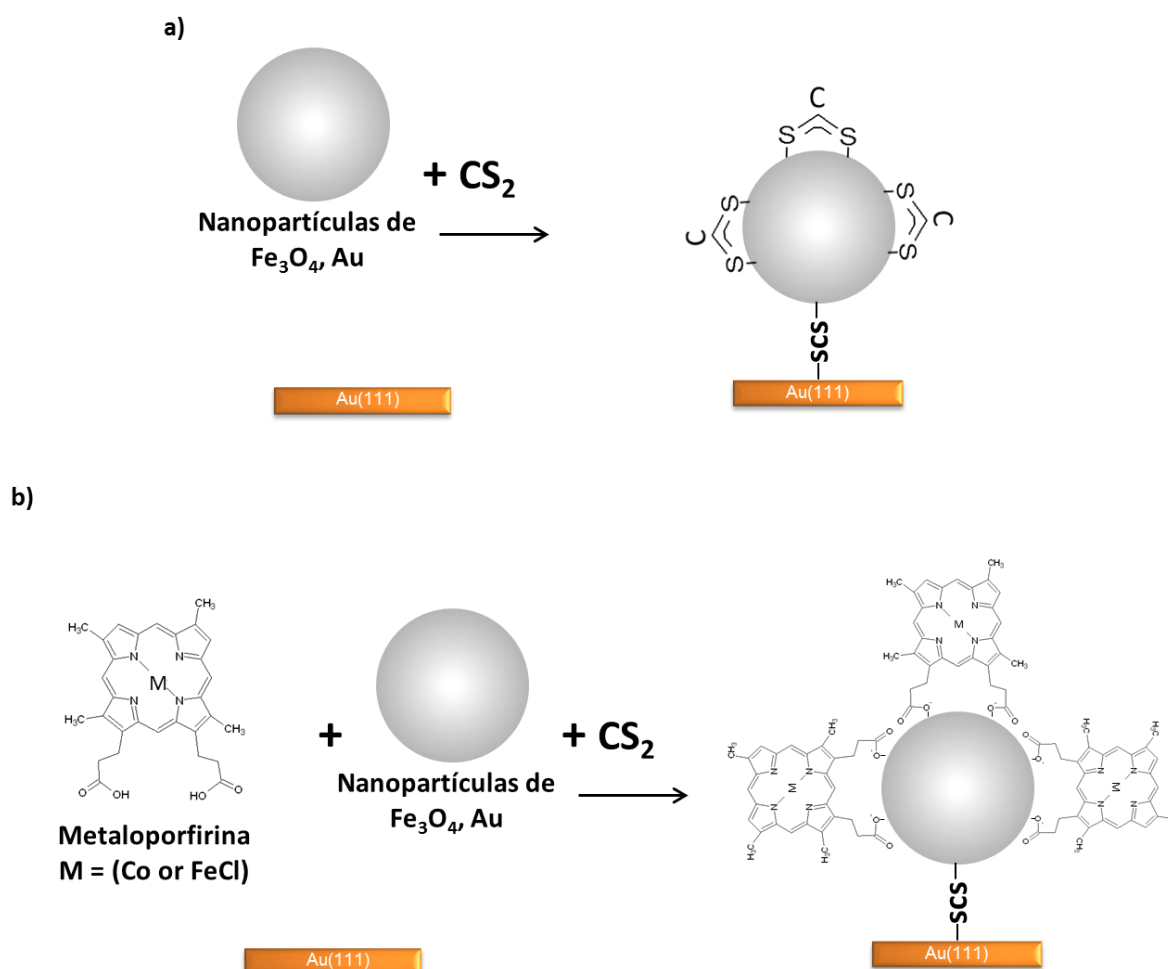


Figura 4.1 - Ilustração esquemática da metodologia usada para a funcionalização das nanoprtículas ligadas ao Au (111) através do CS₂: a) nanoprtículas funcionalizadas apenas com o CS₂; b) nanoprtículas funcionalizadas com as metaloporfirinas (contendo grupos ácidos carboxílicos) e CS₂. Para simplificar, no esquema 4.1b, apenas está representada uma molécula de CS₂, embora devido à espontaneidade do método mais moléculas possam estar adsorvidas à nanoprtícula, juntamente com metaloporfirinas.

4.1 Funcionalização de nanoprtículas de Fe₃O₄ com metaloporfirinas

Como descrito no capítulo 2 na seção 2.2, foram sintetizadas nanoprtículas de Au e Fe₃O₄ de diversos tamanhos. A distribuição e o tamanho das AuNPs foram avaliados por TEM e através da análise das imagens foi possível construir, recorrendo ao programa Image J, o respetivo histograma da distribuição de tamanhos. Neste capítulo só será mostrada a imagem de TEM e o respetivo histograma para as AuNPs sintetizadas e estabilizadas com uma menor concentração de citrato de sódio, pois as restantes já foram mostradas no capítulo 3, seção 3.1.1. Os diâmetros médios determinados, com base no histograma das imagens de TEM das AuNPs (figura 3.12 e 4.2, seção 3.1.1 do capítulo 3) foram aproximadamente 5, 22 e 38 nm, consistentes com as condições de síntese utilizadas.

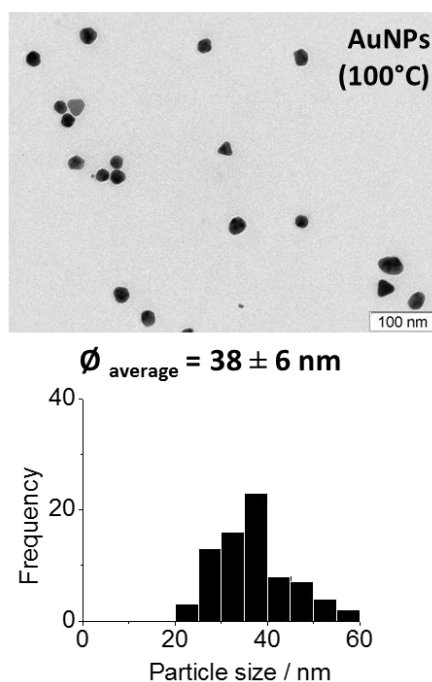


Figura 4.2 – Imagem de TEM das nanopartículas de Au sintetizadas a 100°C e estabilizadas com menor concentração de citrato de sódio e o correspondente histograma da distribuição de tamanhos com o valor do tamanho médio da amostra.

Os difratogramas de raios-X e as imagens de TEM e distribuição de tamanhos obtidos para as amostras de nanopartículas de Fe_3O_4 já foram apresentados na figura 3.29 e 3.30, secção 3.2.1 (capítulo 3). Como mencionado, os picos observados nos difratogramas foram atribuídos à estrutura cúbica da magnetite, permitindo confirmar a pureza de ambas as amostras [30]. O tamanho médio das nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas estimado foi de 19 e 38 nm, como resultado de um período de aquecimento a 200°C, a 3 e 24 h (figura 3.29, secção 3.2.1, capítulo 3), respetivamente. Os parâmetros da célula calculados por difração de raios-X para as nanopartículas de Fe_3O_4 NPs, de menor e maior tamanho, como referido anteriormente (secção 3.2.1 (capítulo 3) foram calculados, obtendo-se valores de $a = 8.386(5) \text{ \AA}$ e $8.394(3) \text{ \AA}$, respetivamente, o que está de acordo com o reportado em trabalho anterior [31]. Tal facto demonstra a dependência do parâmetro da célula com o tamanho médio da nanopartícula. Este resultado indica uma maior pureza para as nanopartículas de maiores dimensões, uma vez que as partículas menores são mais facilmente oxidadas.

Para simplificar a designação de cada amostra, os valores médios usados para identificar o diâmetro de cada amostra foi de 5, 20 e 40 nm para as AuNPs e 20 e 40 nm para as Fe₃O₄NPs.

Usualmente, a caracterização das metaloporfirinas em solução é efetuada por espectroscopia de UV-visível. Esta classe de compostos com um macrociclo tetrapirrólico que não possuem ainda um centro metálico, têm bandas de absorção na região do UV-visível, uma banda mais intensa entre os 400-450 nm designada de banda de Soret, correspondente à transição (S₀→S₂) e outras quatro bandas, de menor intensidade, entre 500 a 700 nm, designadas de bandas-Q, correspondentes a transições (S₀→S₁) [32]. Quando um metal é inserido no anel tetrapirrólico, as quatro bandas-Q colapsam e originam apenas duas, não afetando normalmente, a banda de Soret [32, 33].

A figura 4.3 mostra os espectros de UV-visível das metaloporfirinas de Co e de Fe em solução e das nanopartículas de Au (20 nm) e de Fe₃O₄ (20 nm), antes e após a sua modificação com as porfirinas. O espectro do derivado da porfirina dissolvido em etanol exibe bandas de absorção esperadas para este tipo de metaloporfirinas [33]: CoP – banda de Soret a 412 nm e as bandas-Q a 526, 552 nm; FeP – 394 nm (banda de Soret), 475 e 580 nm (bandas-Q). Na figura 4.3a, a banda de plasmão de superfície da suspensão coloidal das AuNPs foi observada a 522 nm, correspondendo ao valor esperado para este diâmetro de nanopartículas de ouro. Após a incubação da porfirina de Co e depois de um processo de lavagem rigoroso (seção 2.2), o espectro das AuNPs funcionalizadas revela a presença da banda de Soret a 407 nm e das bandas-Q a 526 e 559 nm, sobrepostas com a banda de ressonância das AuNPs, a qual aparece desviada para comprimentos de onda superiores. Estas alterações espectrais confirmam a modificação das AuNPs com porfirinas e indicam um aumento do tamanho médio das nanopartículas, devido à adsorção da metaloporfirina nas NPs, e possivelmente devido também à formação de agregados H e J, como resultado das interações hidrofóbicas e π entre os porfirinóides [5]. Como descrito no procedimento experimental da síntese das AuNPs (seção 2.2), estas são estabilizadas por iões citratos e, apesar da adsorção destes iões ser efetiva nas AuNPs [34], a substituição do grupo COOH do citrato de

sódio pelo grupo COOH da CoP deverá ocorrer com alguma facilidade, pois a energia de ligação entre o Au-O é equivalente em ambos os compostos.

Os espectros obtidos para as Fe₃O₄NPs (20 nm)/CoP (figura 4.3b) exibem a banda de Soret centrada a 406 nm e as bandas-Q a 521 e 556 nm, enquanto que para as Fe₃O₄NPs/FeP (figura 4.3c), a banda a 398 nm é a de Soret e a 500 e 588 nm são as bandas-Q, confirmando a adsorção eficaz de ambas as porfirinas à superfície das nanopartículas de magnetite. É de realçar que a lavagem das NPs modificadas, para remoção do excesso de metaloporfirina que não adsorveu fortemente às nanopartículas, se torna bastante facilitada devido às características magnéticas deste nanomaterial. Foram obtidos resultados similares para as Fe₃O₄NPs de 40 nm, os quais são mostrados na figura 4.4.

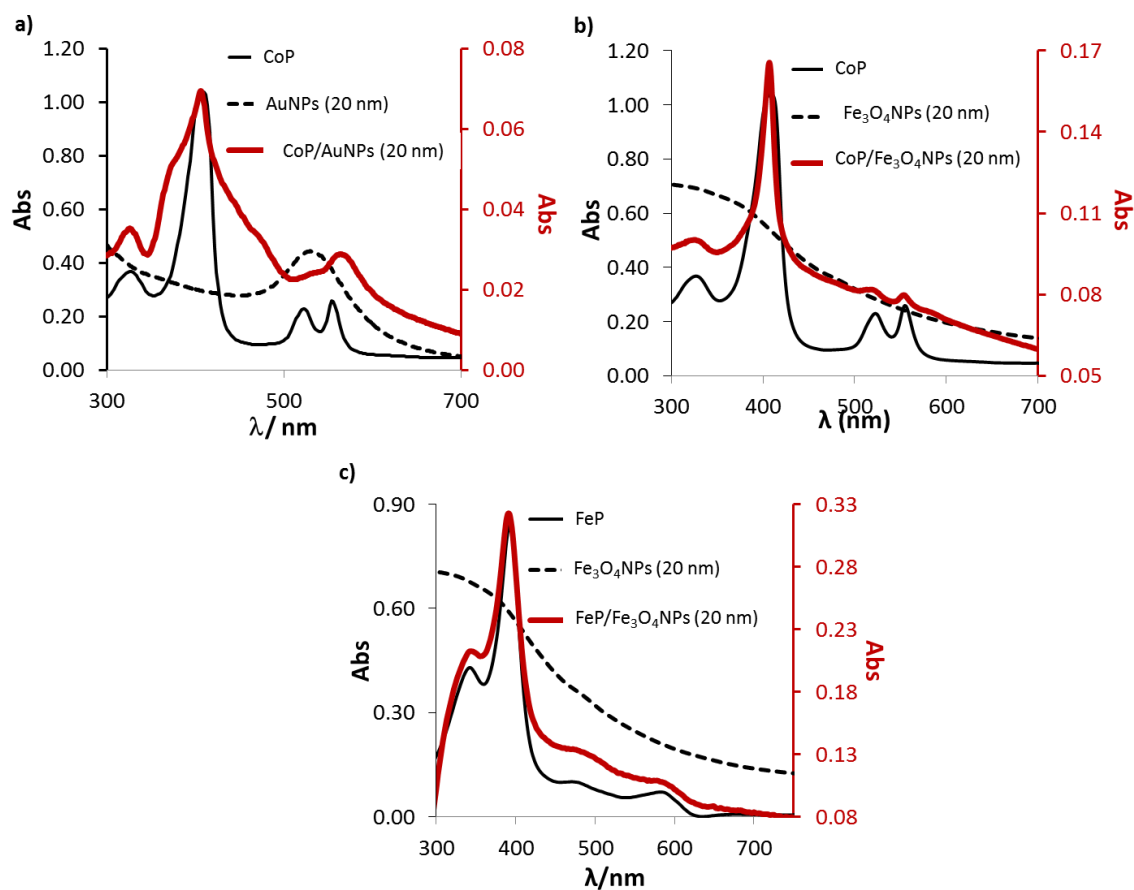


Figura 4.3 – Espectros de UV-visível de nanopartículas com tamanhos médios de 20 nm de a) Au, b) e c) Fe₃O₄ antes (linha preta tracejado, eixo esquerdo dos yy) e depois da modificação (linha vermelha, eixo direito dos yy) com a porfirina de Co e de Fe (CoP e FeP) em soluções orgânicas (etanol). Os espectros das porfirinas em solução (dissolvidas em etanol) (linha preta, eixo esquerdo dos yy) também são apresentados.

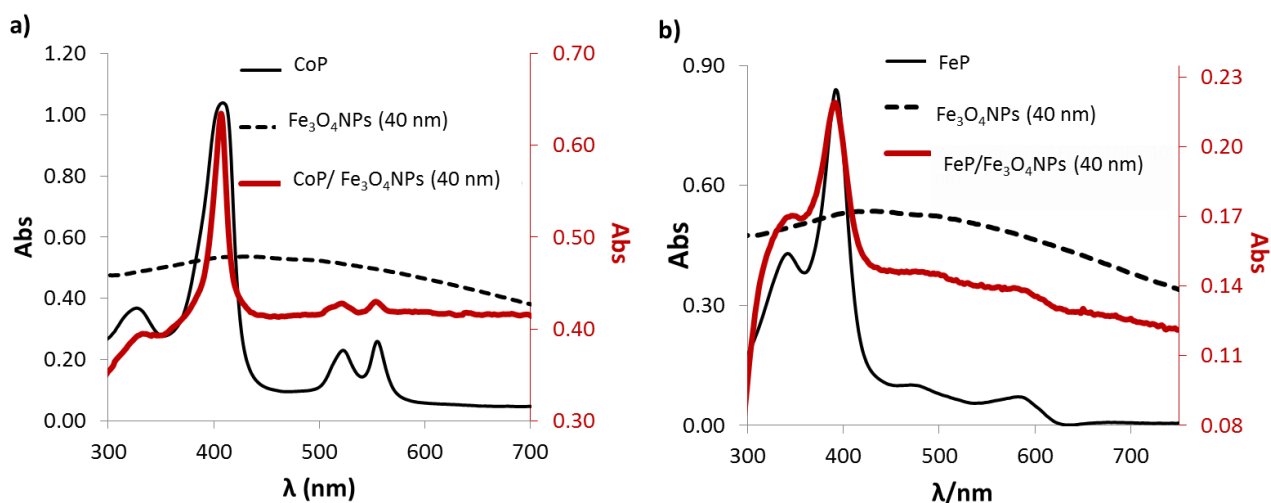


Figura 4.4 - Espectros de UV-visível das porfirinas de Co (CoP) e de Fe (FeP) dissolvidas em etanol (linha preta, eixo esquerdo dos yy), das nanoprtculas de Fe_3O_4 com tamanhos médios de 40 nm antes (linha a tracejado, eixo esquerdo dos yy) e após a modificação (linha vermelha, eixo direito dos yy) com as metaloporfirinas.

Ao contrário das AuNPs, as Fe_3O_4 NPs não são estabilizadas por iões citratos e podem ligar-se de forma eficaz a ácidos carboxílicos, logo a adsorção de porfirinas de Co e de Fe a este tipo de superfícies deverá ocorrer facilmente, comparativamente a superfícies de ouro. Observa-se uma banda de Soret mais estreita na presença deste tipo de nanoprtculas de óxidos metálicos, sugerindo uma menor agregação entre as NPs do que a que ocorre nas AuNPs, provavelmente devido a uma orientação apropriada/preferencial das porfirinas imobilizadas.

4.2 Desempenho eletrocatalítico

A atividade eletrocatalítica para a redução de oxigénio molecular de cada tipo de eléctrodo modificado foi avaliada numa solução de 0.1 M H_2SO_4 saturada de ar (concentração máxima de O_2 de 2.9×10^{-4} M [2]). O estudo foi efetuado por voltametria cíclica a uma velocidade de varrimento de 20 mV s^{-1} . Sempre que necessário, para remover O_2 dissolvido na solução eletrolítica, e assim comprovar os

processos catódicos atribuídos à redução do oxigénio molecular, desarejou-se a solução com N_2 ($\geq 99,9999\%$) durante um período de aproximadamente 60 minutos.

A figura 4.5 mostra os voltamogramas cíclicos da superfície de ouro sem qualquer tipo de modificação e após a funcionalização com nanopartículas de Au (figura 4.5a) e Fe_3O_4 (figura 4.5b) imobilizadas em Au (111) usando o CS_2 . A superfície do Au com orientação cristalográfica (111) apresenta uma baixa catálise para a ORR [11, 20] e de fato, através da figura 4.5a verificou-se que no eléctrodo de Au (111) não se detetou nenhum processo de redução, na gama de potencial estudada, que pudesse ser atribuído à redução do oxigénio molecular. A ligação das nanopartículas de Au e Fe_3O_4 *via* CS_2 é confirmada a partir dos resultados eletroquímicos obtidos na presença de oxigénio, observando-se um pico catódico irreversível em todos os eléctrodos modificados na presença de nanopartículas. As linhas a tracejado da figura 4.5 correspondem ao comportamento dos eléctrodos modificados com nanopartículas, obtidos na ausência de oxigénio, onde não se verificou a presença do pico catódico da ORR. Neste tipo de ensaios apenas se estudou as AuNPs com 5 e 20 nm de diâmetro.

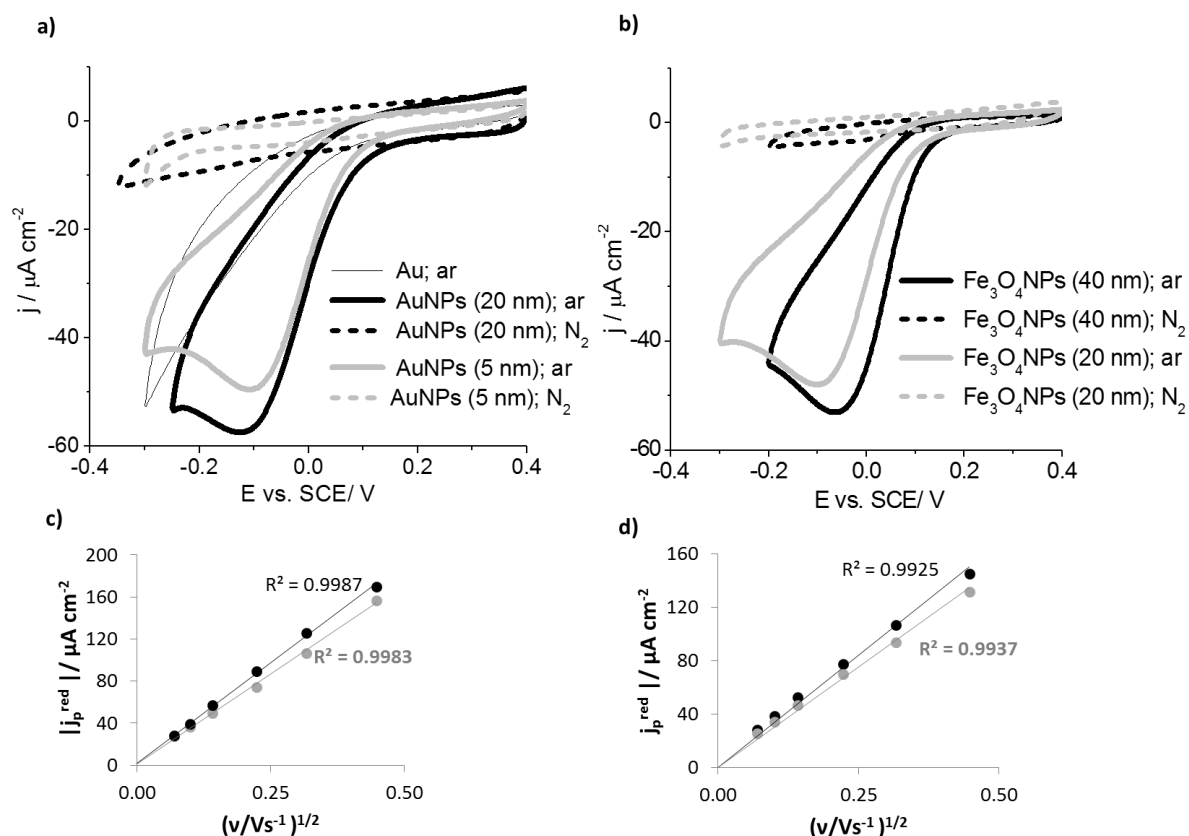


Figura 4.5 – Voltamogramas cíclicos obtidos em soluções de 0.1 M H_2SO_4 arejadas e desarejadas a 20 mV s^{-1} : a) eléttrodo de Au e eléttrodo modificado com AuNPs (5, 20 nm) e CS_2 e b) eléttrodo modificado com $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (20 e 40 nm) e CS_2 . Representação gráfrica de $|j_p^{\text{red}}|$ vs. $v^{1/2}$ das superfícies funcionalizadas com c) AuNPs/ CS_2 e d) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}/\text{CS}_2$ em soluções de 0.1 M H_2SO_4 arejadas.

Para os eléttodos modificados com AuNPs, observou-se um aumento da densidade corrente do pico para as nanoprtculas maiores, no entanto o valor do potencial de redução é muito próximo em ambas as superfícies modificadas ($E_p^{\text{red}} = -0.125$ e -0.105 V, para AuNPs de 20 e 5 nm, respetivamente). Nos eléttodos modificados na presença das nanoprtculas de Fe_3O_4 também se verificou o aumento na densidade de corrente do pico catódico para as nanoprtculas de maior tamanho mas, neste caso, acompanhado por um ligeiro desvio positivo no potencial do pico catódico ($E_p^{\text{red}} = -0.100$ V e -0.065 V para as $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ com 20 nm e 40 nm, respetivamente). Este tipo de comportamento poderá ser atribuído à composição

química das nanopartículas de óxidos de ferro. Como referido anteriormente, o parâmetro da célula das nanopartículas de 40 nm é muito próximo ao determinado para a magnetite pura, comparativamente ao verificado para as nanopartículas de 20 nm. Em estudos anteriores [31] foi reportado que, a composição deste tipo de nanopartículas pode ser expressada como $Fe_{3-x}O_4$ devido à oxidação da superfície das NPs, e em particular para as NPs de maior tamanho, o x pode ser muito próximo de zero, aproximando-se o mais possível da composição da magnetite pura. A composição das nanopartículas de $Fe_{3-x}O_4$ irá influenciar a sua condutividade elétrica e por esse motivo a performance catalítica poderá ser afetada. É de notar que, a condutividade elétrica no Fe_3O_4 é elevada devido ao movimento rápido dos eletrões entre o par redox Fe^{2+} e o Fe^{3+} nas posições octaédricas da estrutura da magnetite [31]. Assim, este processo deverá ser minorado nas nanopartículas mais oxidadas, o que justifica o desempenho inferior das NPs de 20 nm, quando comparadas com as de 40 nm.

Tal como previsto para uma reação eletroquímica controlada por transferência de massa, verifica-se uma variação linear entre as densidades de corrente do pico de redução do oxigénio molecular, dissolvido em solução, e a raiz quadrada da velocidade de varrimento de potencial (figura 4.5c e d). Este comportamento linear demonstra ainda a estabilidade dos eléctodos modificados pelas nanopartículas de óxidos de ferro durante os varrimentos de potencial em meio ácido. A estabilidade observada nestas condições de pH pode ser atribuída à formação espontânea de um revestimento orgânico composto por moléculas de CS_2 à volta das NPs, que as protege da degradação e à ligação estável das NPs à superfície do eléctrodo de Au (111). No entanto, como mencionado anteriormente, o desempenho catalítico destes eléctodos deverá ser melhorado com a incorporação de um centro organometálico com reconhecida atividade catalítica para a redução do oxigénio. Os estudos seguintes foram realizados com eléctodos modificados com nanopartículas e metaloporfirinas de cobalto e ferro.

Na figura 4.6a estão representadas as respostas eletroquímicas para a ORR da porfirina de CoP (CoP) imobilizada diretamente na superfície de Au (111) e das AuNPs modificadas com CoP e CS_2 ao Au (111). O processo catódico registado a 0 mV corresponde à redução do oxigénio no eléctrodo modificado com CoP (na ausência de

nanoprtculas), revelando o efeito catalítico do macrociclo N_4 , comparado com a resposta observada apenas para as AuNPs/ CS_2 adsorvidas ao elétrodo (figura 4.5a). Adicionalmente, as AuNPs de 5 nm modificadas com a CoP, mostram um desvio positivo no valor de E_p^{red} , em comparação com ambos os sistemas, AuNPs (20 nm)/CoP e CoP diretamente adsorvida no elétrodo. Estes resultados indicam um efeito sinérgico entre as NPs e o derivado porfirinóide de cobalto na facilitação da reação de redução do oxigénio. As correntes de redução observadas para o sistema AuNPs (20 nm)/CoP são aproximadamente 15% superiores às obtidas com as AuNPs de menor tamanho (5 nm), sugerindo a presença de uma maior quantidade de porfirina adsorvida no elétrodo quando preparado com AuNPs de 20 nm.

A figura 4.6b apresenta o comportamento eletroquímico dos elétrodos de Au (111) modificados com CoP, Fe_3O_4 NPs de 20 ou 40 nm e CS_2 . A combinação deste tipo de nanoprtculas de óxidos metálicos com metaloporfirinas, nitidamente melhora o desempenho eletrocatalítico do sistema, comparativamente às interfaces preparadas na presença de AuNPs. Em particular, para o elétrodo modificado com as nanoprtculas de óxidos de ferro com 40 nm, o valor de E_p^{red} é 0.140 V, valor que é significativamente mais positivo que nos outros sistemas (com ou sem NPs). Este resultado pode ser explicado pela capacidade das nanoprtculas de magnetite menos oxidadas (40 nm) de proporcionar mais locais para adsorção e ativação de O_2 [26] do que as nanoprtculas de menores dimensões.

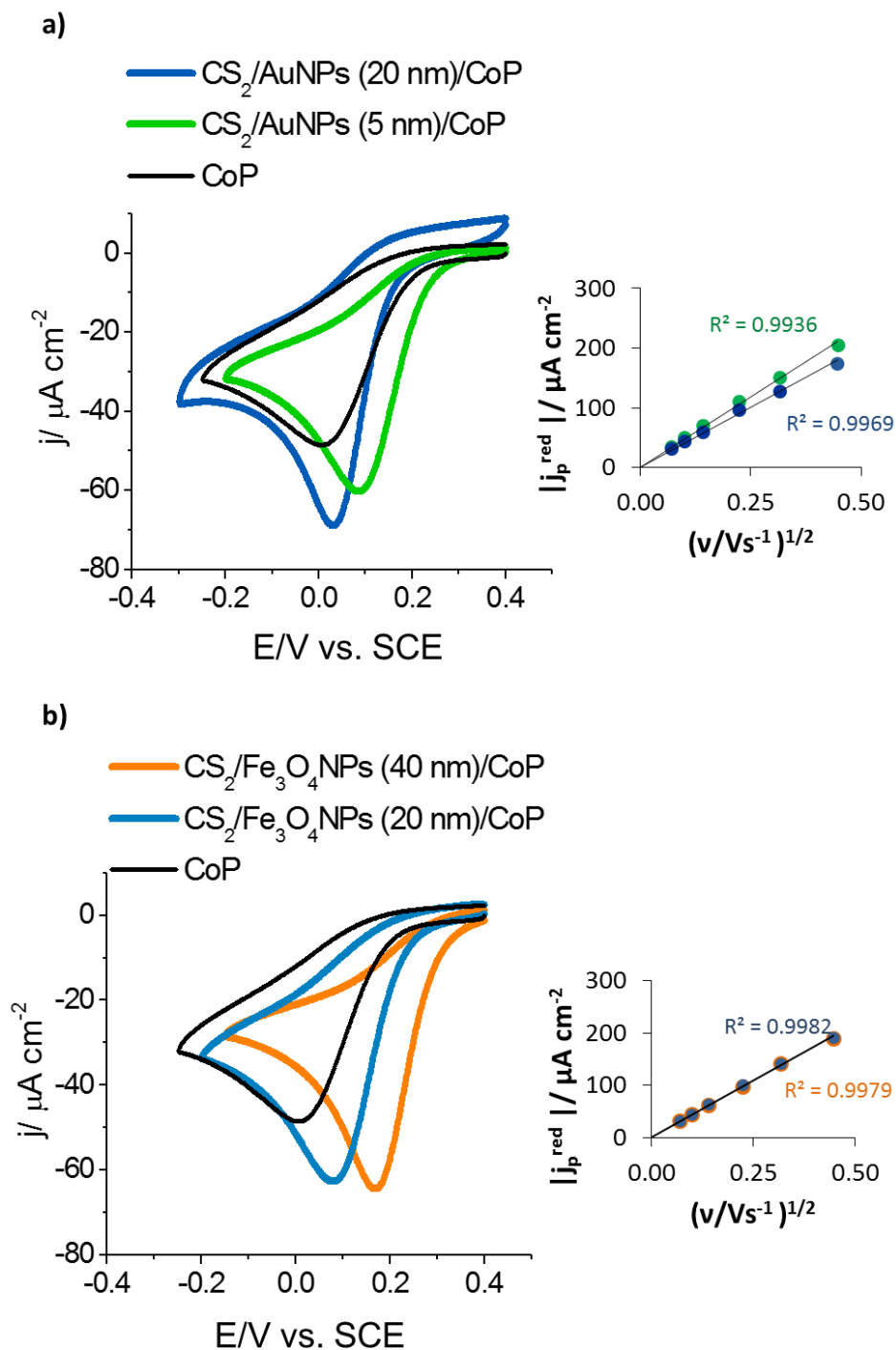


Figura 4.6 – Voltamogramas cíclicos obtidos em soluções de 0.1 M H₂SO₄ (arejadas), a $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$, do Au(111) modificado com a) porfirina de Co (CoP), CS₂/AuNPs (5, 20 nm)/CoP, b) CoP, CS₂/ Fe₃O₄NPs (20 e 40 nm)/CoP. O inset de cada figura correspondente à representação gráfica da $|j_p^{\text{red}}|$ vs. $v^{1/2}$ para os eléctodos modificados com porfirina/NPs /CS₂.

As respostas eletroquímicas da atividade catalítica do derivado de deuteroporfirina de Fe (FeP) estudado neste trabalho conjugado com as nanoprtculas (AuNPs de 20, 40 nm e Fe₃O₄NPs de 20, 40 nm) são apresentadas na figura 4.7. Na ausência de nanoprtculas, o elétrodo modificado com porfirina de Fe (FeP) exibe um pico catódico largo a um potencial -0.030 V, que é próximo de valores reportados na literatura para outras porfirinas de Fe adsorvidas em elétrodos de carbono vítreo [35-37]. Em contraste com os resultados observados para a CoP, os elétrodos modificados com AuNPs (20 ou 40 nm)/FeP e Fe₃O₄NPs (20 ou 40 nm) exibem picos catódicos da ORR ao mesmo valor de potencial (\approx -0.000 V), apenas ligeiramente mais positivo do que no elétrodo Au (111)/FeP. Contudo, foi registado um aumento significativo da densidade de corrente quando se está em presença das NPs, semelhante ao verificado nos sistemas com CoP. Estes resultados sugerem que, ao contrário do que foi verificado na presença da CoP e NPs, não se verifica nenhum efeito sinérgico entre a FeP e as NPs que influencie o mecanismo da ORR.

Entre todos os sistemas estudados, o que apresentou a maior densidade de corrente do pico catódico da ORR foram os elétrodos modificados com CS₂/Fe₃O₄NPs (40 nm) /FeP, o qual apresentam quase o dobro da corrente detetada usando as mesmas nanoprtculas de Fe₃O₄ e a porfirina de Co. Este resultado constitui um forte indício de que a ORR deverá ocorrer por um mecanismo diferente e mais rápido do verificado com a CoP, talvez através de transferência de quatro eletrões, com a formação de água.

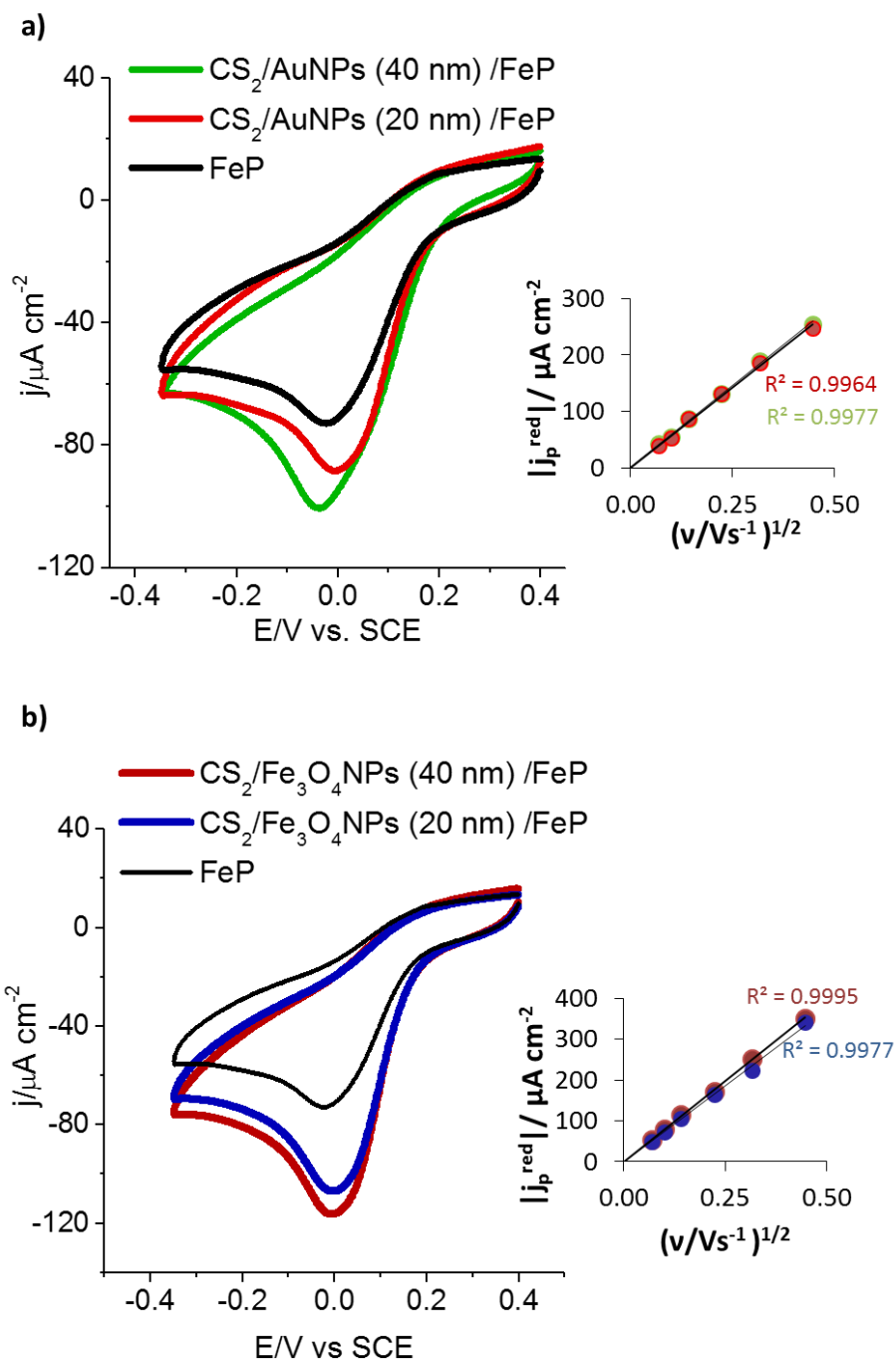


Figura 4.7 – Voltamogramas cíclicos obtidos em soluções de 0.1 M H₂SO₄ (arejadas), a $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$, do Au(111) modificado com a) porfirina de Fe (FeP), CS₂/AuNPs (20 nm e 40 nm) e b) FeP, CS₂/ Fe₃O₄NPs (20 e 40 nm)/FeP. O inset de cada figura correspondente à representação gráfica da $|j_p^{\text{red}}|$ vs. $v^{1/2}$ para os eléctodos modificados com porfirina/NPs /CS₂.

É de salientar que o CS₂ tem um papel crucial na ligação das nanoprtculas à superfície do eléttodo. Ao testar a mesma metodologia, na ausência de CS₂, figura 4.8, não foi detetado nenhum aumento das correntes catalíticas da reação de redução do oxigénio, ou desvio de potencial, devido à presença de NPs, comprovando-se assim a importância do CS₂ neste tipo de funcionalização de eléttodos de ouro. Estes resultados indicam que, apesar de existir afinidade entre os ácidos carboxílicos e a superfície de ouro [29], a interação dos carboxilatos com as nanoprtculas de óxidos metálicos deverá ser muito mais forte e, que só em presença do CS₂, as nanoprtculas funcionalizadas se ligam de uma forma estável ao eléttodo.

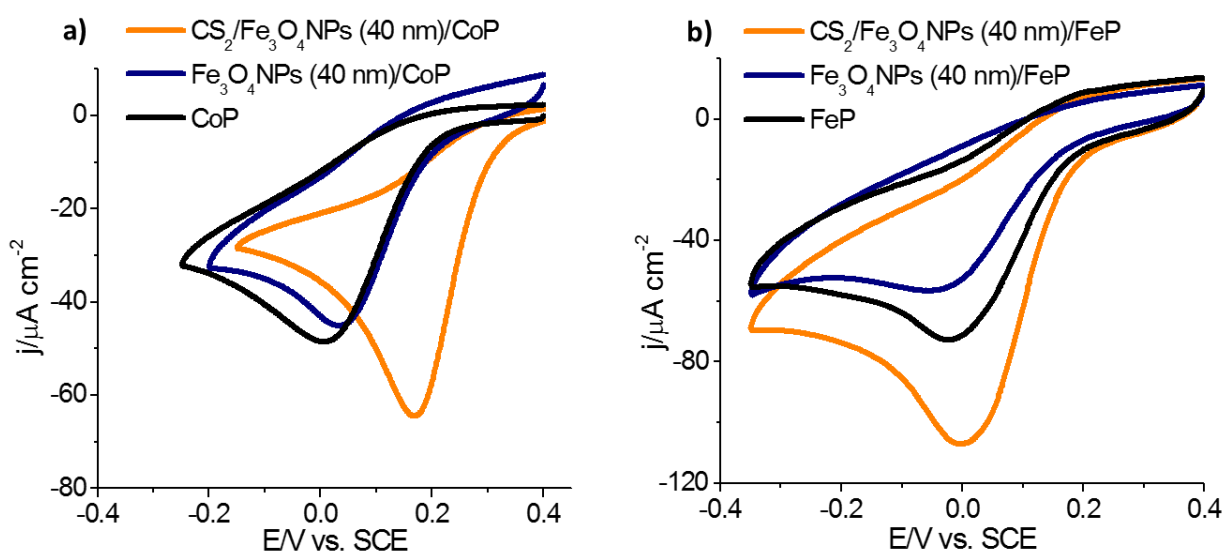


Figura 4.8 – Voltamogramas cíclicos obtidos em soluções de 0.1 M H₂SO₄ (arejadas), a $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$, do Au(111) modificado com a) porfirina de Co (CoP), CS₂/ Fe₃O₄NPs (40 nm)/CoP e b) porfirina de Fe (FeP), CS₂/ Fe₃O₄NPs (40 nm)/FeP.

Como ilustrado nas figuras 4.6 e 4.7, as respostas entre as densidades de corrente dos picos catódicos e a raiz quadrada da velocidade de varrimento de potencial, indicam que a reação de redução do oxigénio é um processo controlado por difusão. Adicionalmente, a linearidade deste tipo de representação reforça a estabilidade dos conjugados porfirina/NPs ligados ao Au (111), *via* CS₂. Este

comportamento é especialmente relevante nas nanopartículas de Fe_3O_4 , tendo em conta a sua solubilidade/degradação em soluções ácidas. Por esta razão, tal como mencionado na introdução, recorre-se normalmente à formação de um revestimento protetor para cobrir a superfície das nanopartículas de Fe_3O_4 , evitando a sua degradação [27]. Consequentemente, para validar a estabilidade dos eléctrodos modificados com nanopartículas de Fe_3O_4 , CoP e CS_2 o seu desempenho catalítico para ORR foi avaliado durante 24 h, numa solução de 0.1 M de H_2SO_4 , através de voltametria cíclica. Verifica-se que os valores de densidade de correntes obtidos são bastante estáveis, não se observando um decréscimo significativo (inferior a 5%) meio ácido durante este período (figura 4.9). Este resultado denota claramente que a presença do CS_2 e das metaloporfirinas protege eficazmente as nanopartículas de Fe_3O_4 de se degradarem em condições de pH baixo, mantendo-as ligadas à superfície do eléctrodo.

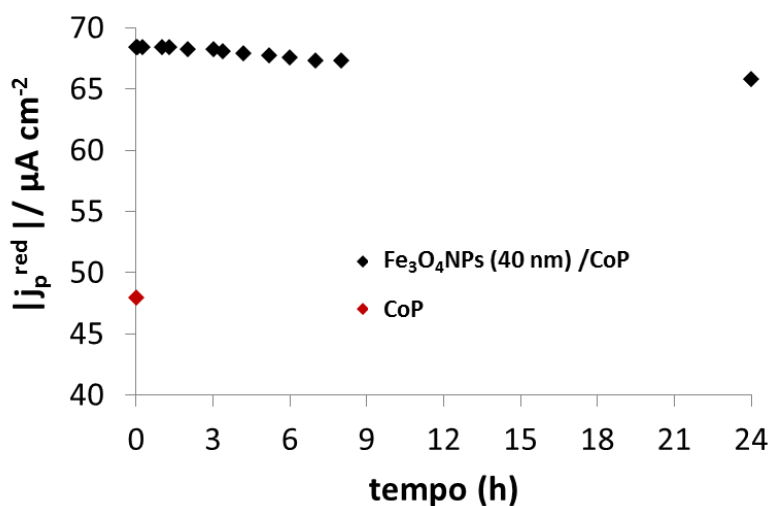


Figura 4.9 – Representação gráfica da evolução do tempo do valor da densidade de corrente do pico de redução no Au (111) / CS_2 / Fe_3O_4 NPs (40 nm)/CoP (marcador preto) e Au/CoP (marcador vermelho) em condições de pH1 (0.1 M H_2SO_4).

Para calcular o número de electrões transferidos nas reacções de redução do O_2 foram seguidas duas abordagens reportadas na literatura. Na primeira recorreu-se aos dados obtidos por voltametria cíclica e aplicando-se as equações 23 e 24, foi possível

determinar o número de eletrões (n) envolvidos na ORR, onde $E_{1/2}$ é o potencial de meia-onda e todos os outros símbolos têm o seu significado usual e já descritos na parte experimental deste trabalho e em literatura mencionada neste capítulo [9, 50-52]. Assumindo $C_O^* = 2.9 \times 10^{-4}$ M a 22°C [2] (concentração molar do oxigénio a 22°C) e $D_O = 1.7 \times 10^{-5}$ cm² s⁻¹ (coeficiente de difusão do oxigénio na água a 22 °C) [2],

$$i_p = 2.99 \times 10^5 n(\alpha)^{1/2} C_O^* D_O^{1/2} \nu^{1/2} \quad (\text{eq. 23})$$

$$|E_p - E_{p/2}| = \frac{1.857RT}{\alpha F} = \frac{47.2}{\alpha} mV, \quad 22^\circ C \quad (\text{eq. 24})$$

O número de eletrões estimado e que são transferidos da reação de redução do O₂ pela CoP adsorvida diretamente no eléctrodo de Au (111) foi de 1.9, consistente com os 2 eletrões transferidos na reação de redução do O₂ a H₂O₂, já observada para eléctrodos modificados com SAMs de porfirinas similares com grupos âncora dissulfureto [9] ou ácidos fosfónicos [11]. O número de eletrões estimado para a ORR no eléctrodo CS₂/NPs/CoP foi também de aproximadamente 2, expectável para a conversão eletroquímica do O₂ a H₂O₂ [9, 11].

O mesmo procedimento foi aplicado para determinar o número de eletrões no sistema Au (111) / FeP e o valor estimado foi próximo dos 3 eletrões. De acordo com a literatura [38, 39] a ORR para as porfirinas ou ftalocianinas de ferro ocorre via transferência de 4 eletrões. Este facto sugere que, para o eléctrodo modificado com FeP a ORR ocorre através de uma mistura de dois mecanismos: um por via da transferência de 2 eletrões formando H₂O₂ e o outro pela transferência de 4 eletrões originando H₂O. Enquanto o primeiro mecanismo deve ser mediado pela FeP imobilizada, o segundo terá lugar nos locais onde o Au não está coberto de porfirina, em consonância com resultados reportados para outros macrociclos de ferro [38]. Esta interpretação pode também ser aplicada aos eléctrodos modificados pela FeP e às AuNPs ligados a Au (111) através de ligações CS₂. Na presença de AuNPs de 20 e de 40 nm, o número de eletrões envolvidos na ORR é 3.1 e 3.5, respetivamente, indicando que ambas as reações de redução (formando H₂O₂ ou H₂O) têm um contributo na redução do O₂. De acordo com os valores estimados, o processo de redução via 4 eletrões deverá ter uma

maior contribuio, o que poderá estar relacionada com uma maior quantidade ou mais acessibilidade de FeP na superfcie.

Nos eléttodos funcionalizados com a FeP, na presena de nanoprtculas de Fe₃O₄ de 20 ou 40 nm foi calculado um valor prximo de 4 eléttres para ambas as superfcies. Considerando que nos sistemas CS₂/ Fe₃O₄NPs (20 e 40 nm), sem a presena de metaloporfirinas, apenas esto envolvidos 2 eléttres na ORR (valores calculados a partir das representaes j_p vs. v ilustradas na figuras 4.5b, foi possvel concluir que com Fe₃O₄NPs na superfcie, esta fica completamente coberta de catalisador organometálico, neste caso a FeP, justificando os 4 eléttres estimados. Para todos os eléttodos modificados o valor do coeficiente de transferncia eletrnica, α (equaes 1 e 2), foi 0.5 ± 0.1 .

A segunda abordagem, mais fina, para a determinao do nmero de eléttres envolveu estudar o desempenho catalítico das superfcies de Au modificadas por voltametria linear em condies hidrodinmicas, utilizando o eléttodo rotativo de disco (RDE). Nas figuras 4.11 e 4.12 observa-se a evoluo das densidades de corrente com a variao do potencial de eléttodo registadas a diversas velocidades de rotao, numa soluo 0.1 M de H₂SO₄, saturada de ar, para os eléttodos CS₂/ Fe₃O₄NPs (40 nm)/ CoP e CS₂/ Fe₃O₄NPs (40 nm)/FeP, respetivamente.

Como descrito no capitulo 2 deste trabalho (seo 2.4.3), os valores da densidade de corrente limite (j_{lim}) obtidos para a reduo do oxignio por RDE podem ser relacionados com os valores de densidade de corrente de Levich (j_{Lev}) e os valores de densidade de corrente cintica (j_k) atravs da equao (eq. 3 e 4, seo 2.4.3, capitulo 2), como descrito na literatura [40-42]:

A partir das representaes de Koutecky-Levich exibidas nas figuras 4.10b e 4.11b, foram observadas respostas lineares de j_{lim}^{-1} vs. $\omega^{-1/2}$ para ambos os sistemas com declives de $1/(0.62nFCD^{2/3}v^{-1/6})$ e intersees de $1/10^3nFkC$.

Os resultados obtidos por RDE foram concordantes com os obtidos atravs de voltametria clica, ou seja, o nmero de eléttres estimado por cada abordagem foi similar. Para o eléttodo de Au antes e aps a modificao pelo CS₂, Fe₃O₄ NPs (40 nm) e CoP obteve-se 2.3 e 2.2 eléttres, respetivamente, confirmando a reduo do O₂ a H₂O₂. Nos eléttodos funcionalizados na presena de CS₂, Fe₃O₄NPs de 40 nm e da porfirina de Fe, o nmero obtido foi de 3.9 eléttres, indicando que a reduo do O₂ é

conseguida através do mecanismo mais rápido e energeticamente mais eficiente produzindo-se H_2O , o que está concordante com outros estudos publicados envolvendo macrociclos de ferro e nanomateriais [38, 43].

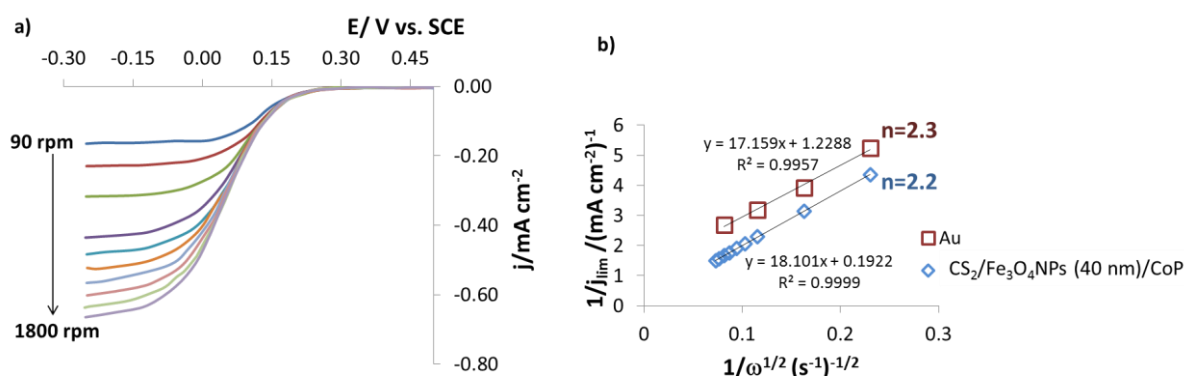


Figura 4.10 – a) Curvas de densidade de corrente vs. potencial para a redução do O_2 obtidas com o eléctrodo rotativo de disco de Au policristalino, antes e após a modificação com $CS_2/Fe_3O_4NPs(40\text{ nm})/CoP$ a diferentes velocidades de rotação, a $v = 20\text{ mVs}^{-1}$ e em solução arejada de $0.1\text{ M }H_2SO_4$; b) Representação das curvas Koutecky-Levich calculadas para o eléctrodo de Au policristalino limpo e modificado.

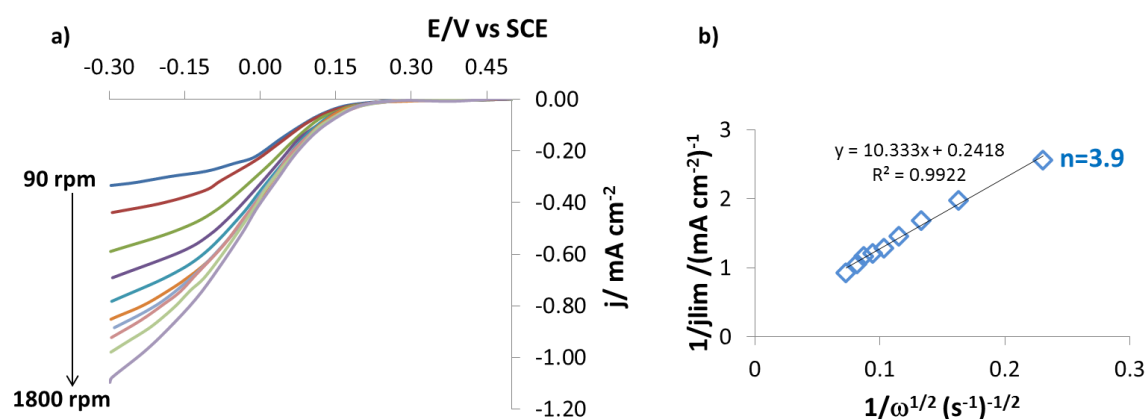


Figura 4.11 – Curvas de densidade de corrente vs. potencial da redução do O_2 obtidas com o eléctrodo rotativo de disco de Au policristalino modificado com $CS_2/Fe_3O_4NPs(40\text{ nm})/FeP$ a diferentes velocidades de rotação, a $v = 20\text{ mVs}^{-1}$ e em solução arejada de $0.1\text{ M }H_2SO_4$; b) Representação das curvas Koutecky-Levich calculadas para o eléctrodo de Au policristalino modificado.

Através das interseções das representações de j_{lim}^{-1} vs. $\omega^{-1/2}$ foi possível calcular a constante de velocidade aparente (k). O valor de k determinado para o elétrodo de Au sem modificação foi de $1.3 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$; nos elérodos modificados pelo CS_2 , $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (40 nm) e as porfirinas Co de Fe, foram estimados valores de $8.5 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$ e $3.7 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$, respetivamente.

A quantidade de metaloporfirina imobilizada nas superfícies de ouro, na presença de nanopartículas de ferro de 40 nm foi também determinada, obtendo-se valores de $7.3 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ no elétrodo modificado com CoP e $6.9 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ no caso da FeP. Estes valores de cobertura superficial de catalisador foram determinados a partir dos voltamogramas apresentados na figura 4.12, registados para os elérodos modificados numa solução desarejada de 0.1 M H_2SO_4 . A integração da área dos picos de redução, utilizando a equação 2 descrita na seção 2.3.3 (capítulo 2), correspondentes aos processos $\text{Co}^{(III)}/\text{Co}^{(II)}$ [42](figura 4.13a ou $\text{Fe}^{(III)}/\text{Fe}^{(II)}$ [37] (figura 4.12b). O comportamento linear observado entre j_p^{red} e a velocidade de varrimento de potencial (Figure 4.12 a' e b'), indica que estes processos redox não são controlados por transferência de massa, ou seja que os centros metálicos estão adsorvidos, de uma forma estável, à superfície do elétrodo.

Considerando as quantidades de catalisador (metaloporfirina) em cada elétrodo, os valores de k obtidos para ambas as superfícies são comparáveis aos descritos na literatura para este tipo de compostos inorgânicos adsorvidos em grande quantidade nos elérodos (2.2×10^{-2} - $13.6 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$) [36, 42, 44-46] e para outras superfícies funcionalizadas com metaloporfirinas e nanomateriais ($2.2 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$) [41]. Adicionalmente, o desempenho catalítico destas novas plataformas é significativamente melhor ao obtido para nanopartículas de Pt adsorvidas em elérodos de carbono vítreo e similar à alcançada por agregados de nanopartículas de Pt com porfirina de Co formados pelo método de deposição camada-por-camada [2].

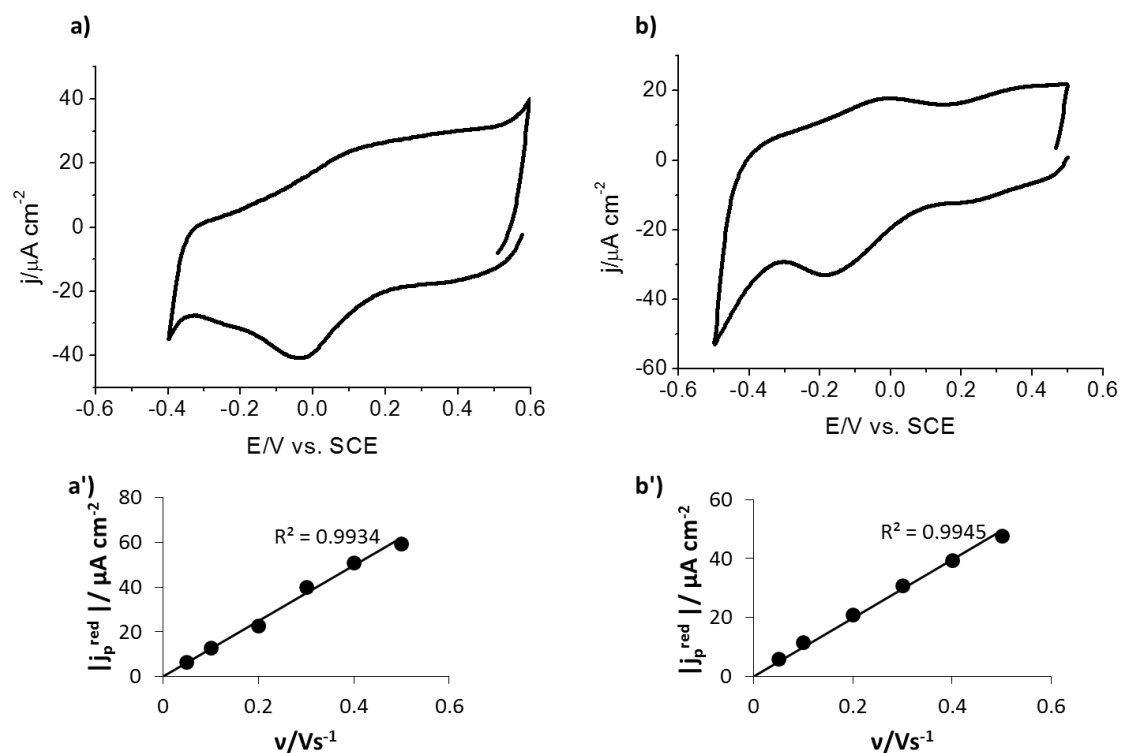


Figura 4.12 – Voltamogramas cíclicos dos eléttodos modificados com CS_2 , $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ de 40 nm e a) porfirina de Co e b) porfirina de Fe, obtidos em soluções de 0.1 M de H_2SO_4 desarejadas (borbulhando N_2 durante 60 min); $v = 300 \text{ mV s}^{-1}$. Nas figuras a' e b' está representada a relação linear entre a densidade de corrente do pico de redução com a velocidade de varrimento.

Para complementar os ensaios de RDE e clarificar os produtos formados na ORR, recorreu-se ao eléttodo rotativo de disco e anel (RRDE), investigando novamente as superfícies que apresentaram melhor resposta eletrocatalítica para a ORR. Na figura 4.13 estão representadas as curvas da densidade de corrente obtida no disco vs. potencial obtido para os eléttodos de Au policristalino modificados com $\text{CS}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (40 nm)/ CoP ou FeP. Estas curvas foram obtidas a uma velocidade de rotação de 180 rpm, durante um varrimento de potencial do disco para valores negativos onde, simultaneamente, foi medida a corrente obtida no anel, a um potencial de 0.9 V. Este valor de potencial é suficiente para oxidar o H_2O_2 a O_2 , caso este seja formado no disco, ou seja, o H_2O_2 é considerado um intermediário da ORR e por esse motivo pode ser detetado neste tipo de ensaios experimentais, ajudando a definir o mecanismo envolvido na redução do O_2 . Foi observada uma corrente significativa no anel a valores

de potencial menores que 0.2 V para a superfície modificada com CoP, correspondente à oxidação do H_2O_2 formado no disco. Em contraste, para a superfície de ouro modificada com FeP apenas foram visíveis correntes insignificantes na mesma região de potencial, independentemente das correntes obtidas no disco serem mais elevadas. Estes resultados provam definitivamente que apenas ocorreu formação de H_2O_2 como produto na ORR no sistema com CoP, validando o número de elétrões estimado a partir das representações de Koutecky - Levich e a partir da voltametria cíclica para os dois sistemas.

Os estudos eletroquímicos em condições hidrodinâmicas confirmam, mais uma vez, a ligação estável dos nanocatalisadores (NPs/metaloporfirinas) à superfície de ouro, pelo CS_2 , validando a metodologia inovadora que é apresentada neste trabalho.

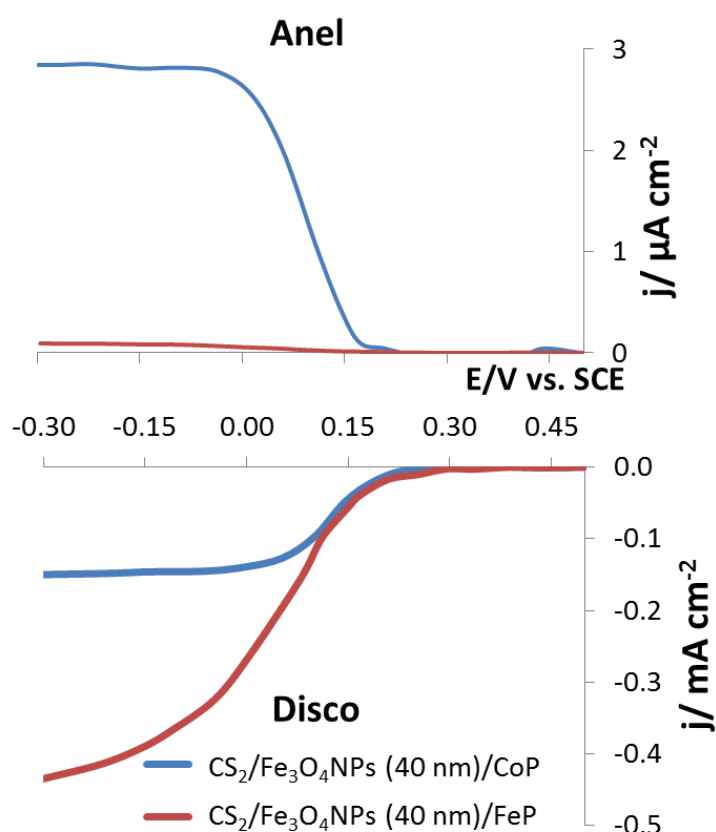


Figura 4.13 – Curvas de densidade de corrente vs. potencial da redução do O_2 a obtidas com o eléctrodo rotativo de disco e anel de Au policristalino modificado com $\text{CS}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs(40 nm)/CoP}$ ou FeP, a 180 rpm, $v_{\text{disco}} = 20 \text{ mVs}^{-1}$ e em solução arejada de 0.1 M H_2SO_4 ; $E_{\text{anel}} = 0.9 \text{ V vs. SCE}$.

Na figura 4.14 é apresentada uma compilação de valores (adquiridos em ensaios independentes) de potenciais do pico de redução e das correspondentes densidades de corrente de pico, obtidas através de um conjunto de ensaios independentes para cada tipo de superfícies modificadas. Como discutido anteriormente, o eletrodo modificado com CS₂, Fe₃O₄NPs (40 nm) e CoP exibiu valores de potencial mais positivos do que as nanopartículas de Fe₃O₄ com 20 nm e nanopartículas de Au de 20 nm modificadas por esta metaloporfirina. Por sua vez, o eletrodo funcionalizado com a FeP e as nanopartículas de Fe₃O₄ de 40 nm apresentou as correntes mais elevadas para ORR. Os melhores resultados obtidos para as NPs de maiores dimensões podem ser explicados pela associação de dois fenômenos: pela maior capacidade da magnetite menos oxidada em adsorver O₂ e facilitar a sua conversão redox por possuir mais centros Fe²⁺ na sua estrutura cristalina [19] e ainda possivelmente pela maior quantidade de porfirina adsorvida no eletrodo (Au (111) + NPs), considerando o número de partículas à superfície do eletrodo (imagens obtidos por AFM).

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que as nanopartículas de óxido de ferro de 40 nm podem ser consideradas como uma boa alternativa nos materiais de cátodo para a reação de redução de oxigênio, comparativamente ao uso de metais nobres, mesmo em condições ácidas, tendo em conta o eficiente revestimento criado nas Fe₃O₄NPs pela metaloporfirina e CS₂. Demonstrou-se também a utilidade e aptidão da molécula de CS₂ para ligar de forma estável nanocatalisadores a superfícies de ouro, mantendo ou melhorando as propriedades deste tipo de catalisadores. Esta metodologia é considerada versátil podendo ser aplicada no desenvolvimento de outros sistemas catalíticos de interesse.

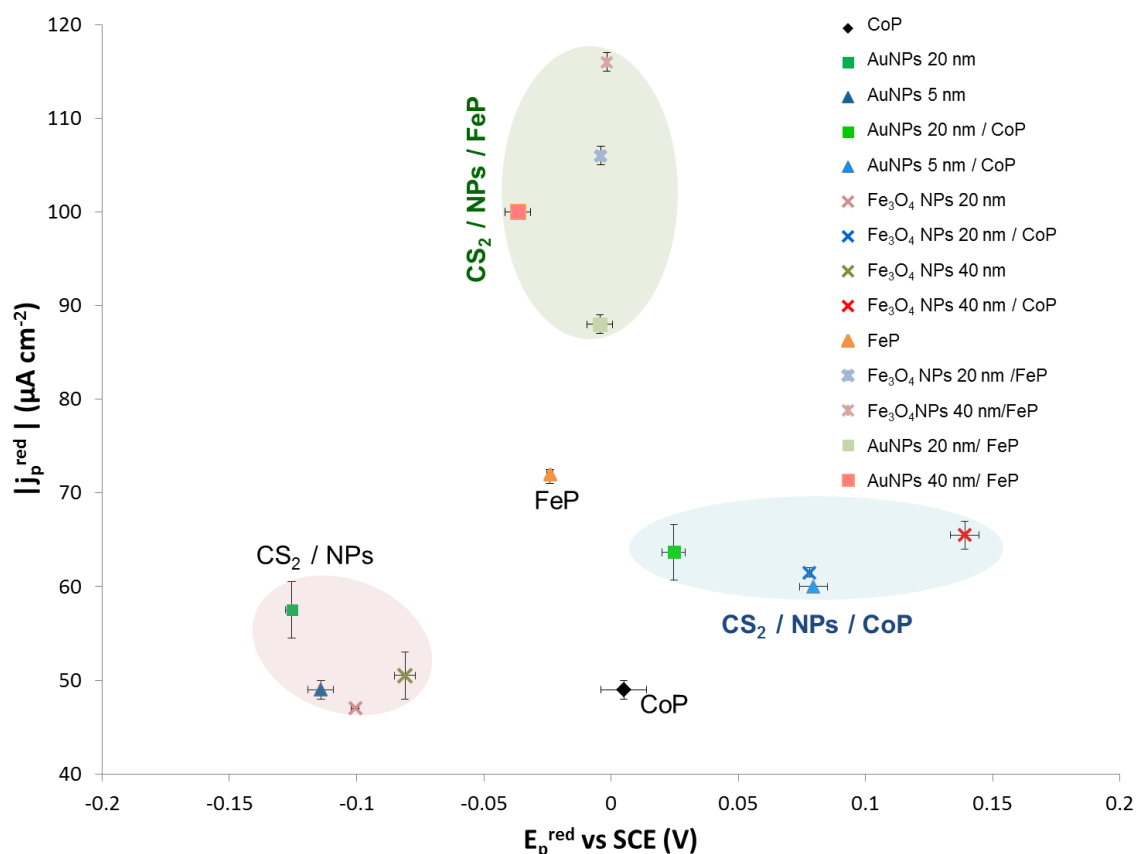


Figura 4.14 – Representação dos valores de $|j_p^{\text{red}}|$ vs E_p^{red} obtidos pelos voltamogramas cíclicos dos eléctrodos modificados exibidos nas figuras 4.5, 4.6 e 4.7.

4.3 Caracterização morfológica das superfícies modificadas

Neste trabalho foi realizada uma análise morfológica da superfície dos eléctrodos que apresentaram melhor resposta catalítica, pois como anteriormente mencionado, a quantidade/distribuição de catalisador presente nas superfícies dos eléctrodos tem uma grande influência no desempenho eletrocatalítico destes.

A figura 4.15a representa a superfície de Au (111) antes da sua modificação, onde se pode visualizar os terraços monoatômicos típicos do Au com orientação preferencial (111). Em todas as imagens topográficas foi observável a presença de nanopartículas dispersas em todas as superfícies do Au (111) analisadas, sendo possível estimar um valor aproximado de NPs em cada eléctrodo. A concentração superficial das NPs estimada para todos os eléctrodos modificados localiza-se entre 3 e

5×10^{10} NPs/cm². Foi ainda possível construir um histograma para cada amostra, determinando-se o tamanho médio das NPs modificadas (figura 4.15). O diâmetro médio obtido as AuNPs de 20 nm é ligeiramente superior aos valores obtidos em TEM para estas AuNPs, o que corrobora a presença da metaloporfirina na superfície da nanopartícula. Verificou-se também a presença de agregados de maiores dimensões (figura 4.15b) o que é consistente com a informação recolhida pelos espectros de UV-visível (figura 4.3a) da suspensão coloidal das AuNPs funcionalizadas. Estes resultados indicam que provavelmente a formação de agregados foi causada pelas interações π entre os anéis porfirinóides que estão ligados às nanopartículas e/ou pela presença do CS₂, permitindo que cada átomo de enxofre se ligue a uma nanopartícula distinta.

No caso das nanopartículas de Fe₃O₄ modificadas com CoP e FeP (figura 4.15c, d, respetivamente), o tamanho médio das NPs imobilizadas é próximo ao obtido para as Fe₃O₄NPs não modificadas (≈ 40 nm). Como observado nas imagens de TEM das nanopartículas de magnetite, estas NPs não são monodispersas como as AuNPs, especialmente as de tamanho maior.

Os diâmetros teoricamente esperados para as NPs modificadas, considerando que provavelmente estarão ligadas 2 porfirinas horizontalmente em cada NP, será de, aproximadamente, 22.5 e 42.5 nm (≈ 1.25 nm por macrocilo, determinado recorrendo ao programa ACD/ChemSketch) para as NPs de 20 e 40 nm, respetivamente, corroborando os tamanhos médios estimados por AFM.

Assim, o método de preparação dos eléctrodos com estas NPs, poderá favorecer a adsorção de NPs mais pequenas, justificando o não aparecimento nas imagens de AFM de NPs maiores. Os tamanhos médios estimados para as Fe₃O₄NPs refletem uma menor agregação entre estas NPs do que a observada nas AuNPs, provavelmente devido à maior afinidade entre os grupos COOH e as nanopartículas de óxidos metálicos [28], justificando a obtenção de uma banda de Soret estreita nos espectros de UV-visível exibidos nas figuras 4.3 b, c e 4.4.

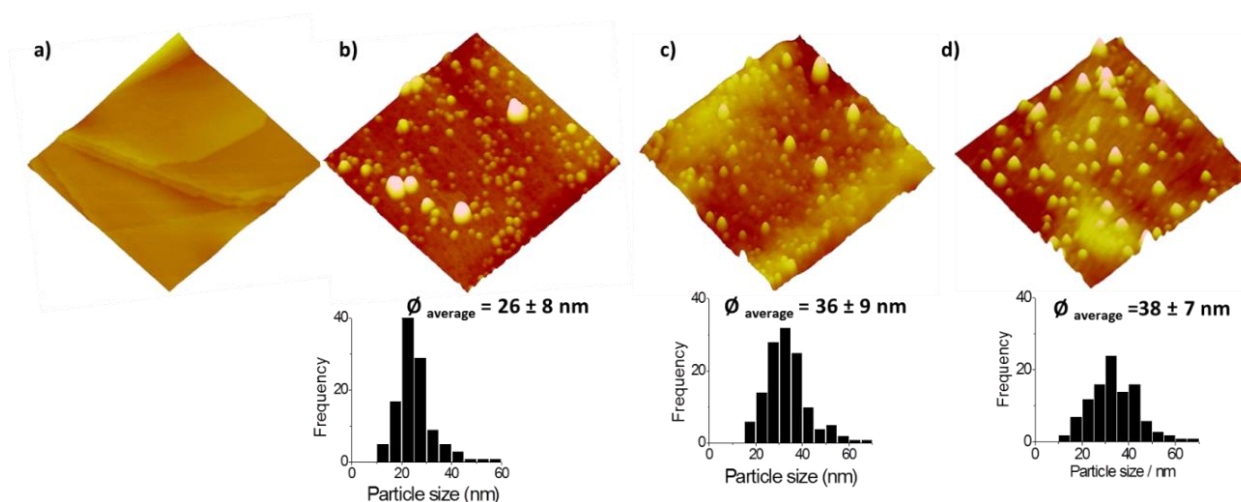


Figura 4.15 – Imagens obtidas por AFM ($750 \times 750 \text{ nm}^2$) a) do eléttodo de Au(111) sem modificação, ($z = 25 \text{ nm}$) e dos eléttodos modificados ($z = 20 \text{ nm}$), b) CS_2 /AuNPs (20 nm)/CoP, c) CS_2 /Fe₃O₄NPs (40 nm)/CoP e d) CS_2 / Fe₃O₄NPs (40 nm)/FeP.

4.4 ImobilizaçãO de nanopartículas: dissulfureto de carbono *versus* 1,6-hexanoditiol

Com o objetivo de reforçar a importância do CS_2 como um ligante eficaz para a imobilizar nanopartículas em superfícies de ouro, num só passo, confrontou-se o desempenho das superfícies modificadas com o CS_2 , AuNPs, CoP com o obtido com a superfície modificada com uma SAM de 1,6-hexanoditiol previamente formada em Au (111), com posterior ligação das AuNPs modificadas com a CoP.

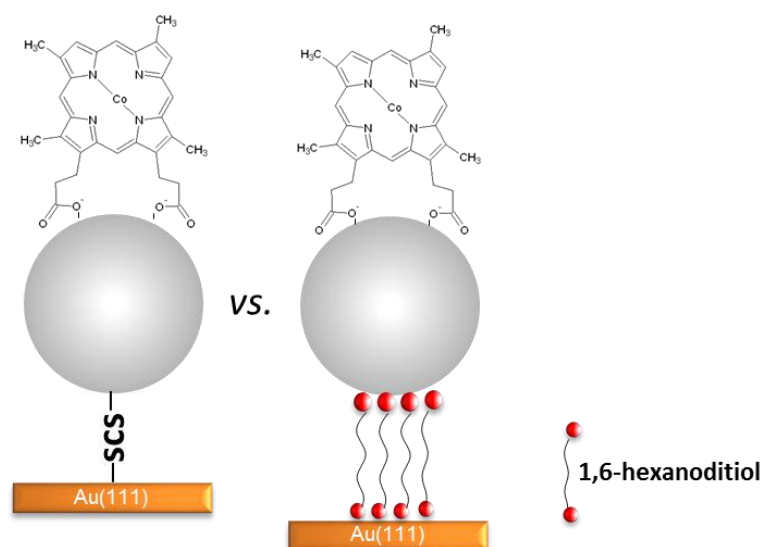


Figura 4.16 – Esquema ilustrativo das estruturas formadas após a modificação do eletrodo com AuNPs funcionalizadas com porfirina de Co ligadas via CS₂ ou 1,6-hexanoditiol.

A SAM de 1,6-hexanoditiol foi formada durante 15 min e, de seguida este eletrodo modificado foi imerso numa solução contendo AuNPs (ou PtNPs) e metaloporfirina (CoP ou derivado da vitamina B₁₂). Foi selecionado um período de adsorção curto pois não se pretendia ter uma monocamada muito compacta que pudesse comprometer a deteção da reação de redução de oxigénio.

A figura 4.17a exibe o comportamento eletroquímico de ambas as superfícies modificadas (CS₂/AuNPs/CoP e hexanoditiol (15 min)/AuNPs/CoP), preparadas em meio orgânico. Observou-se um desvio positivo de potencial em ~ 100 mV para o eletrodo preparado com CS₂ relativamente ao preparado com o 1,6-hexanoditiol. Esta resposta catalítica a potenciais de redução mais positivos poderá estar relacionada com a distância que existe entre as nanoprtculas funcionalizadas e a superfície de ouro, constatando-se que uma ligação mais curta, como a do CS₂, favorece nitidamente a ORR. A monocamada formada de CS₂/AuNPs/CoP não deverá ser tão compacta como a formada pelo 1,6-hexanoditiol, pois devido à espontaneidade da reação é de esperar que algumas moléculas de CS₂ estejam adsorvidas no eletrodo de ouro sem estarem ligadas às nanoprtculas funcionalizadas, como foi também proposto no capítulo 3.

Deste modo, estas moléculas deverão criar um espaçamento entre os centros catalíticos adsorvidos às NPs facilitando a transferência eletrônica com o eléctrodo.

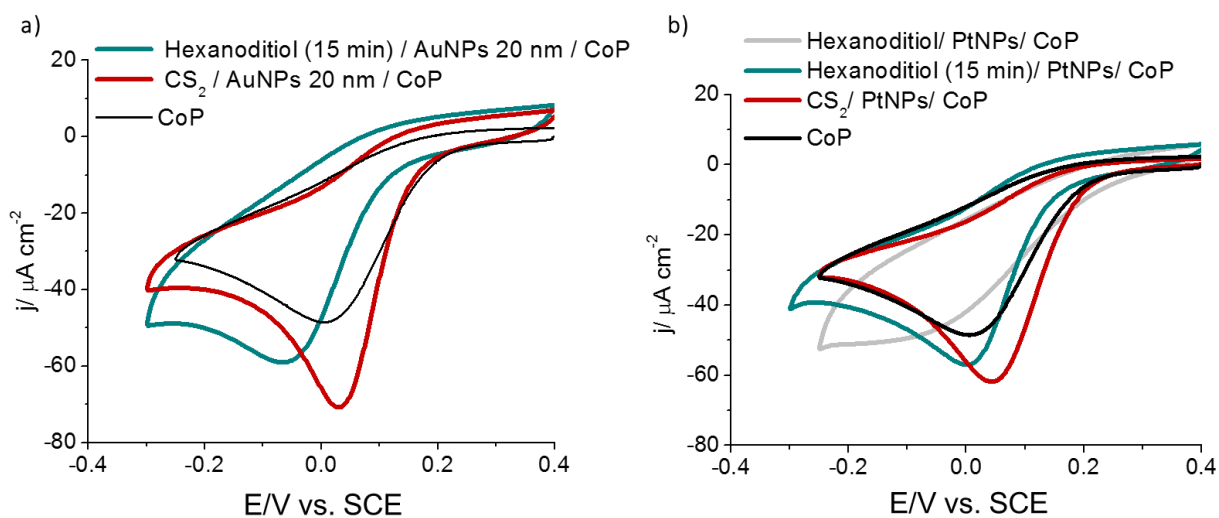


Figura 4.17 - Voltamogramas cíclicos obtidos em soluções de 0.1 M H_2SO_4 (arejadas), a $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$, do Au(111) modificado com porfirina de Co (CoP), a) hexanoditiol (15 min)/PtNPs (16 h), hexanoditiol (15 min)/PtNPs e CS_2 /PtNPs/CoP (16 h) b) CS_2 / AuNPs (20 nm)/CoP e hexanoditiol / AuNPs (20 nm)/CoP.

Na figura 4.17b são mostrados os voltamogramas cíclicos obtidos para as superfícies modificadas com nanopartículas de Pt com tamanhos médios de 3 nm e CoP. Foi realizada também uma comparação mais direta entre o desempenho catalítico das superfícies modificadas com CS_2 e 1,6-hexanoditiol, uma vez que para além da SAM do ditiol durante 15 min, foi também estudada a reação, num só passo, entre ditiol, PtNPs e CoP durante 16h. Através dos resultados obtidos, foi possível verificar que o melhor comportamento catalítico foi obtido para a superfície modificada com CS_2 /PtNPs/CoP, constando-se que a formação de uma monocamada de alcanoditiol muito compacta (16 h de adsorção) origina uma inibição da resposta catalítica para a ORR, comparativamente ao resultado obtido com apenas 15 min de adsorção.

A aplicabilidade desta metodologia foi ainda estendida a outro composto organometálico, um derivado da vitamina B₁₂ (B₁₂C₁₀S-SC₁₀) (figura 4.18).

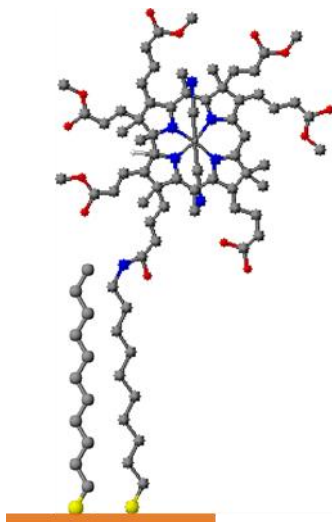


Figura 4.18 – Estrutura em 3D da B₁₂C₁₀S-SC₁₀ adsorvida na superfície de ouro.

Este composto foi especialmente sintetizado assimétrico, com um dissulfureto contendo duas cadeias com 10 átomos de carbono, em que apenas uma delas está ligada a um centro catalítico de vitamina B₁₂. O intuito foi construir SAMs mais organizadas onde as macromoléculas tivessem algum espaçamento entre si, e deste modo desempenhar a sua atividade catalítica para a ORR. Através dos voltamogramas cíclicos exibidos na figura 4.19a é possível verificar que a resposta catalítica foi significativamente melhorada na presença das PtNPs, observando-se um aumento da densidade de corrente e principalmente um desvio bastante positivo (~ 200 mV) no E_p^{red} relativamente ao eléctrodo modificado com uma SAM de B₁₂C₁₀S-SC₁₀ imobilizada diretamente à superfície de ouro. Uma possível explicação para este comportamento será o menor empacotamento molecular que ocorre à superfície das nanoprtculas de Pt de pequena dimensão, face ao obtido numa SAM em ouro plano, podendo neste último caso haver uma obstrução à redução do oxigénio à superfície do eléctrodo. Foi também utilizada a SAM de 1,6-hexanoditiol (formada em 15 min).

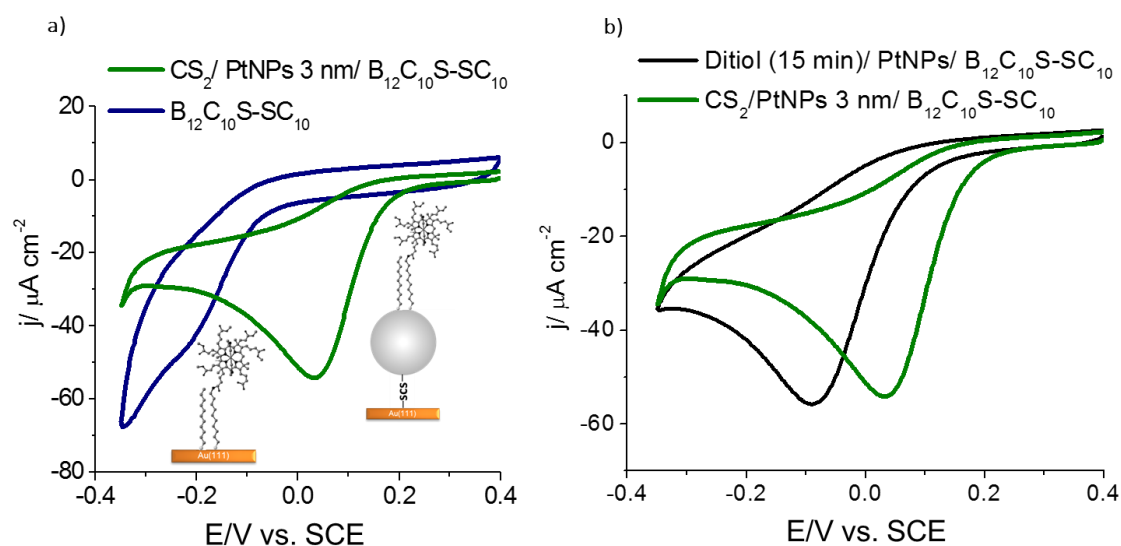


Figura 4.19 - Voltamogramas cíclicos obtidos em soluções de 0.1 M H_2SO_4 (arejadas), a $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ do Au(111) modificado com a) um derivado da vitamina B_{12} ($\text{B}_{12}\text{C}_{10}\text{S-SC}_{10}$), na presença de PtNPs e CS_2 ; b) com uma SAM de ditiol (formada em 15 minutos), PtNPs e $\text{B}_{12}\text{C}_{10}\text{S-SC}_{10}$, e o Au (111)/ $\text{CS}_2/\text{PtNPs}/\text{B}_{12}\text{C}_{10}\text{S-SC}_{10}$.

Comparou-se ainda o desempenho catalítico dos eléctrodos modificado com CS_2 ou com uma SAM de 1,6-hexanoditiol (formada em 15 min). Na figura 4.19b, observa-se que a ORR é mais facilitada para a superfície modificada com CS_2 do que para o eléctrodo modificado com uma SAM de ditiol; no primeiro caso E_p^{red} é detetado a 0.04 V, 50 mV mais positivo que o observado para a superfície com ditiol (-0.09 V). Com estes resultados fica demonstrada a eficácia da metodologia e a importância do CS_2 neste tipo de estudos, constatando-se que quanto menor for a distância entre os centros catalíticos e o eléctrodo, mais facilitada será a transferência eletrónica e consequentemente melhor o desempenho catalítico.

4.5 Eletrocatalise de nanoprtculas de MnFe_2O_4 em meio bsico

Foi tambm testada a reao de reduo do O_2 em meio bsico, utilizando a mesma metodologia de modificao. Estudou-se o desempenho cataltico das superfcies modificadas com CoP, CS_2 e nanoprtculas de MnFe_2O_4 , em NaOH (0.1 M).

Na figura 4.20 est representada uma imagem de TEM (figura 4.20a) das nanoprtculas de MnFe_2O_4 , que foram sintetizadas segundo um procedimento semelhante as Fe_3O_4 e de acordo com o reportado [47] exibindo uma grande disperso de tamanhos. O tamanho mdio observado para as NPs est prximo dos 20 nm. O difratograma obtido (figura 4.20b) est de acordo com o esperado e reportado para uma amostra de MnFe_2O_4 , indicando que os picos observados no difratograma so atribudos a estrutura do tipo espinela [47].

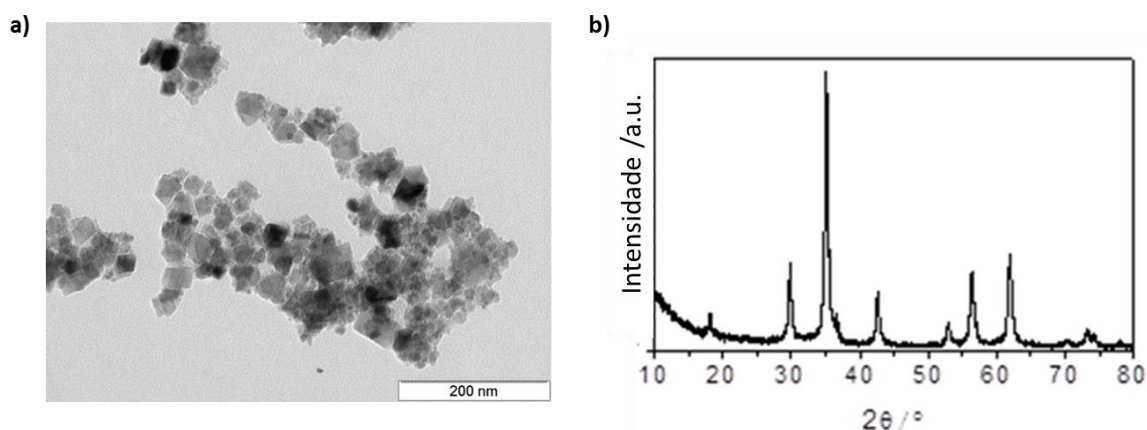


Figura 4.20 – Imagem de TEM e difratograma de raios-X das nanoprtculas de MnFe_2O_4 obtidas por precipitao, seguida de tratamento hidrotérmico (em autoclave) de 6 horas a 150°C .

Os eléttodos modificados com $\text{CS}_2/\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{NPs}$ exibem uma resposta cataltica para a ORR a -0.33 V , potencial este que est desviado para valores mais positivos ($E_p^{\text{red}} \approx -0.24\text{ V}$), aps a adsorao da CoP nas $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{NPs}$. Esta resposta cataltica do eléttodo modificado com as MnFe_2O_4 funcionalizadas como CoP est tambm superior a obtida no eléttodo modificado apenas com CoP ($E_p^{\text{red}} \approx -0.27\text{ V}$). Os resultados obtidos pelos eléttodos modificados com este tipo de nanoprtculas esto prximos aos reportados

por H. Zhu e colaboradores [19] com as MnFe_2O_4 NPs depositadas em suportes de carbono.

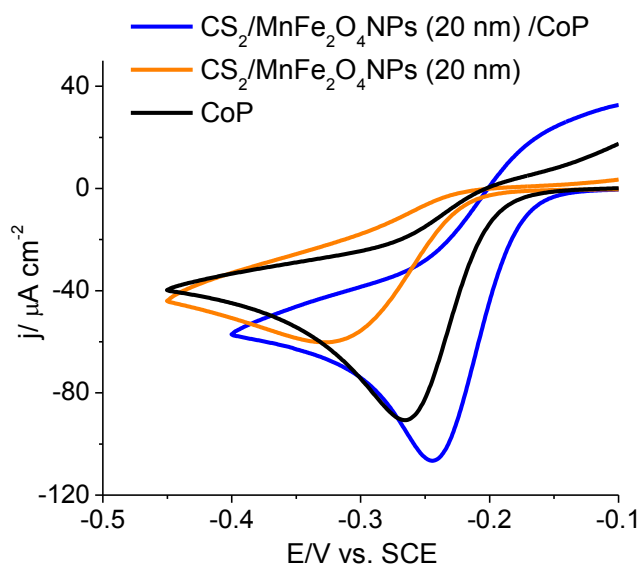


Figura 4.21 - Voltamogramas cíclicos obtidos em soluções de 0.1 M NaOH (arejadas), a $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$, do Au(111) modificado com porfirina de Co (CoP), $\text{CS}_2/\text{MnFe}_2\text{O}_4$ NPs (20 nm) e $\text{CS}_2/\text{MnFe}_2\text{O}_4$ NPs (20 nm)/CoP.

Utilizando o mesmo procedimento, para calcular o número de eletrões transferido na ORR, descrito na secção 2.4.3 do capítulo 2 (eq. 3 e 4), o número de eletrões estimado é de aproximadamente 2 para ambas as superfícies nanoestruturadas na presença e ausência de CoP ($\text{CS}_2/\text{MnFe}_2\text{O}_4$ e $\text{CS}_2/\text{MnFe}_2\text{O}_4/\text{CoP}$), expectável para a reacção de redução do O_2 em meio básico (secção 1.3). Estes valores são semelhantes aos observados para eléctrodos modificados com a CoP.

Com estes resultados fica demonstrado, que a combinação deste tipo de nanopartículas de óxidos metálicos com metaloporfirinas, nitidamente melhora o desempenho eletrocatalítico do sistema, comparativamente às interfaces preparadas apenas com a porfirina adsorvida diretamente na superfície de ouro. O efeito sinérgico existente entre as NPs e os derivados porfirinóide de cobalto facilita claramente a reacção de redução do oxigénio.

Os resultados demonstraram que as nanopartículas de óxido de metálicos, tipo magnetite, podem ser consideradas como uma boa alternativa nos materiais de cátodo para a reacção de redução de oxigénio, comparativamente ao uso de metais nobres,

tanto em condições ácidas ou básicas. O revestimento criado nas NPs pela metaloporfirina e CS₂ garante a estabilidade das mesmas. A metodologia de um só passo usando o CS₂ revela-se, mais uma vez, como um método estável para ligar nanoconjugados catalíticos a superfícies de ouro, mantendo ou melhorando as suas propriedades.

4.6 Referências bibliográficas

- [1] M. Verónica Rivas, L.P. Méndez De Leo, M. Hamer, R. Carballo, F.J. Williams, Self-Assembled Monolayers of Disulfide Cu Porphyrins on Au Surfaces: Adsorption Induced Reduction and Demetalation, *Langmuir*, American Chemical Society, 2011, pp. 10714-10721.
- [2] M. Huang, Y. Shao, X. Sun, H. Chen, B. Liu, S. Dong, Alternate Assemblies of Platinum Nanoparticles and Metalloporphyrins as Tunable Electrocatalysts for Dioxygen Reduction, *Langmuir*, 21 (2005) 323-329.
- [3] X. Lu, F. Zhi, H. Shang, X. Wang, Z. Xue, Investigation of the electrochemical behavior of multilayers film assembled porphyrin/gold nanoparticles on gold electrode, *Electrochimica Acta*, 55 (2010) 3634-3642.
- [4] W. Wang, Y. Hu, C. Wang, X. Lu, Comparative electrochemical investigations on series of SH-terminated-functional porphyrins, *Electrochimica Acta*, 65 (2012) 244-250.
- [5] X. Gong, T. Milic, C. Xu, J.D. Batteas, C.M. Drain, Preparation and Characterization of Porphyrin Nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*, American Chemical Society, 2002, pp. 14290-14291.
- [6] J.H. Zagal, S. Griveau, J.F. Silva, T. Nyokong, F. Bedioui, Enhancement of the Catalytic Activity of Fe Phthalocyanine for the Reduction of O₂ Anchored to Au(111) via Conjugated Self-Assembled Monolayers of Aromatic Thiols As Compared to Cu Phthalocyanine, *Coord. Chem. Rev.*, 254 (2010) 2755.
- [7] H. Imahori, H. Norieda, Y. Nishimura, I. Yamazaki, K. Higuchi, N. Kato, T. Motohiro, H. Yamada, K. Tamaki, M. Arimura, Y. Sakata, Chain Length Effect on the Structure and Photoelectrochemical Properties of Self-Assembled Monolayers of Porphyrins on Gold Electrodes, *The Journal of Physical Chemistry B*, American Chemical Society, 2000, pp. 1253-1260.
- [8] R. Martin-Trasanco, R. Cao, F.-P. Montforts, Self-assembly of a Ru(II)-deuteroporphyrin lipoic acid derivative on Au(111) surfaces, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 19 (2015) 1014-1020.
- [9] A.S. Viana, S. Leupold, F.P. Montforts, L.M. Abrantes, Self-assembled monolayers of a disulphide-derivatised cobalt-porphyrin on gold, *Electrochimica Acta*, 50 (2005) 2807-2813.
- [10] C.S. Eberle, A.S. Viana, F.P. Montforts, L.M. Abrantes, Synthesis and self-assembly of a novel cobalt(II) porphyrin lipoic acid derivative on gold, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, World Scientific Publishing Co., 2010, pp. 101-107.

- [11] J.F. Cabrita, A.S. Viana, F.P. Montforts, L.M. Abrantes, Mixed self-assembled monolayers of Co-porphyrin and n-alkane phosphonates on gold, *Surface Science*, 605 (2011) 1412-1419.
- [12] J.F. Cabrita, A.S. Viana, A. Mourato, F.P. Montforts, L.M. Abrantes, Self-assembled monolayers of metalloporphyrin phosphonates on electrochemically modified HOPG, *Catalysis Today, Structure-Performance Relationships in Catalytic Materials (COST Action D36)*, 2012, pp. 70-76.
- [13] M.A. Carvalho de Medeiros, S. Cosnier, A. Deronzier, J.C. Moutet, Synthesis and Characterization of a New Series of Nickel(II) meso-Tetrakis (polyfluorophenyl)porphyrins Functionalized by Pyrrole Groups and Their Electropolymerized Films, *Inorganic Chemistry*, American Chemical Society, 1996, pp. 2659-2664.
- [14] D.L. Pilloud, X. Chen, P.L. Dutton, C.C. Moser, Electrochemistry of Self-Assembled Monolayers of Iron Protoporphyrin IX Attached to Modified Gold Electrodes through Thioether Linkage, *The Journal of Physical Chemistry B*, American Chemical Society, 2000, pp. 2868-2877.
- [15] Z.G. Estephan, L. Alawieh, L.I. Halaoui, Oxygen Reduction at Nanostructured Electrodes Assembled from Polyacrylate-Capped Pt Nanoparticles in Polyelectrolyte, *The Journal of Physical Chemistry C*, American Chemical Society, 2007, pp. 8060-8068.
- [16] Y. Tang, W. Cheng, Nanoparticle-Modified Electrode with Size- and Shape-Dependent Electrocatalytic Activities, *Langmuir*, American Chemical Society, 2013, pp. 3125-3132.
- [17] V.C. Ferreira, A.I. Melato, A.F. Silva, L.M. Abrantes, Attachment of noble metal nanoparticles to conducting polymers containing sulphur-preparation conditions for enhanced electrocatalytic activity, *Electrochimica Acta, Electrochemistry Of Electroactive Materials*, 2011, pp. 3567-3574.
- [18] F.H.B. Lima, W.H. Lizcano-Valbuena, E. Teixeira-Neto, F.C. Nart, E.R. Gonzalez, E.A. Ticianelli, Pt-Co/C nanoparticles as electrocatalysts for oxygen reduction in H₂SO₄ and H₂SO₄/CH₃OH electrolytes, *Electrochimica Acta*, 52 (2006) 385-393.
- [19] H. Zhu, S. Zhang, Y.-X. Huang, L. Wu, S. Sun, Monodisperse MxFe_{3-x}O₄ (M = Fe, Cu, Co, Mn) Nanoparticles and Their Electrocatalysis for Oxygen Reduction Reaction, *Nano Letters*, 13 (2013) 2947-2951.
- [20] N. Alexeyeva, T. Laaksonen, K. Kontturi, F. Mirkhalaf, D.J. Schiffrin, K. Tammeveski, Oxygen reduction on gold nanoparticle/multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrodes in acid solution, *Electrochemistry Communications*, 8 (2006) 1475-1480.
- [21] G.C. Bond, Gold: A relatively new catalyst, *Gold Bulletin*, 34 (2001) 117-140.
- [22] T. Schilling, M. Bron, Oxygen reduction at Fe-N-modified multi-walled carbon nanotubes in acidic electrolyte, *Electrochimica Acta*, 53 (2008) 5379-5385.
- [23] M.S. El Deab, T. Ohsaka, An extraordinary electrocatalytic reduction of oxygen on gold nanoparticles-electrodeposited gold electrodes, *Electrochemistry Communications*, 4 (2002) 288-292.
- [24] P.R. Solanki, A. Kaushik, V.V. Agrawal, B.D. Malhotra, Nanostructured metal oxide-based biosensors, *Npg Asia Materials*, 3 (2011) 17-24.
- [25] W. Wu, Q. He, C. Jiang, Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies, *Nanoscale Research Letters*, 3 (2008) 397 - 415.

- [26] Wang Wang, J. Luo, Q. Fan, M. Suzuki, I.S. Suzuki, M.H. Engelhard, Y. Lin, N. Kim, J.Q. Wang, C.-J. Zhong, Monodispersed Core-Shell Fe₃O₄@Au Nanoparticles, *The Journal of Physical Chemistry B*, 109 (2005) 21593-21601.
- [27] R.-P. Liang, G.-H. Yao, L.-X. Fan, J.-D. Qiu, Magnetic Fe₃O₄@Au composite-enhanced surface plasmon resonance for ultrasensitive detection of magnetic nanoparticle-enriched α -fetoprotein, *Analytica Chimica Acta*, 737 (2012) 22-28.
- [28] P. Taheri, T. Hauffman, J.M.C. Mol, J.R. Flores, F. Hannour, J.H.W. de Wit, H. Terryn, Molecular Interactions of Electroadsorbed Carboxylic Acid and Succinic Anhydride Monomers on Zinc Surfaces, *The Journal of Physical Chemistry C*, 115 (2011) 17054-17067.
- [29] W.-k. Paik, S. Han, W. Shin, Y. Kim, Adsorption of Carboxylic Acids on Gold by Anodic Reaction, *Langmuir*, 19 (2003) 4211-4216.
- [30] J.S. Salazar, L. Perez, O. de Abril, P. Lai Truong, D. Ihiwakrim, M. Vazquez, J.-M. Greneche, S. Begin-Colin, G. Pourroy, Magnetic Iron Oxide Nanoparticles in 10-40 nm Range: Composition in Terms of Magnetite/Maghemite Ratio and Effect on the Magnetic Properties, *Chemistry of Materials*, 23 (2011) 1379-1386.
- [31] M.D. Carvalho, F. Henriques, L.P. Ferreira, M. Godinho, M.M. Cruz, Iron oxide nanoparticles: the Influence of synthesis method and size on composition and magnetic properties, *Journal of Solid State Chemistry*, 201 (2013) 144-152.
- [32] K.M. Smith, *Porphyrins and Metalloporphyrins*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1975.
- [33] B. J.-M., G. R., C. E.-V., T. A., K. K.M., *The Porphyrin Handbook - Inorganic, Organometallic and Coordination Chemistry*, Academic Press 1999.
- [34] J.-W. Park, J.S. Shumaker-Parry, Strong Resistance of Citrate Anions on Metal Nanoparticles to Desorption under Thiol Functionalization, *ACS Nano*, 9 (2015) 1665-1682.
- [35] Q. He, G. Wu, K. Liu, S. Khene, Q. Li, T. Mugadza, E. Deunf, T. Nyokong, S.W. Chen, Effects of Redox Mediators on the Catalytic Activity of Iron Porphyrins towards Oxygen Reduction in Acidic Media, *ChemElectroChem*, 1 (2014) 1508-1515.
- [36] Q.G. He, T. Mugadza, G. Hwang, T. Nyokong, Mechanisms of Electrocatalysis of Oxygen Reduction by Metal Porphyrins in Trifluoromethane Sulfonic Acid Solution, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 7 (2012) 7045-7064.
- [37] C.M. Cordas, A.S. Viana, S. Leupold, F.P. Montforts, L.M. Abrantes, Self-assembled monolayer of an iron(III) porphyrin disulphide derivative on gold, *Electrochemistry Communications*, 5 (2003) 36-41.
- [38] I. Ponce, J.F. Silva, R. Oñate, M.C. Rezende, M.A. Paez, J.H. Zagal, J. Pavez, F. Mendizabal, S. Miranda-Rojas, A. Muñoz-Castro, R. Arratia-Pérez, Enhancement of the Catalytic Activity of Fe Phthalocyanine for the Reduction of O₂ Anchored to Au(111) via Conjugated Self-Assembled Monolayers of Aromatic Thiols As Compared to Cu Phthalocyanine, *The Journal of Physical Chemistry C*, 116 (2012) 15329-15341.
- [39] J. Chlistunoff, J.-M. Sansiñena, Effects of Axial Coordination of the Metal Center on the Activity of Iron Tetraphenylporphyrin as a Nonprecious Catalyst for Oxygen Reduction, *The Journal of Physical Chemistry C*, 118 (2014) 19139-19149.
- [40] B. A.J., F. L.R., *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, 2nd ed., Wiley, New York, 2001.

- [41] W. Zhang, A.U. Shaikh, E.Y. Tsui, T.M. Swager, Cobalt Porphyrin Functionalized Carbon Nanotubes for Oxygen Reduction, *Chemistry of Materials*, 21 (2009) 3234-3241.
- [42] K.M. Kadish, L. Fremond, Z.P. Ou, J.G. Shao, C.N. Shi, F.C. Anson, F. Burdet, C.P. Gros, J.M. Barbe, R. Guilard, Cobalt(III) corroles as electrocatalysts for the reduction of dioxygen: Reactivity of a monocorrole, biscalcoroles, and porphyrin-corrole dyads, *Journal of the American Chemical Society*, 127 (2005) 5625-5631.
- [43] A. Morozan, S. Campidelli, A. Filoramo, B. Jousset, S. Palacin, Catalytic activity of cobalt and iron phthalocyanines or porphyrins supported on different carbon nanotubes towards oxygen reduction reaction, *Carbon*, 49 (2011) 4839-4847.
- [44] C. Kang, Y. Xie, F.C. Anson, Catalytic pathways for the electroreduction of O₂ at graphite electrodes on which a macrocyclic cobalt complex is adsorbed, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 413 (1996) 165-174.
- [45] H.Y. Liu, I. Abdalmuhdi, C.K. Chang, F.C. Anson, Catalysis of the electroreduction of dioxygen and hydrogen peroxide by an anthracene-linked dimeric cobalt porphyrin, *The Journal of Physical Chemistry*, 89 (1985) 665-670.
- [46] R.R. Durand, C.S. Bencosme, J.P. Collman, F.C. Anson, Mechanistic aspects of the catalytic reduction of dioxygen by cofacial metalloporphyrins, *Journal of the American Chemical Society*, 105 (1983) 2710-2718.
- [47] S.G. Mendo, A.F. Alves, L.P. Ferreira, M.M. Cruz, M.H. Mendonca, M. Godinho, M.D. Carvalho, Hyperthermia studies of ferrite synthesized in the presence of nanoparticles cotton, *New Journal of Chemistry*, 39 (2015) 7182-7193.

Capítulo 5

Desenvolvimento de plataformas para Imunossensores

Parte do trabalho apresentado neste capítulo é objeto do seguinte artigo:

- I. Almeida, J.T. Marquês, W. Liu, Y. Niu, R.F.M. de Almeida, G. Jin, A.S. Viana, “Phospholipid/cholesterol/decanethiol mixtures for direct assembly of immunosensing interfaces”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 136 (2015) 997–1003

Os biossensores são dispositivos analíticos que podem ser utilizados para determinar alterações bioquímicas e fisiológicas no ser humano, tornando-se desta forma essencial o desenvolvimento de plataformas estáveis e sensíveis. Os imunossensores usam moléculas ligantes (anticorpos) para formar uma superfície de detecção e detetam compostos-alvo (antigénios), obedecendo às interações biológicas específicas. Como a preparação da superfície do imunossensor tem um papel crucial no seu desempenho, é fundamental desenvolver plataformas que sejam simples, eficazes e estáveis para serem usadas como interfaces de bioreconhecimento [1, 2].

Como mencionado na introdução desta tese, a adsorção não específica juntamente com uma apropriada orientação e distribuição do bioreceptor na superfície são dois dos fatores mais importantes na obtenção de um melhor desempenho de um imunossensor. A formação de monocamadas auto-montadas (SAMs) de alcanotióis em ouro é uma das estratégias de modificação de superfícies mais populares empregues na área dos imunossensores [3-5]. Se os grupos terminais da SAM forem grupos carboxílicos ou grupos amina, estes podem ser usados para imobilizar covalentemente biomoléculas após um processo de ativação usando o N-hidroxisuccinimida (NHS) e o N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) [6, 7]. Contudo, a formação de ditiocarbamatos neste tipo de superfícies, foi apresentada como alternativa às SAMs de derivados de tióis na preparação de plataformas para imunossensores [2], tendo em conta que a formação dos DTC permite a ligação da biomolécula num só passo, sem a necessidade do uso de agentes de acoplamento.

O trabalho apresentado neste capítulo encontra-se dividido em duas partes: i) modificação de superfícies de ouro com base na reação CS_2 , proteína A, na presença de AuNPs (figura 5.1); ii) desenvolvimento de uma nova interface baseada na deposição direta de lipossomas contendo fosfolípidos e um derivado de um alcanotiol (figura 5.14).

Para efeitos comparativos foram também realizados ensaios com a interface CS_2 /proteína A. A Imunoglobulina G (IgG) humana, policlonal, foi usada como o anticorpo que vai ser imobilizado para reconhecer/detetar especificamente o seu antigénio (anti-IgG produzido em cabra, policlonal (*Heavy (H) + Light (L), whole molecule*)). A proteína A contém vários domínios de ligação ao IgG e interage

especificamente com a porção Fc do IgG, expondo a sua porção Fab bioactiva para reconhecer o Anti-IgG [8]. É comumente empregue para uma imobilização orientada de IgG e será também utilizada na primeira parte do trabalho.

Foram empregues várias técnicas de caracterização durante a execução do trabalho: a elipsometria convencional, foi utilizada para medir os parâmetros elipsométricos das superfícies modificadas e estimar a espessura de filmes formados após cada passo de modificação na preparação da biointerface, incluindo a reação entre anticorpo/antígeno; a microscopia de força atómica (AFM), permitiu a visualização direta das superfícies modificadas após o processo de modificação e após a ligação dos anticorpos; a elipsometria ótica de imagem (IE) e em modo de reflexão interna total (TIRIE), bem como a ressonância de plasmão de superfície (SPR), foram selecionadas para efetuar os ensaios de bioreconhecimento, avaliando o desempenho das plataformas imunossensoras preparadas.

5.1 Biofuncionalização de superfícies nanoestruturadas de ouro com CS₂ e Proteína A

A metodologia utilizada na modificação de superfície de ouro com base na reação entre o CS₂, a proteína A e as AuNPs é ilustrada no esquema da figura 5.1. Devido à espontaneidade desta reação e considerando o que foi anteriormente apresentado e discutido no capítulo 3, é possível prever que se possam adsorver várias estruturas na superfície de ouro, moléculas de CS₂ que não reagiram com os grupos amina, estruturas de CS₂/proteína A e de CS₂/AuNPs/proteína A.

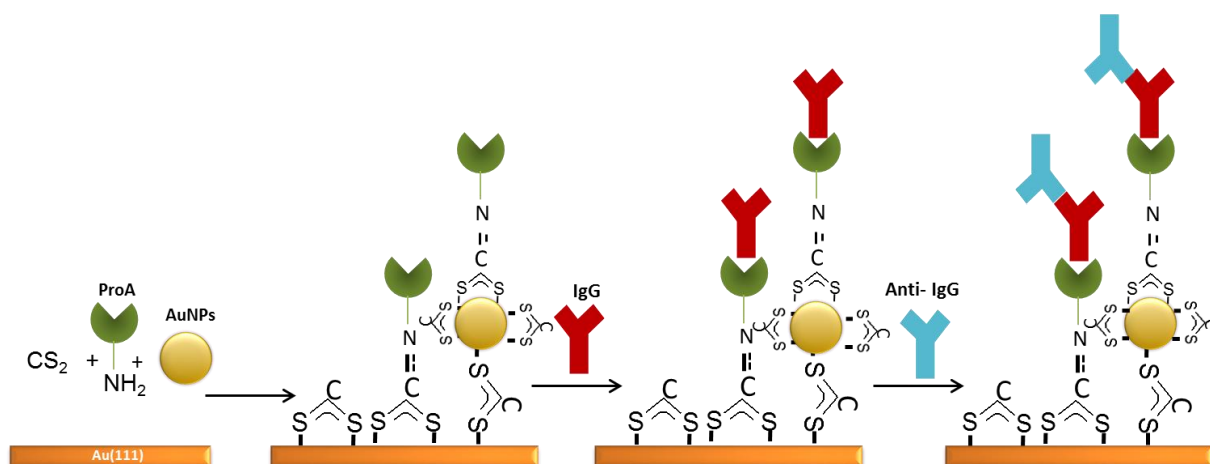


Figura 5.1 – Esquema ilustrativo da metodologia usada na modificação de superfícies de ouro através da reação entre CS₂, proteína A e AuNPs, para detetar fenómenos de reconhecimento biológico (anticorpo-antigénio).

A caracterização da morfologia das superfícies modificadas com CS₂/AuNPs/proteína A e CS₂/proteína A, realizada por AFM, permitiu confirmar o sucesso dos vários passos de modificação da superfície de ouro. Na figura 5.2 observou-se que ambas as superfícies estão cobertas após a reação de modificação com CS₂ e proteína A, na presença e ausência de NPs. Na superfície que contém nanopartículas visualizam-se estruturas globulares de maiores dimensões (30-36 nm), atribuídas à presença das AuNPs (~ 20 nm de diâmetro) funcionalizadas com proteína A. No elétrodo modificado pelo CS₂ /proteína A, detetou-se também a presença de estruturas esféricas de menores dimensões (~ 20 nm) atribuídas à proteína A ligada ao CS₂. É ainda de assinalar que, estes glóbulos com dimensões na ordem dos 20 nm (tendo em conta os efeitos da convulsão da ponta utilizadas nas imagens de AFM, que podem ampliar ligeiramente o diâmetro do enzima [9], atribuídos à proteína A, também são visíveis em muitas zonas da imagem do elétrodo modificado com NPs. Estes deverão corresponder a existência de CS₂/proteína A que se adsorveram diretamente ao ouro plano, consequência da espontaneidade da metodologia empregue, como é ilustrado no esquema da figura 5.1.

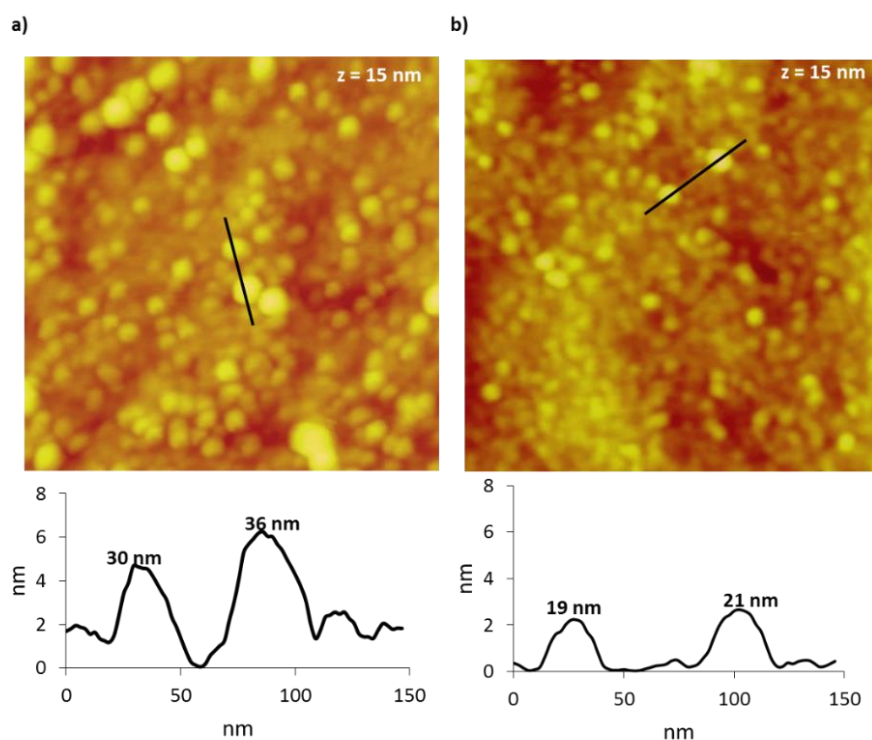


Figura 5.2 – Imagens de AFM ($500 \times 500 \text{ nm}^2$) e correspondente perfil topográfico das superfícies modificadas com a) $\text{CS}_2/\text{AuNPs}/\text{proteína A}$ e b) $\text{CS}_2/\text{proteína A}$.

O desempenho das plataformas $\text{CS}_2/\text{AuNPs}/\text{proteína A}$ e $\text{CS}_2/\text{proteína A}$ para a detecção da reação de bioreconhecimento IgG /Anti-IgG foi avaliado por elipsometria convencional, IE, SPR e TIRIE. Para este efeito foi necessário atestar a capacidade destas interfaces em inibir as interações não-específicas que possam ocorrer na superfície, e para tal foi utilizado um tampão com um agente bloqueador (*Blocking Buffer*, BB) à base de caseína. Foi ainda usado, durante os ensaios de SPR e TIRIE, 0.05% de um surfactante Tween-20 (PBST) no tampão fosfato [10], de forma a reduzir também a adsorção física de proteínas.

Na figura 5.3 são apresentados resultados de SPR obtidos para as superfícies funcionalizadas com CS_2 (Figura 5.3a) e $\text{CS}_2/\text{proteína A}$ (figura 5.3b). Na superfície modificada com CS_2 , após se injetar a solução com Anti-IgG (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e a respetiva lavagem do canal da célula de SPR, não se observou a ligação à biomolécula à superfície pois os valores de RU após a lavagem com PBST diminuíram até ao valor inicial ($\sim 0 \text{ RU}$). É de notar que o aumento do sinal de SPR observado após a chegada do IgG à célula reacional, e que decresce após lavagem com PBST, é apenas devido à

alteração do índice de refração das soluções (PBST e solução com o IgG). De seguida foi injetada a solução de BB, observando-se um enorme aumento do sinal ótico, e logo de seguida uma diminuição abrupta destes valores, devido à lavagem com PBST. Como se constata, os valores não retornaram imediatamente ao valor inicial, no entanto, e mesmo depois de ter sido testada também a interação do IgG (100 µg/mL), o sinal de SPR vai-se aproximando de 0 com o decorrer do tempo, indicando que esta interface inibe as interações não específicas, um dos requisitos mais importantes na preparação de imunossensores. Já na superfície modificada com CS₂ e proteína A observou-se um aumento da resposta de SPR após a interação do IgG (181 RU) e do anti-IgG (282 RU), estimando-se uma razão Anti-IgG/IgG de 1.6 (tabela 5.1).

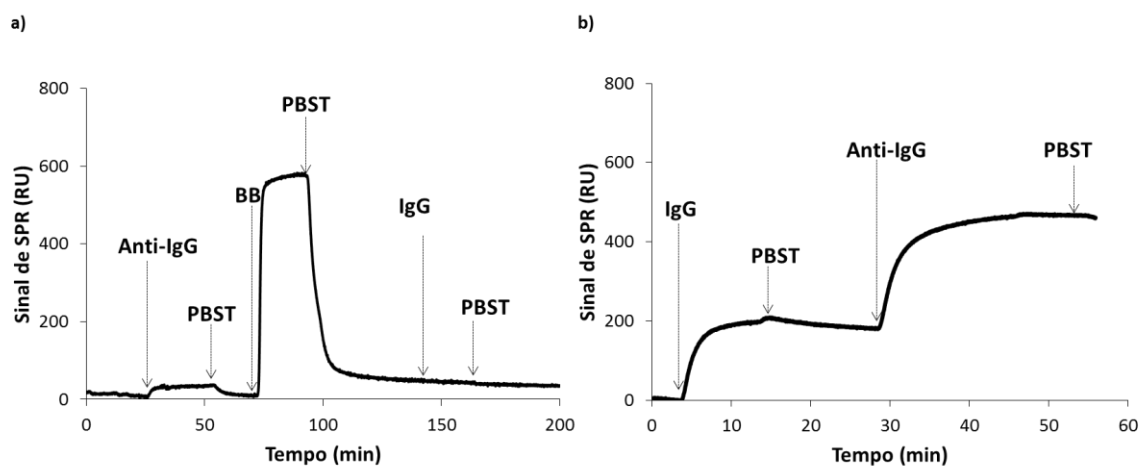


Figura 5.3 – Sinal de SPR registado em tempo-real da interação da IgG (ou anti-IgG) no eletrodo modificado com a) CS₂ e b) CS₂/proteína A. Na superfície modificada apenas com CS₂, foi também testada a adsorção não-específica desta interface utilizando o BB.

Tabela 5.1 - Valores da variação do sinal de SPR (figura 5.3 e 5.4) em unidades relativas (Δ RU) obtidos para as superfícies modificadas e após a ligação do IgG e do Anti-IgG. A razão entre os valores de RU do Anti-IgG e da IgG é também apresentada.

Superfícies modificadas	Δ RU		
	IgG	Anti-IgG	Anti-IgG/IgG
CS ₂	-	-	-
CS ₂ /proteína A	181	282	1.6
CS ₂ /AuNPs/proteína A	201	429	2.1
AuNPs/proteína A	371	279	0.8

Na presença de AuNPs (figura 5.4), observou-se um significativo aumento no valor da intensidade do sinal de SPR quando o IgG interage com a superfície modificada CS₂/AuNPs/proteína A, indicando que se ligaram mais moléculas de IgG à proteína A, quando comparado ao eletrodo modificado com apenas CS₂/proteína A, pois, mesmo após a lavagem com PBST, não se registou qualquer alteração de sinal, indicando que a variação de sinal observada é devido à ligação forte do IgG à proteína A. Consequentemente, a quantidade de moléculas de Anti-IgG que conseguiu reagir com a superfície também foi superior, comparativamente à interface CS₂/proteína A, determinando-se uma razão Anti-IgG/IgG de ~ 2 (tabela 5.1). Este resultado indica que nesta configuração de superfície, com nanopartículas 1 IgG conseguiu detetar 2 moléculas de Anti-IgG.

Em contrapartida, no resultado exibido na figura 5.4b, foi possível observar que na superfície modificada com AuNPs/proteína A, na ausência portanto de CS₂, após a interação do IgG, o sinal aumentou 371 RU, enquanto, que com a ligação do Anti-IgG apenas sofreu um aumento de 279 RU (razão Anti-IgG/IgG = 0.8, tabela 5.1). Este resultado indica que poderá ter ocorrido alguma adsorção não-específica do IgG na superfície das AuNPs e/ou na superfície de ouro (figura 5.5) causando uma diminuição na eficiência de deteção específica do Anti-IgG.

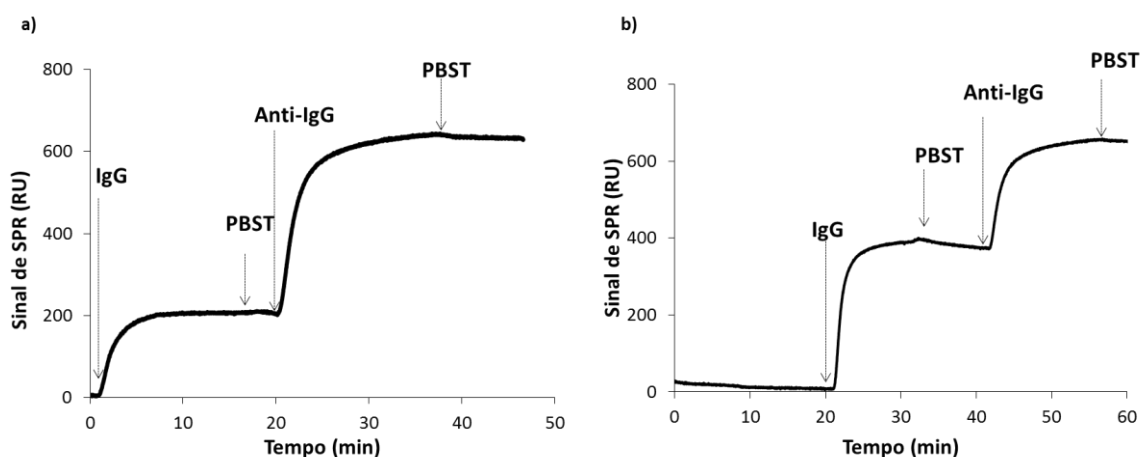


Figura 5.4 – Sinal de SPR adquirido em tempo-real da interação do IgG e do Anti-IgG nos elétrodos modificados com proteína A e AuNPs, na a) presença e b) ausência de CS₂.

Com estes resultados fica demonstrado que o papel do CS₂ neste tipo de metodologias é fundamental, tanto na prevenção de interações não-específicas nas AuNPs como na superfície de ouro plana, como também em criar espaçamento entre as estruturas de CS₂/proteína A para uma adsorção de moléculas de IgG mais orientada e capaz de ser sensível à detecção do Anti-IgG (figura 5.5).

Os esquemas representados na figura 5.5 foram propostos para demonstrar as possíveis estruturas/adsorbatos que poderão ser formados por esta metodologia de um só passo, na ausência (figura 5.5a) e presença de CS₂ (figura 5.5b) e as prováveis ligações específicas e não-específicas que poderão ocorrer na superfície das AuNPs.

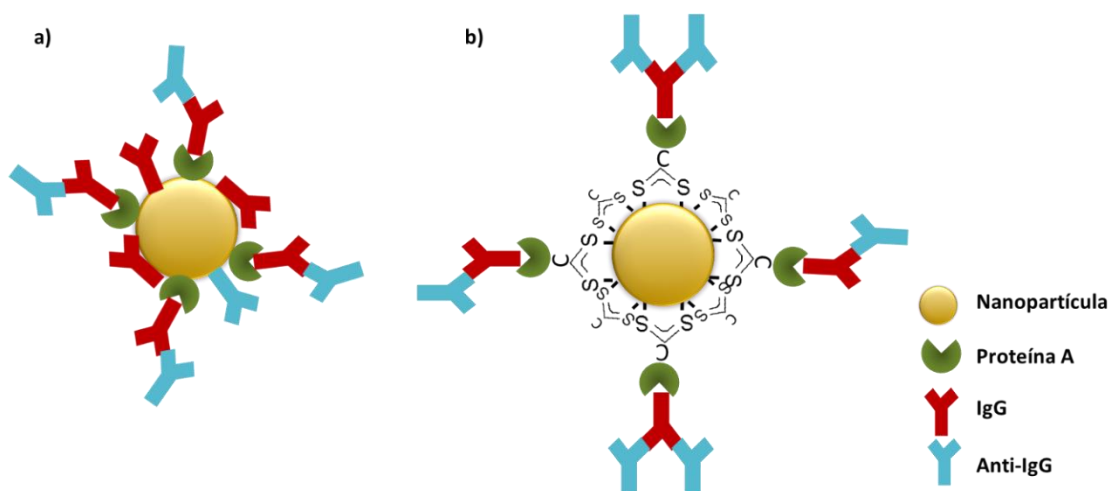


Figura 5.5 – Estruturas ilustrativas do tipo de ligações que podem ocorrer entre as AuNPs, proteína A, IgG e o Anti-IgG na a) ausência e b) presença de CS₂.

Foram também efetuadas medições elipsométricas para determinar os parâmetros elipsométricos (Ψ, Δ) e posteriormente determinar a espessura dos filmes (d_f) formados após a reação de modificação com CS_2 , proteína A com e sem AuNPs e após a ligação dos anticorpos (IgG e posteriormente Anti-IgG). Os resultados obtidos por esta técnica são apresentados na tabela 5.2. Inicialmente foram medidos os parâmetros Ψ, Δ do substrato, que permitem analiticamente determinar as propriedades dielétricas do substrato limpo (n_s, k_s). Após a modificação do eletrodo, foram medidos novamente o Ψ e o Δ correspondentes ao novo sistema formado sobre o substrato cujas propriedades óticas intrínsecas foram lá determinadas. Considerando que este sistema pode ser descrito pelo modelo de três camadas homogêneas (substrato-filme-meio ambiente) e assumindo um valor para a componente real do índice de refração dos filmes de 1.5 (reportado para um filme de proteína depositado num substrato metálico)[11], como mencionado na seção 2.4.4 do capítulo 2, foi possível estimar valores aproximados de espessuras após cada passo.

No eletrodo modificado com CS_2 e proteína A, a espessura ótica estimada é de 1.47 nm, enquanto no eletrodo modificado por CS_2 , Proteína A e AuNPs é de 3.75 nm (tabela 5.2), assumindo o mesmo índice de refração para os dois filmes. Esta opção (n_f fixo independentemente da natureza do filme) é suportada pela evolução do valor do coeficiente de extinção determinado à medida que a complexidade da camada aumenta. Com efeito, na ausência de nanopartículas de ouro, os filmes formados de natureza puramente orgânica revelam-se muito pouco absorvedores ($0.03 < k < 0.13$). Com a incorporação de nanopartículas de ouro (sistema CS_2 /AuNPs/Proteína A) o valor de k aumenta, fruto da forte absorção por parte das NPs. No entanto, após interação com a IgG e posteriormente com a Anti-IgG os valores do coeficiente de extinção diminuem, o que revela que as propriedades óticas do filme são, na sua globalidade, basicamente determinadas pela natureza da componente orgânica da camada, validando assim a escolha de um valor de n fixo determinado para filmes de semelhante natureza.

Através dos valores de espessura dos filmes formados foi estimada uma razão Anti-IgG/IgG de 1.7 e 1.9 para as superfícies CS_2 /proteína A e CS_2 /AuNPs/proteína A, respetivamente, coerentes com os determinados por SPR (tabela 5.1).

Tabela 5.2 - Valores de Ψ e Δ medidos a $\phi = 70^\circ$ ($\lambda = 632.8$ nm) e espessuras óticas dos filmes (d_f) e de coeficientes de extinção (k) obtidos para as superfícies modificadas com CS_2 /proteína A e CS_2 /AuNPs/proteína A. O valor da variação da espessura (Δd_f) foi determinado após a interação da IgG e após a interação com o Anti-IgG para cada superfície.

Superfícies	$\Psi / ^\circ$	$\Delta / ^\circ$	d_f / nm	$\Delta d_f / \text{nm}$	k
Au *	43.76 ± 0.03	109.51 ± 0.13	-	-	
CS_2 / proteína A *	43.61 ± 0.01	107.58 ± 0.04	1.77 ± 0.07	-	0.145 ± 0.007
CS_2 / proteína A / IgG *	43.63 ± 0.01	105.68 ± 0.02	3.63 ± 0.09	1.86	0.076 ± 0.003
CS_2 / proteína A / IgG / anti-IgG *	43.66 ± 0.01	102.42 ± 0.07	6.92 ± 0.25	3.29	0.047 ± 0.004
Au	43.69 ± 0.02	109.13 ± 0.23	-	-	
CS_2 /AuNPs/ proteína A	43.06 ± 0.20	106.55 ± 0.39	3.75 ± 0.15	-	0.351 ± 0.007
CS_2 /AuNPs/ proteína A/ IgG	43.40 ± 0.04	103.69 ± 0.23	6.71 ± 0.07	2.96	0.122 ± 0.001
CS_2 /AuNPs/proteína A/IgG/ anti-IgG	43.46 ± 0.05	98.55 ± 0.05	12.32 ± 0.07	5.61	0.081 ± 0.001

*[2].

Uma das razões pela qual as AuNPs foram introduzidas na reação de modificação dos substratos de ouro baseia-se no fenómeno de ressonância de plasmão de superfície, característico destes nanomateriais, que poderá conduzir ao aumento da resposta SPR. Nos ensaios de elipsometria convencional e de SPR, o comprimento de onda da luz incidente usado foi de 632.8 nm e entre 630-670 nm, respetivamente. No entanto, para excitar o plasmão de superfície das AuNPs, (em particular, as de tamanho médio de 20 nm), o comprimento de onda deverá ser próximo de 520 nm [12]. Logo, e como se pode observar pelos valores de Ψ e Δ obtidos num elipsómetro espectroscópico (elipsómetro VASE criado por J.A. Woollam Co. (Lincoln, Nebraska), para as superfícies de Au/ CS_2 /AuNPs (figura 5.6a) e Au (figura 5.6b) apresentados na figura 5.6 (registados a vários ângulos de incidência), não existe variação significativa destes parâmetros elipsométricos, nos valores de comprimento de onda utilizados nas duas técnicas óticas, indicando que possivelmente este facto não influenciou os resultados obtidos. A diferença mais significativa entre as duas superfícies é o valor de Ψ que é inferior na superfície modificada com NPs. Este comportamento corrobora os dados de elipsometria convencional apresentadas na tabela 5.2. Após a imobilização

das NPs deu-se um decréscimo acentuado do valor de Ψ , comprovando assim a sua presença nos elétrodos modificados. Assim verifica-se que a vantagem de ter nanopartículas de ouro na superfície deverá decorrer principalmente da maior área superficial.

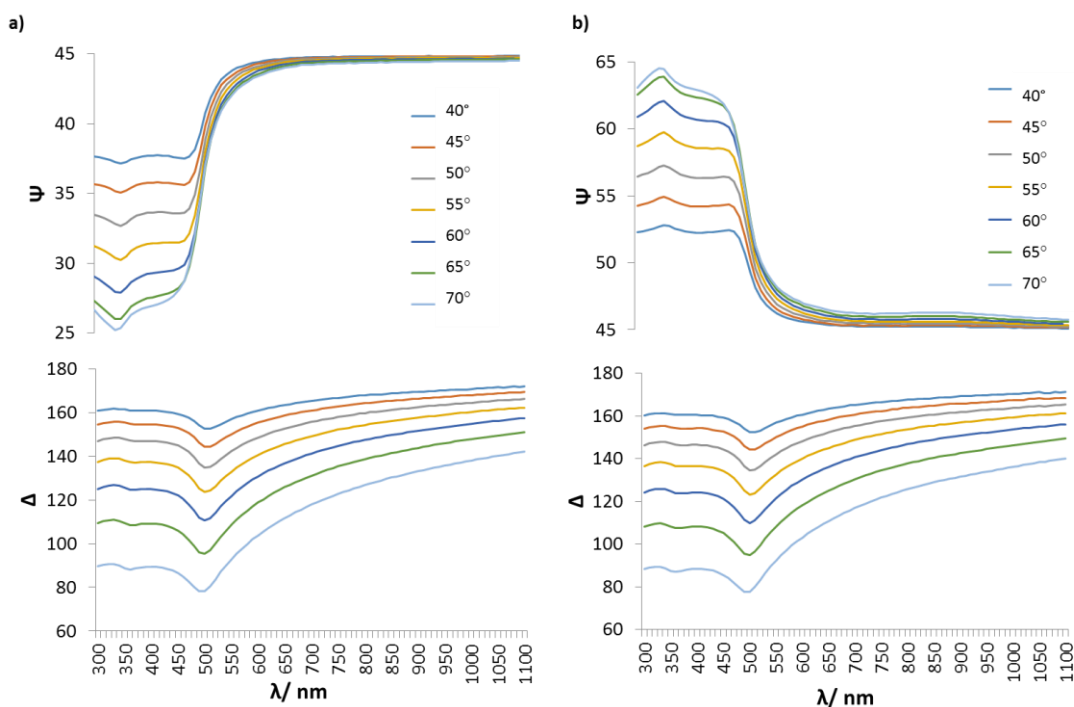


Figura 5.6 – Valores de Ψ e Δ medidos por elipsometria a vários ângulos de incidência para as superfícies a) Au/CS₂/AuNPs e b) Au.

Foram realizados ensaios de SPR para estudar a sensibilidade da interface CS₂/AuNPs/proteína A após a interação do IgG para detetar o Anti-IgG a concentrações inferiores a 100 $\mu\text{g/mL}$ (660 nM). O sinal de SPR obtido é apresentado na figura 5.7, onde é possível constatar que a partir da concentração de 6.6 nM (1 $\mu\text{g/mL}$) o imunossensor já responde, ou seja, as moléculas de IgG imobilizadas reconhecem especificamente algumas moléculas de Anti-IgG. Após a adição de uma solução mais concentrada de IgG (66 nM, 10 $\mu\text{g/mL}$), o sinal aumenta abruptamente (cinética da reação é rápida) ($\Delta\text{RU} = 462$), relativamente ao sinal após a interação do IgG ($\Delta\text{RU} = 180$).

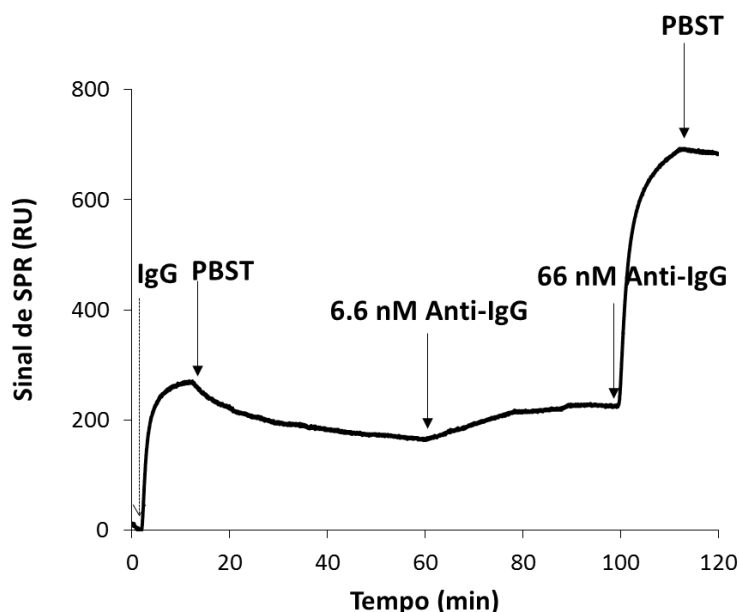


Figura 5.7 – Sinal de SPR adquirido em tempo-real da interação do IgG (660 nM) e do Anti-IgG a diferentes concentrações (6.6-66 nM), na superfície modificada com AuNPs, CS₂, proteína A.

Neste trabalho foram ainda realizados estudos de IE e de TIRIE em dois equipamentos desenvolvidos no Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences em Beijing, de forma a complementar os estudos de SPR e elipsometria convencional. Estas técnicas óticas são bastante poderosas para estudos de filmes orgânicos finos transparentes, pouco absorvedores, pois por serem muito sensíveis à intensidade da luz, analisam cada ponto da superfície com uma elevada resolução axial, expressa numa escala de cinzentos (*Grayscale*).

Na figura 5.8 são mostrados os resultados obtidos por elipsometria de imagem da superfície de ouro funcionalizada com CS₂/AuNPs/proteína A, e após a interação do IgG e do Anti-IgG. Verificou-se que após cada passo de modificação, há uma variação da escala, a superfície vai adquirindo uma cor cinzento mais claro, indicando um aumento de espessura correspondente à imobilização das biomoléculas, G. Jin e seus colaboradores [13] reportaram alguns dos primeiros estudos realizados pela mesma técnica ótica sobre a imobilização de proteínas em superfícies de sílica, descrevendo

que, a intensidade detetada (I) e a espessura do filme (d_f) se relacionam segundo a seguinte equação (eq. 15),

$$I = k \times d_f^2 \text{ (eq. 15)}$$

sendo o k uma constante [14].

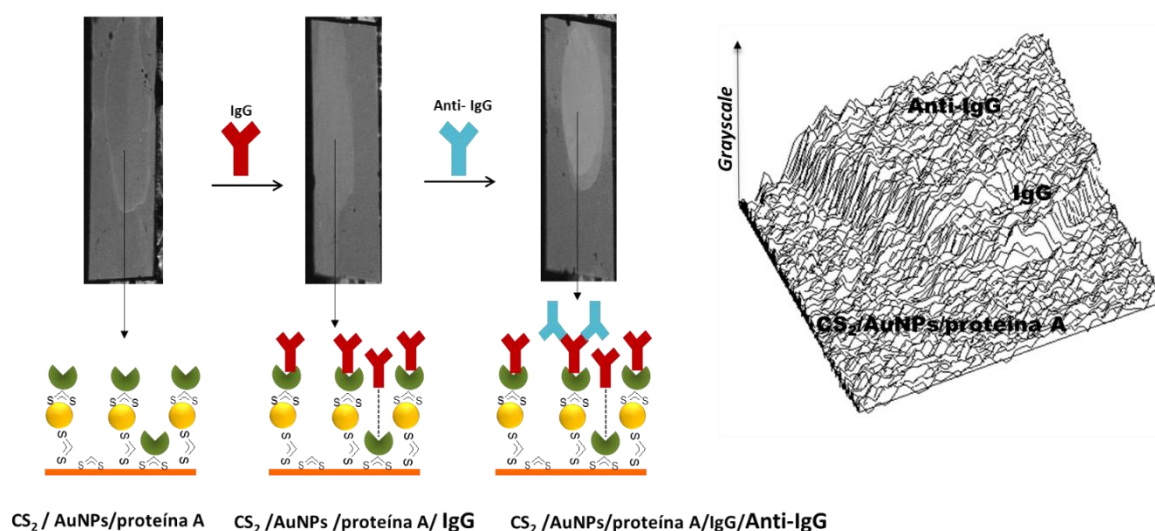


Figura 5.8 – Imagens (2D e 3D) obtidas por elipsometria de imagem para as superfícies modificadas com CS_2 /AuNPs/proteína A, e após a incubação com IgG e Anti-IgG.

Deste modo, a espessura dos filmes caracterizados por esta técnica não é diretamente proporcional à intensidade (*grayscale*) obtida em cada imagem. Contudo, as diferenças entre os valores de *grayscale* medidos nas superfícies modificadas (tabela 5.3) permitem comparar os valores obtidos após a ligação do IgG e do Anti-IgG, estimando-se uma razão Anti-IgG/IgG de 2.6, valor este ligeiramente superior ao determinado através dos resultados de SPR para a mesma superfície (2.1) mas próximo do esperado se considerarmos uma proporção Anti-IgG:IgG de 2:1, na reação de bioreconhecimento.

Tabela 5.3 – Valores de *grayscale* e razão Anti-IgG/IgG obtidos a partir das imagens mostradas na figura 5.9

Superfícies	Grayscale	Δ Grayscale	Anti-IgG/IgG
Au	48.11	-	-
CS ₂ / AuNPs/proteína A	50.31	2.20	
CS ₂ / Protein A / AuNPs/ IgG	55.80	5.49	2.6
CS ₂ / Protein A / AuNPs/ IgG / Anti-IgG	70.21	14.41	

Através dos ensaios de TIRIE pretendeu-se avaliar o desempenho em tempo-real (inibição das interações não-específicas e a reação de bioreconhecimento) da interface Au/CS₂/AuNPs/Proteína A. Esta técnica permite estudar várias reações ao mesmo tempo, em diferentes canais, utilizando a mesma superfície de ouro, pois o sistema microfluidico possui um conjunto de 24 células reacionais.

Na figura 5.9a são apresentadas as curvas de TIRIE adquiridas em tempo-real para a superfície modificada com CS₂, proteína A e AuNPs, após a interação do IgG e do Anti- IgG. Inicialmente, para avaliar a inibição das interações não especificas nesta superfície modificada, foi adicionado BB no sistema microfluídico. Este é removido quase na totalidade, ficando apenas algumas moléculas de caseína adsorvidas fisicamente ou inespecificamente ao Au modificado. É de salientar que o ouro usado nestes ensaios de TIRIE é mais rugoso que o usado nas experiências de SPR (rugosidade (rms) Au_{TIRIE} = 2.69 nm; Au_{SPR} = 1.32 nm), o que poderá facilitar a adsorção não-específicas de algumas moléculas do BB neste tipo de superfícies, caso a cobertura de CS₂ não seja tão uniforme. Após a interação do IgG verificou-se um aumento significativo do sinal ótico, devido à mudança do índice de refração das soluções, contudo após lavagem da superfície com PBST, ainda se registou uma diferença de valores na *grayscale* (Δ *grayscale*) de 2680, que deverá ser atribuído à ligação específica

do IgG às moléculas de proteína A. Para comprovar que, após a incubação do IgG, já não existem locais disponíveis para ligações não-específicas, foi injetado novamente BB, observando-se que este é totalmente removido. A diferença obtida para o sinal ótico após a ligação do Anti-IgG foi 8480, verificando-se também que estas moléculas se encontram ligadas fortemente ao IgG. É de notar que a capacidade de bioreconhecimento do Anti-IgG é um bom indicador da bioatividade de IgG e da sensibilidade da biointerface para reconhecer fenómenos de bioespecificidade.

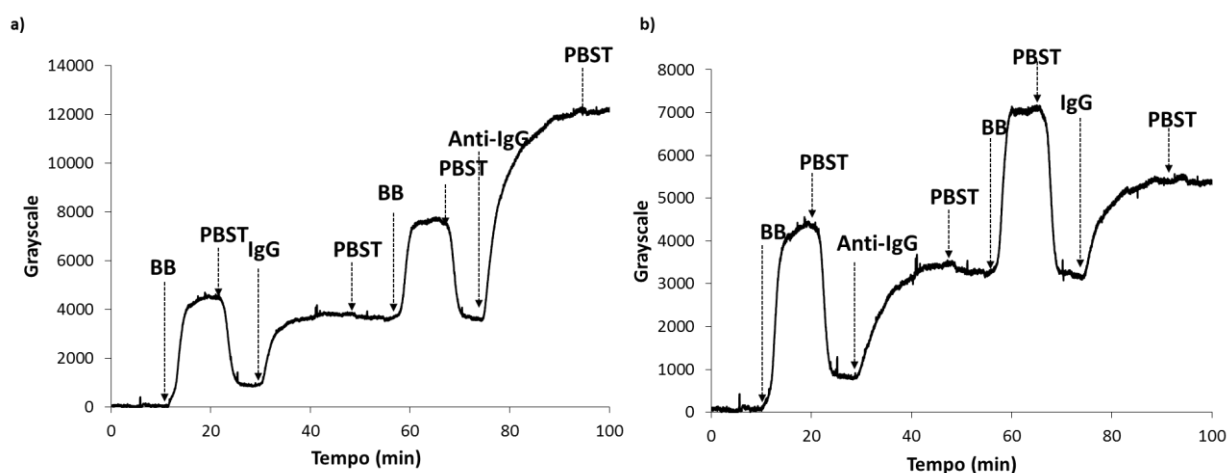


Figura 5.9 - Curvas de TIRIE adquiridas em tempo-real da interação de a) IgG e Anti-IgG e b) Anti-IgG e IgG, na superfície modificada com CS₂/AuNPs/proteína A.

Para confirmar que as moléculas de Anti-IgG se ligam ao IgG especificamente e não à proteína A foi efetuado um ensaio de TIRIE, usando a mesma superfície modificada (CS₂/AuNPs/proteína A) fazendo reagir primeiro o Anti-IgG e só depois o IgG (figura 5.9b). Observou-se que existem diferenças nos valores de $\Delta grayscale$, pois foram obtidos menores valores para a interação do Anti-IgG e maiores para o IgG. Na tabela 5.4 são apresentadas as razões entre as *grayscale* do Anti-IgG/IgG, tendo sido estimados valores de 3 e 0.7 para a superfície modificada com CS₂/AuNPs/proteína A, após a interação do IgG ou do Anti-IgG à proteína A, respetivamente.

Tabela 5.4 - Valores estimados da variação do *grayscale* obtidos para a superfície modificada com CS₂, AuNPs e proteína A, após a interação do IgG e Anti-IgG, e vice-versa, e a razão entre os valores de *grayscale* do Anti-IgG e da IgG.

Superfície de Au	$\Delta Grayscale$			
	<i>BB</i>	<i>IgG</i>	<i>Anti-IgG</i>	<i>Razão</i>
CS ₂ / Protein A /AuNPs	880	2680	8480	3.1
		<i>Anti-IgG</i>	<i>IgG</i>	
CS ₂ / Protein A / AuNPs	800	2104	3270	0.7

Os resultados obtidos por elipsometria convencional, SPR, TIRIE, elipsometria de imagem, TIRIE, são consistentes entre si, demonstrando que a metodologia de um só passo, envolvendo a reação entre o CS₂, Proteína A, na presença de AuNPs, é viável para imobilizar anticorpos de forma orientada, de forma a detetar especificamente o respetivo antigénio. O IgG é policlonal mas o seu fragmento Fc tem afinidade para a proteína A, facilitando uma imobilização orientada na superfície modificada [8]. Considerando que nestes ensaios se utilizou um Anti-IgG policlonal (Heavy+Light), isto é, pode reagir tanto com porções do fragmento Fc mais pesado (H) como com o mais leve (L, F(ab')₂/Fab) dos IgGs imobilizados, pode-se assumir que 2 Anti-IgG's se liguem a 1 IgG imobilizado possivelmente pelos fragmentos Fab's, pois o Fc estará ligado à proteína A.

É de realçar que espontaneidade da reação entre CS₂, AuNPs, proteína A origina também a adsorção de moléculas de CS₂ e CS₂/proteína A (figura 5.1) que são fundamentais na inibição da adsorção não-específica de proteínas.

Utilizando a metodologia de uma só passo de modificação de superfícies de ouro com CS₂ e proteína A e aproveitando as potencialidades da técnica de TIRIE foram ainda realizados alguns ensaios preliminares envolvendo a funcionalização de nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ com o Anti-IgG (reação entre a solução de Anti-IgG (10 µg/mL) e a solução de Fe₃O₄NPs (1 mg/mL), durante 2h em solução de tampão

fosfato), como ilustrado no esquema da figura 5.10, com o intuito de aumentar o sinal óptico correspondente à reação de bioreconhecimento. Este tipo de nanopartículas magnéticas tem sido utilizado para a imobilização de biomoléculas, como referido no capítulo 3 (seção 3.2), devido às suas características particulares, tais como, excelente biocompatibilidade e propriedades magnéticas e claro elevada área superficial [15].

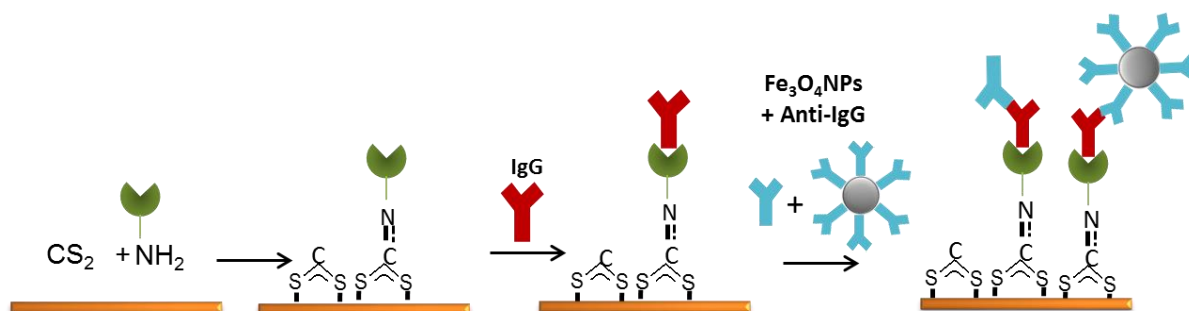


Figura 5.10 – Esquema ilustrativo da metodologia usada na modificação de superfícies de ouro através da reação do CS₂, proteína A para ligação do anticorpo (IgG) e de nanopartículas de Fe₃O₄ funcionalizadas com Anti-IgG.

Na figura 5.11 é possível observar as curvas obtidas por TIRIE da superfície modificada com CS₂/proteína A, observando que após a injeção do BB e lavagem com o PBST, os valores de *grayscale* não retomaram o valor inicial, indicando que deverão ter-se ligado algumas moléculas de caseína à superfície do ouro, demonstrando, mais uma vez, que estas superfícies poderão favorecer alguma adsorção de proteínas, ligadas não-especificamente. Contudo, verificou-se que após a ligação do IgG (100 µg/mL) obtiveram-se valores de *grayscale*, esperados para uma imobilização específica de IgG na proteína A. No passo seguinte foram injetadas três soluções diferentes em três células distintas no sistema microfluídico: solução de Anti-IgG (10 µg/mL) + Fe₃O₄NPs (célula a); solução de Anti-IgG (10 µg/mL) (célula b); solução de PBST com Fe₃O₄NPs (célula c). Observou-se que após a introdução da solução contendo apenas nanopartículas de magnetite não se registou qualquer alteração do sinal de *grayscale* (~ 0), ao contrário do observado após a interação do IgG com as soluções contendo o antigénio, Anti-IgG ($\Delta grayscale = 5890$) e Anti-IgG+Fe₃O₄NPs ($\Delta grayscale = 7911$) (tabela 5.5).

Apesar de ser visível que o sinal de *grayscale* entre o IgG e Anti-IgG ainda não teria estabilizado este aumento é atribuído à ligação do Anti-IgG ao IgG, constatando-se que apesar da razão entre Anti-IgG/IgG ser semelhante nos dois canais, a cinética da reação é mais rápida na presença de nanopartículas de Fe₃O₄+Anti-IgG, relativamente à observada para a solução contendo apenas Anti-IgG. Estes resultados levam a que seja necessário explorar outras metodologias de modificação deste tipo de NPs para aumentar a sensibilidade da plataforma na detecção de anticorpos.

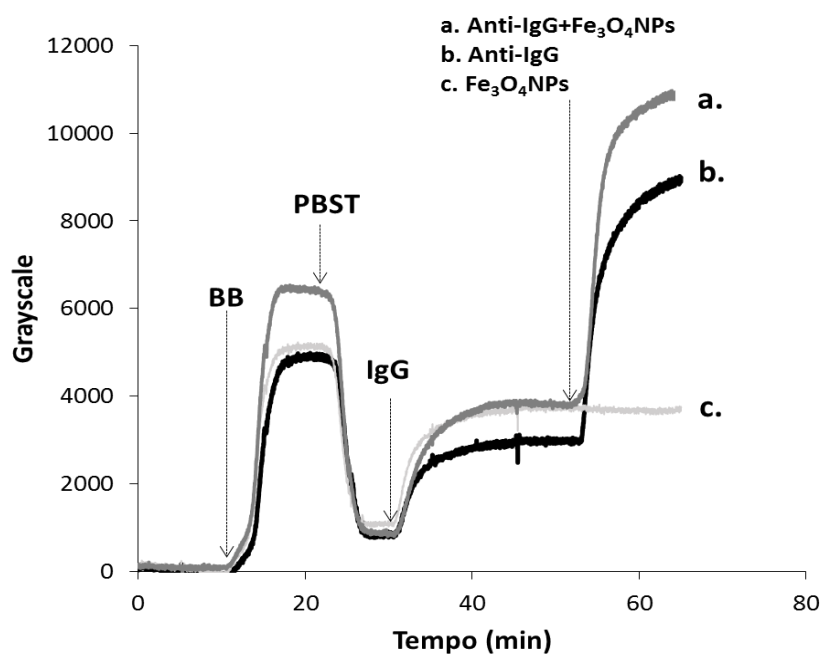


Figura 5.11 – Curvas de TIRIE adquiridas em tempo-real da interação do IgG e das soluções de Anti-IgG+Fe₃O₄NPs (a), Anti-IgG (b) e Fe₃O₄NPs (c), na superfície modificada com CS₂/proteína A.

Tabela 5.5 - Valores estimados da variação do *grayscale* obtidos para a superfície modificada com CS₂/proteína A, após a interação do BB, IgG e das soluções de Anti-IgG/Fe₃O₄NPs (a), Anti-IgG (b) e Fe₃O₄NPs (c).

CS ₂ /proteína A	BB	IgG	ΔGrayscale
			a. Anti-IgG +NPs b. Anti-IgG c. NPs
Canal a.	800	2870	7911
Canal b.	800	2113	5890
Canal c.	900	2739	0

Com o objetivo de preparar plataformas imunossensoras biologicamente mais favoráveis, tem-se recorrido à utilização de sistemas modelo de biomembranas (por exemplo, bicamadas lipídicas) para funcionalizar superfícies de ouro, criando interfaces ativamente disponíveis e adequadas para o acoplamento de anticorpos.

De seguida são explorados dois procedimentos de modificação de superfícies de ouro com base na formação de bicamadas lipídicas suportadas.

5.2 Bicamadas lipídicas suportadas em ouro

As membranas biológicas apresentam na sua constituição uma grande diversidade de lípidos e proteínas. A composição particular de cada membrana reflete as diferentes funções associadas a essa biomembrana [16-18]. As diferentes interações lípido-lípido, lípido-proteína e proteína-proteína que se estabelecem nas biomembranas são responsáveis pelas propriedades físicas que as caracterizam, como a fluidez, a carga ou a curvatura [19, 20]. Como as interações e propriedades referidas são muito difíceis de estudar em membranas biológicas, recorre-se frequentemente a sistemas modelo que mimetizam algumas das propriedades das biomembranas, sem apresentar o mesmo grau de complexidade, e.g. [21-24]. Os sistemas modelo mais

comuns são as monocamadas, lipossomas e as bicamadas suportadas e podem ser preparados com lípidos puros, misturas de lípidos ou misturas lípido-proteína [16, 25].

As bicamadas lipídicas suportadas (SLB) foram o sistema modelo utilizado neste trabalho e foram preparadas pelo método de fusão de vesículas. Há dois mecanismos propostos para explicar a formação de uma bicamada sobre um suporte sólido a partir do método de fusão de vesículas [26]. As vesículas adsorvem à superfície do substrato, fundem-se e sofrem a ruptura formando uma bicamada; ou as vesículas fundem-se, adsorvem ao substrato e sofrem a ruptura formando a bicamada. A adsorção das vesículas é melhorada por interações eletrostáticas com o substrato, a sua fusão depende do seu tamanho, pelo que quanto menores mais eficaz será este processo, no entanto, em superfícies de ouro, a presença de vesículas de maior tamanho provou ser essencial para que este processo ocorresse de forma eficiente e também para gerar bicamadas que se estendem por toda a superfície do eletrodo obtendo-se, assim, um grande cobertura de superfície. A ruptura das vesículas é mais facilmente desencadeada pela presença de Ca^{2+} (por exemplo, na solução de tampão Hepes, na forma de CaCl_2), pelo aumento de temperatura e de pressão osmótica [26]. A presença deste ião é determinante quando se pretende preparar SLB em superfícies carregadas negativamente, como a mica ou ouro modificado com SAM contendo grupos carboxílicos, uma vez que se estabelece uma ponte eletrostática entre o grupo fosfato presente na cabeça dos fosfolípidos e a superfície do substrato, aumentando desta forma a interação vesícula-substrato e, assim, favorecendo os processos que levam à formação da bicamada [27]. No caso de superfícies de ouro não modificado é necessário que a deposição de vesículas ocorra na ausência de sal (por exemplo, NaCl), pelo que este sal deverá estar ausente do tampão. A presença de iões cloreto na solução irá diminuir não só a interação intervesículas como também a interação vesícula-substrato, isto porque, o Cl^- liga ao grupo trimetilamina (carregado positivamente) presente nas cabeças polares dos fosfolípidos, acabando por anular, até certa extensão, a carga deste grupo trimetilamina. Por outro lado, se a superfície de ouro estiver modificada, por exemplo com uma SAM de COOH (MUA), é necessário a presença do ião Ca^{2+} , pois este vai mediar a interação entre os grupos negativos (COO^-) da SAM e os grupos PO_4^- da fosfatidilcolina [28].

O uso de interfaces baseadas em lípidos para biossensores é uma metodologia que tem vindo a revelar-se bastante promissora pois possibilita a criação de um ambiente biomimético, ideal para “acomodar” outras moléculas e/ou macromoléculas biológicas, como enzimas e anticorpos. Este tipo de interfaces são biocompatíveis, impedem a desnaturação da proteína de transdução que pode ocorrer após contacto com a superfície do metal e podem inibir a ligação não-específica [29-36]. Esta ação é devido à presença de grupos fosfatidilcolinas, os quais não têm grande tendência para se ligar a outras biomoléculas, prevenindo a adsorção não específica.

Uma das características limitantes deste tipo de sistemas tem sido a estabilidade da bicamada lipídica suportada (SLB), em particular, quando depositada diretamente em ouro e por isso têm sido usadas abordagens mais complexas que utilizam moléculas sintetizadas, nomeadamente, tiolípidos [34, 37] com derivados de polietileno glicol (PEG) [38, 39], lípidos biotinilados [37, 39-41] ou outros sistemas ancorados de SAMs [42, 43].

Neste trabalho foi descrita uma nova e simples metodologia para preparar interfaces imunossensoras baseadas na deposição de bicamadas lipídicas em ouro, usando lípidos comuns (um fosfolípido (1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-fosfocolina, DPPC) e colesterol) e um alcanotiol. O uso deste tipo de lípidos, que permite beneficiar das suas propriedades biofísicas e químicas e, conjuntamente com a incorporação de uma pequena percentagem do decanotiol na SLB, é uma enorme vantagem, comparativamente, por exemplo, ao uso de tiolípidos sintetizados.

As características biofísicas dos lípidos dependem do seu estado físico na membrana, que é interpretado por um diagrama de fases, tendo em conta a sua temperatura de fusão [44]. Neste trabalho foi utilizada uma mistura binária DPPC/colesterol (70:30). O diagrama de fases desta mistura mostra que as proporções molares de lípidos usados no sistema estão na fase líquido ordenado [21, 45-47], apresentando uma grande resistência [48] mecânica e um grande empacotamento molecular, sendo ao mesmo tempo um fluido. Esta fluidez não só permitirá a dinâmica funcional adequada às proteínas mas também facilita a formação de uma bicamada lipídica plana e contínua a partir de vesículas de lípidos. A fase líquido ordenado é a mais representativa da membrana plasmática em células humanas e é muito estável em relação a mudanças de temperatura e pressão [44, 45, 47].

Foram testados dois procedimentos para desenvolver este tipo de interfaces: i) a preparação de uma mistura binária de DPPC/colesterol (70:30) e a sua deposição na superfície de ouro pré-modificado com uma SAM de MUA (figura 5.15); ii) incorporação de um pequeno volume de um derivado de um alcanotiol, na mistura binária DPPC/colesterol, numa proporção de 65:30:5 (DPPC/colesterol/decanotiol) (figura 5.17). As estruturas do DPPC e colesterol, encontram-se no capítulo 2, secção 2.1 (figura 2.2). As vesículas preparadas contêm 5% de decanotiol, com o intuito de promover uma ligação forte e estável da bicamada à superfície do ouro, como representado na figura 5.17. O desempenho das plataformas preparadas foi avaliado pela capacidade de inibir o estabelecimento de interações não específicas e através da eficiência da reação de bioreconhecimento entre algG humana (que funcionará como antigénio) e o anticorpo Anti-IgG humana preparado em cabra, recorrendo às técnicas de SPR, elipsometria e AFM.

5.2.1 Ouro previamente modificado por uma SAM de ácido mercaptoundecanóico

A bicamada lipídica foi depositada numa superfície de Au que foi previamente modificada com uma SAM de ácido mercaptoundecanóico (MUA) (figura 5.15), SAM esta que é tipicamente usada para este fim [28, 33, 49]. Como referido anteriormente, uma superfície de ouro modificada por uma SAM com grupos terminais com carga negativa, como é o caso da MUA, é uma superfície hidrofílica, carregada negativamente a pH 7, logo só vai interagir com as cabeças dos fosfolípidos (PO_4^-), na presença de Ca^{2+} . Estas interações são maioritariamente electroestáticas. Como exemplificado no esquema da figura 5.15, obtém-se uma superfície de ouro modificada com a SAM e após a deposição dos lípidos as fosfatidilcolinas que ficam no folheto superior/externo, deverão inibir as adsorções não-específicas de proteínas.

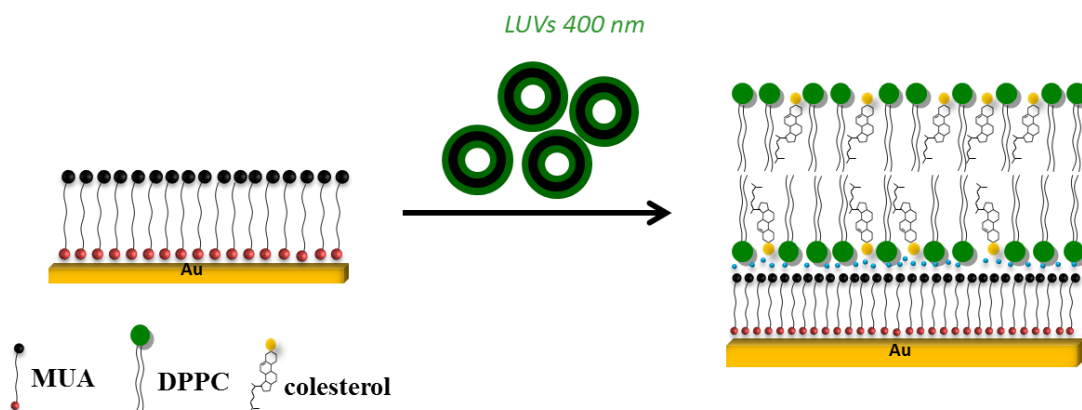


Figura 5.15 - Ilustração gráfica da deposição da bicamada lipídica (DPPC/Colesterol 70:30 mol%) suportada em Au modificado por uma SAM de MUA.

Por outro lado, o COO^- estabelece interações eletrostáticas com proteínas que também deverão estar carregadas a este pH, como se verifica no sensograma da figura 5.16a. Verificou-se, como esperado, que a SAM MUA interage significativamente com o IgG, muito provavelmente através de ligações eletrostáticas, estimando-se elipsometricamente que a espessura (d_f) da camada de proteína que interagiu com a SAM e que permaneceu adsorvida na superfície, após lavagem com tampão Hepes e água, foi de ≈ 3.4 nm (tabela 5.8). A adsorção não específica da IgG ocorre também em ouro sem qualquer modificação, mas em menor extensão, $d = 2.1$ nm [6]. Contudo, os resultados de SPR mostram claramente que após a deposição da bicamada lipídica DPPC/colesterol (70:30) no Au modificado com MUA (figura 5.16b) não há praticamente alteração nas unidades RU quando o IgG ou a BSA (albumina de soro de bovino, utilizada para avaliar a adsorção de ligações não específicas) são injetados na célula e principalmente após o passo de lavagem com PBS. Este comportamento indica, portanto, que a bicamada lipídica inibe as interações não específicas com proteínas (IgG e BSA) (figura 5.16b). Para complementar estes resultados, a espessura da SLB foi estimada por elipsometria obtendo-se valores de, aproximadamente, 5.2 nm, o que está de acordo com o esperado e reportado para bicamadas suportadas em ouro [28]. Foi ainda possível detetar que apenas uma quantidade insignificante ($\Delta d_f \sim 0.2$ nm) de IgG fica adsorvida desta SLB (tabela 5.8), corroborando a informação recolhida por SPR.

Estes resultados demonstraram que a bicamada lipídica DPPC/colesterol revela ser bastante eficiente na inibição de adsorções físicas indesejadas, não sendo necessário o uso de agentes bloqueadores. Em estudos anteriores reportados foi descrito uma capacidade parcial dos lípidos de impedir as adsorções não-específicas[50, 51] noutra tipo de substratos, tais como Poli(dimetilsiloxano)[52], Poli(metilmetacrilato)[50]ou silicone[51] e até em ouro [53].

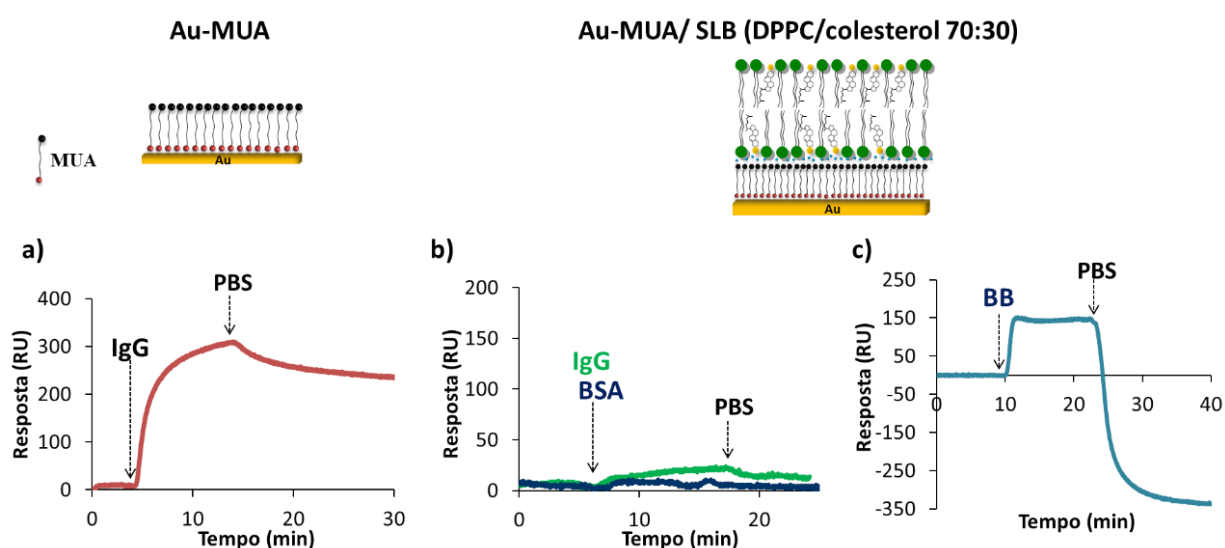


Figura 5.16 – Curvas de SPR adquiridas em tempo-real da interação de a) IgG com o Au/MUA; b) IgG ou BSA e c) BB com a SLB (DPPC/Col (70:30 mol%)) depositada no Au modificado com MUA.

Outra característica fundamental das plataformas preparadas com base em bicamadas lipídicas é a sua estabilidade em solução, uma vez que alguns autores reportaram que o lípido é removido após a simples lavagem com tampão fosfato [50]. A figura 5.16c mostra a evolução da resposta de SPR após o contato com a solução de proteínas, demonstrando que a estabilidade da SLB (DPPC/colesterol,70:30) na superfície de Au modificado com MUA foi corrompida, após a passagem de soluções com concentrações elevadas de proteínas, como é o caso do agente bloqueador tampão à base de caseína (BB). Verificou-se um decréscimo significativo no sinal de SPR (figura 5.16c), constando-se que a SLB depositada na Au/MUA deverá ter sido

removida. As principais forças que intervêm na ligação da SLB com o Au modificado com MUA são interações eletrostáticas, que poderão ter sido quebradas após a passagem da solução de BB.

Tabela 5.8 – Valores estimados de espessura (d) e de coeficiente de extensão (k) obtidos para o Au (111) modificado com as SAMs de tióis puras, a SLB (DPPC/colesterol, 70:30mol%) formada no Au/MUA, e a SLB (DPPC/colesterol/decanotiol, 65:30:5 mol%). O valor da variação da espessura (Δd) após a interação da IgG para cada plataforma e após a interação do anti-IgG com a superfície de Au/SLB (DPPC/colesterol/decanotiol) após ativação também são apresentados na tabela 5.8, assumindo valores de n do filme entre 1.48 - 1.5[11, 28, 54, 55].

Superfície modificada	ELIPSOMETRIA					
	SLB		IgG		Anti-IgG	
	d_f /nm	k	Δd_f /nm	k	Δd_f / nm	k
Au-MUA	0.8 ± 0.1	0.05 ± 0.02	3.4 ± 0.5	0.09 ± 0.02	-	-
Au-decanotiol	0.6 ± 0.1	0.06 ± 0.04	3.6 ± 0.7	0.11 ± 0.02	-	-
Au-MUA/SLB (DPPC/Col)	5.2 ± 0.9	0.04 ± 0.02	0.2 ± 0.1	0.03 ± 0.02	-	-
Au-DPPC/Col/decanetiol sem ativação	5.5 ± 0.6	0.03 ± 0.03	0.1 ± 0.1	0.03 ± 0.02	-	-
Au-DPPC/Col/decanetiol com ativação	5.5 ± 0.6	0.03 ± 0.03	3.5 ± 0.6	0.03 ± 0.01	7.0 ± 0.6	0.03 ± 0.01

5.2.2 Deposição direta de lipossomas de misturas lipídicas contendo DPPC/colesterol/decanotiol (65:30:5 mol%)

Para aumentar a estabilidade das bicamadas lipídicas suportadas em superfícies de ouro foi incorporado 5 % de decanetiol na mistura de DPPC e colesterol, permitindo formar diretamente sobre ouro uma SLB suportada com um grupo âncora, o tiol (figura 5.17). Neste caso, as moléculas de decanotiol diluídas na membrana podem estabelecer uma forte interação entre o enxofre e o Au, juntamente com as interações

de van der Waals entre as cadeias adjacentes dos lípidos, promovendo uma estável adesão da SLB à superfície.

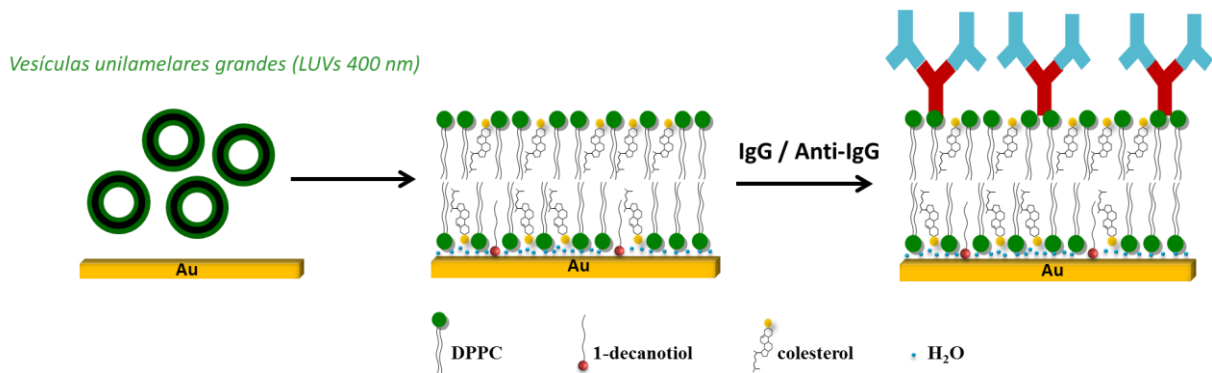


Figura 5.17 - Ilustração gráfica da deposição da bicamada lipídica (DPPC/Colesterol/decanotiol 65:30:5 mol%) suportada em Au, com posterior ligação do IgG e do anti-IgG. Considerando a grande afinidade dos grupos tiol para as superfícies metálicas, particularmente com o Au, é razoável assumir que, embora o decanotiol possa estar simetricamente distribuído entre os dois folhetos da bicamada, a maior parte daquele que se encontra no folheto de cima é transferido para o folheto de baixo.

Na figura 5.18a observa-se que o sinal de SPR obtido após a passagem de IgG numa superfície de ouro modificada com uma SAM de 1-decanotiol, demonstrando que a SAM não previne a adsorção de interações não-específicas de IgG, consistente com o valor de espessura obtido para a SAM após incubação do IgG, por elipsometria ($d_f \approx 3.6$ nm, tabela 5.8).

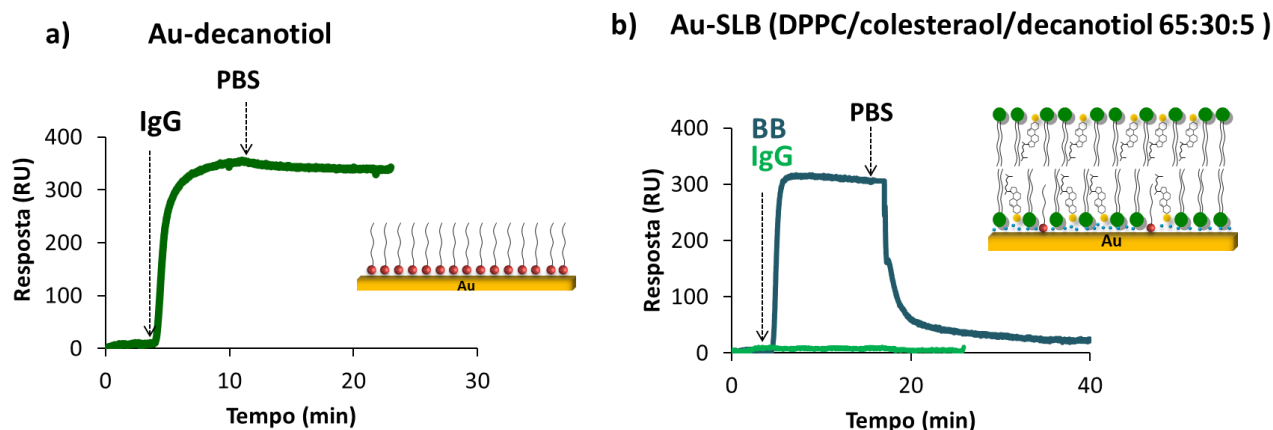


Figura 5.18 – Curvas de SPR adquiridas em tempo-real da mostrando a interação de a) IgG com o Au/decanthiol, b) IgG ou BB com a Au/SLB (DPPC/colesterol/decanthiol 65:30:5).

Considerando a forte e reconhecida afinidade entre o grupo tiol e o Au, é esperado que nesta bicamada lipídica a maioria das moléculas de decanotiol estejam no folheto inferior da bicamada, ocorrendo a transferência da maior parte das moléculas de decanotiol presentes no folheto superior para o inferior durante a modificação da superfície de ouro. A figura 5.19 mostra o estudo por desadsorção redutiva ao elétrodo de Au (111) modificado com DPPC/colesterol/decanotiol (65:30:5 mol%).

É observado um pico catódico a ~ -1.12 V, próximo do reportado para o processo de desadsorção redutiva de SAMs de derivados de alcanotióis [56]. Após a integração da área do pico de redução (atribuído à quebra da ligação Au-S) estimou-se uma cobertura de superfície de $\sim 3.0 \times 10^{-11}$ mol cm⁻², indicando que possivelmente o folheto inferior tem uma percentagem de tiol aproximadamente de 8 %.

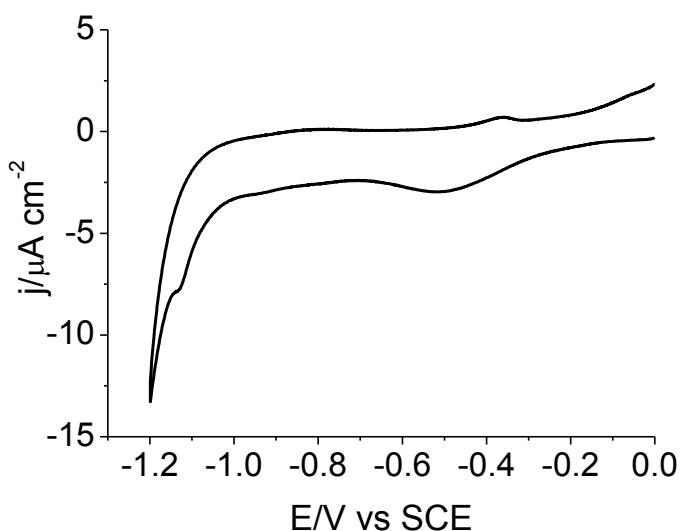


Figura 5.19 – Voltamograma cíclico do eletrodo modificado com DPPC/colesterol/decanotiol (65:30:5) em 0.1 M NaOH, a 20 mVs^{-1} .

Esta suposição é sustentada pela eficiente proteção da interface SLB-tiol contra as interações não específicas com as proteínas (IgG e BB) (figura 5.18b), uma vez que se esperava que os grupos tióis pudessem interagir com estas. Note-se que, mesmo quando o BB foi adicionado, ocorreu uma alteração insignificante no sinal de SPR, após a lavagem com PBS. Os parâmetros elipsométricos determinados por elipsometria suportam estes resultados, visto que não foram detetadas alterações significativas da espessura do filme (tabela 5.8). Estes resultados reforçam a capacidade da SLB para prevenir a adsorção não específica de proteínas e a sua estabilidade à passagem de soluções de proteínas altamente concentradas durante um fluxo contínuo de solução.

Com este método de deposição de lípidos obteve-se uma bicamada contínua, plana e compacta na superfície de Au, como confirmado por AFM e elipsometria. A espessura da bicamada formada foi de aproximadamente 5.5 nm (tabela 5.8), o que está de acordo com os valores anteriormente obtidos para bicamadas suportadas em Au [28, 33], incluindo a de DPPC/colesterol [57, 58]. Adicionalmente, a inibição de adsorções não-específicas é dependente da total cobertura da superfície do Au, pela SLB, não sendo necessário a pré-modificação da superfície ou o recurso a tiolípidos.

A análise da morfologia das superfícies de Au modificadas foi realizada por AFM. As imagens apresentadas na figura 5.20 (a-d) mostram a formação de uma bicamada lipídica plana, sem vesículas não fundidas (aproximadamente 400 nm de diâmetro) e sem defeitos na superfície de Au. Estas superfícies modificadas com a SLB (DPPC/colesterol/decanotiol) foram usadas para os ensaios de SPR (figura 5.20a e b) e elipsometria (figura 5.20c e d) e exibem propriedades morfológicas distintas. Os substratos de Au (111) usados em AFM e elipsometria já demonstraram possuírem boas características para a deposição de SLB [28, 59], pois os terraços monoatômicos exibidos, também na figura 5.20c, facilitam a deposição de bicamadas contínuas, planas e compactas. O substrato de Au usado nas experiências de SPR apresenta uma superfície constituída por grânulos com, aproximadamente, 15-20 nm (figura 5.20a)[32]. Apesar da rugosidade deste tipo de substratos, $R_{ms} = 1.712$ nm numa área de 700×700 nm², ser maior do que os Au (111), com $R_{ms} = 0.502$ nm numa área de 700×700 nm², respectivamente, é manifestamente visível que os glóbulos do Au de SPR ficam cobertos e por isso menos evidentes, devido à deposição da bicamada lipídica. A ausência de vesículas não fundidas (estruturas mais globulares) nas superfícies modificadas em conjunto com os resultados obtidos por elipsometria e SPR, permitem afirmar que, com este sistema de três componentes DPPC/colesterol/decanotiol, foi possível obter uma bicamada, contínua e plana na superfície do Au, a qual é responsável pela inibição do estabelecimento de interações não específicas[28].

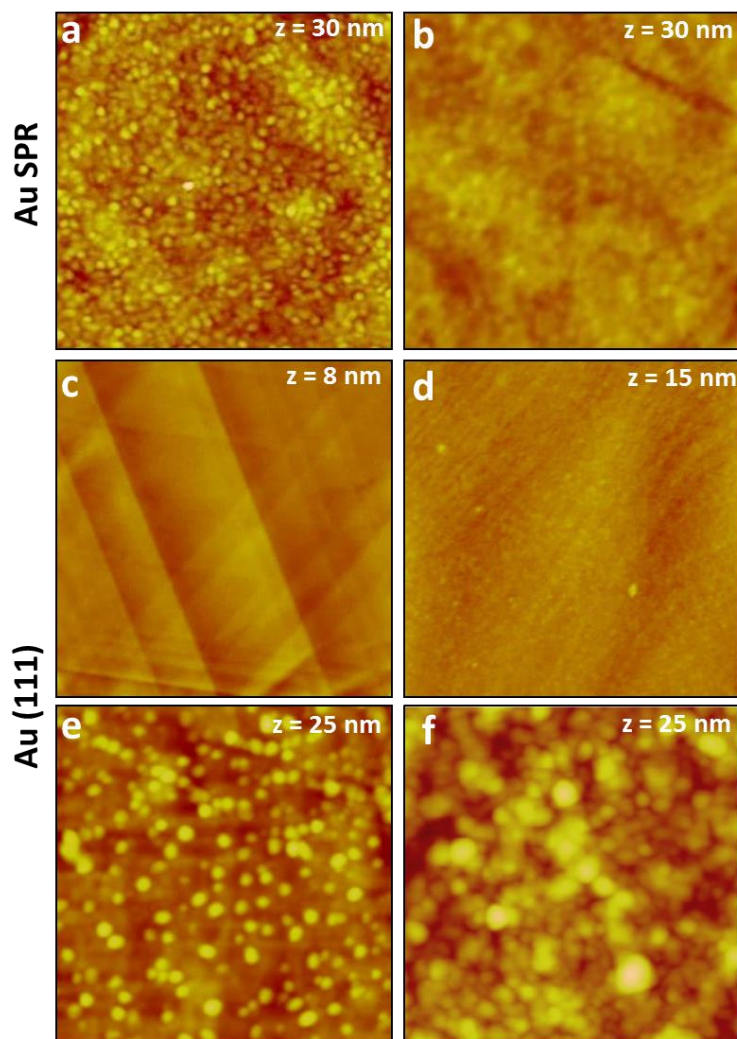


Figura 5.20 – Imagens topográficas de AFM ($700 \times 700 \text{ nm}^2$) dos substratos de ouro utilizados em SPR a) antes e b) após a deposição da SLB (DPPC/colesterol/decanotiol, 65:30:5 mol%). As imagens da superfície de ouro usadas nas experiências de AFM e elipsometria antes e depois da modificação com a SLB estão representadas, c) superfície do Au (111), d) Au (111)/ SLB (DPPC/colesterol/decanotiol) e após interação com o e) IgG e o f) anti-IgG.

Um dos objetivos centrais na preparação deste tipo de plataformas foi o de avaliar a capacidade de reconhecer fenómenos de bioespecificidade entre um anticorpo e um antígeno. Com este intuito, avaliou-se a hipótese de os grupos fosfatos dos fosfolípidos poderem ser ativados quimicamente pelo EDC e o NHS, tal como foi realizado anteriormente para ativar os grupos fosfatos das cadeias de DNA[60] para

ligar grupos terminais amina, utilizando o agente de acoplamento EDC. Na figura 5.21 é apresentada uma proposta da reação possível para o processo de ativação dos grupos fosfatos da fosfatidilcolina pelos agentes ativantes EDC/NHS.

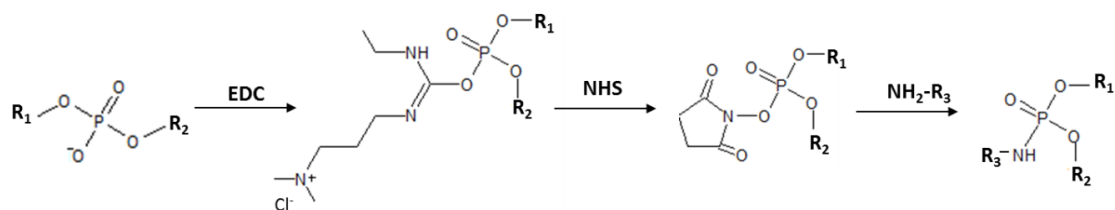


Figura 5.21 – Reação de ativação dos grupos fosfatos dos fosfolípidos.

No entanto, esta abordagem nunca tinha sido usada em grupos fosfatos de fosfolípidos depositados em superfícies de Au, para serem usadas como interfaces para imunossensores. O sucesso desta metodologia simplifica drasticamente a complexidade da interface para a imobilização covalente de biomoléculas, uma vez que não será necessário introduzir moléculas espaçadas na bicamada contendo grupos adequados a esta funcionalização. Após a reação química, com os compostos químicos EDC/NHS, uma percentagem de grupos fosfato ficarão disponíveis para reagir com os grupos amino da molécula de IgG, permitindo o acoplamento covalente entre a bicamada e o antigénio (neste caso, o IgG).

Após a reação de ativação da superfície modificada, esta foi colocada na célula do SPR e após a passagem de solução tampão fosfato, foi injetada a solução de IgG. Em contraste com o resultado mostrado na figura 5.18b, após o processo de ativação com o EDC/NHS, foi verificado um aumento significativo do sinal de SPR ($\Delta RU = 186$, figura 5.22a versus $\Delta RU \approx 0$, figura 5.18b), seguido de uma resposta estável, onde se atingiu um patamar (figura 5.18a). O sinal de SPR permaneceu inalterado depois da lavagem com tampão fosfato, mostrando que a interação entre o IgG e a bicamada lipídica é muito robusta. A interação do anti-IgG com o IgG originou um novo aumento no sinal de SPR ($\Delta RU = 390$), atribuído à reação de bioreconhecimento entre anticorpo/antigénio. É de notar que não foram detetadas alterações significativas no sinal de SPR após a passagem de PBS com 0.05 % de Tween 20 na superfície de Au com a SLB ou com a SLB/IgG/anti-IgG (figura inserida na figura 5.22a). Estes resultados são

de extrema importância pois não só comprovam a estabilidade da SLB em Au após a passagem de uma pequena percentagem de surfactante mas também que apenas ocorreram as interações específicas entre o anti-IgG e o IgG. Estes resultados reforçam a vantagem de utilizar bicamadas lipídicas na fase líquido ordenado, em particular de DPPC / colesterol, pois nesta fase a SLB apresenta-se muito mais estável e resistente à solubilização com detergente do que a maioria das bicamadas lipídicas em fase fluído. As medidas elipsométricas (figura 5.22b, c, tabela 5.8) efetuadas no Au (111) modificado com DPPC/colesterol/decanetiol (65:30:5 mol %) também demonstraram, através dos valores de espessura estimados, a inibição da adsorção não específica, pois a variação de espessuras, após a reação do IgG, foi quase insignificante ($\Delta d_f \approx 0.1$ nm). No entanto, após a ativação dos grupos fosfatos da SLB e ligação do IgG a espessura do filme aumentou para cerca de 3.5 nm. Após a interação do anti-IgG verificou-se um acréscimo no valor da espessura para $\Delta d_f \approx 7$ nm, o que expressa o reconhecimento de cerca de duas moléculas de anti-IgG para uma de IgG, confirmando a capacidade desta plataforma para detetar reações de biorechecimento entre o anticorpo/antigénio.

Como mencionado na secção 5.1 deste capítulo, utilizou-se um anti-IgG policlonal (*Heavy* (H) + *Light* (L)), isto é, pode reagir tanto com porções do fragmento Fc mais pesado (H;Fc) e mais leve (L; F(ab')₂/Fab) dos IgGs imobilizados. Deste modo é esperado que 2 anti-IgGs se liguem a 1 IgG imobilizado. A razão entre anti-IgG / IgG detetada por SPR e elipsometria foi elevada, o que confirma a efetiva e bivalente ligação entre o anticorpo e o antigénio, demonstrando que esta simples metodologia poderá favorecer uma orientação preferencial dos anticorpos imobilizados. Esta ligação multivalente também sugere que existe espaço suficiente entre os IgGs, não havendo impedimento estereoquímico causado pela formação da camada.

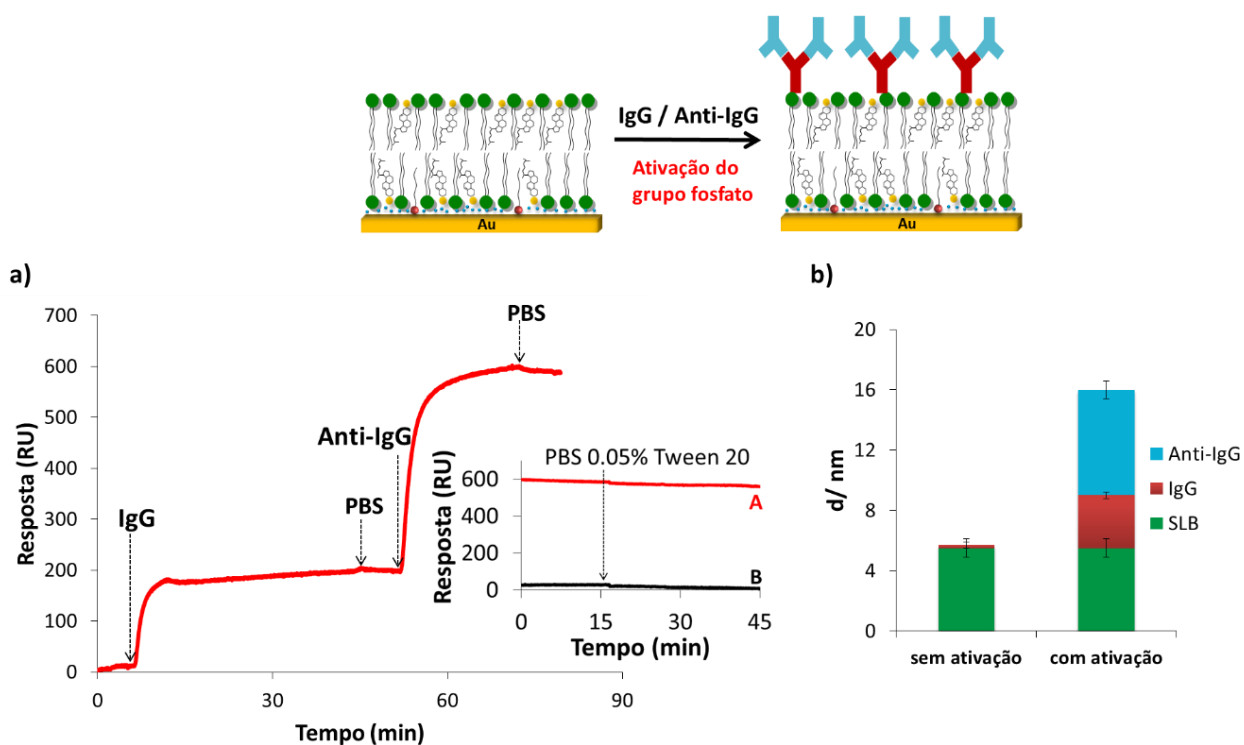


Figura 5.22 - Curva de SPR em tempo-real mostrando a interação IgG / anti-IgG nesta plataforma Au-SLB (DPPC:Col:decanotiol, 65:30:5) após a ativação dos grupos fosfatos dos fosfolípidos pela EDC/NHS; O *inset* da figura mostra os resultados de SPR obtidos para duas interfaces: A- Au/SLB/IgG/Anti-IgG, and B- Au/SLB, ambos lavados com PBS contendo 0.05% Tween 20; b) representação gráfica dos valores das espessuras terminados por elipsometria para cada passo da modificação da superfície do Au (média \pm desvio padrão).

As imagens de AFM das superfícies de Au modificadas após a ligação do IgG (figura 5.20e) e da interação específica dos anti-IgGs (figura 5.20f) mostraram a presença de estruturas globulares com aproximadamente 20 nm de diâmetro após a incubação do IgG, e agregados maiores após a ligação do anti-IgG. Esta análise morfológica corrobora a elevada razão detetada, por SPR e elipsometria, entre o anti-IgG / IgG.

A metodologia aqui descrita para preparar as interfaces lipídicas é inovadora, pois foi a primeira vez que se utilizou vesículas com múltiplos componentes, um fosfolípido comum (DPPC), colesterol e decanetiol para formar uma bicamada plana e uniforme em ouro. Existe um estudo que descreve a deposição de lipossomas com

uma percentagem de um alcanotiol em ouro[61], no entanto, os autores usaram um sistema binário composto por glicolípidos e uma alta concentração de tiol (30 mol %), o que originou a adsorção de vesículas intactas que não fundiram, bem visível nas imagens de AFM da literatura mencionada.

Neste trabalho foi apresentada uma interface baseada em bicamadas lipídicas, que combina um número de importantes características para o desenvolvimento de superfícies para biossensores: i) ambiente biomimético, ii) uso de reagentes comuns e disponíveis comercialmente, iii) preparação simples, iv) capacidade para bloquear as interações não-específicas com proteínas séricas, v) estabilidade da bicamada lipídica suportada em ouro num fluxo contínuo de soluções tampão (mesmo na presença de surfactantes) ou soluções de proteínas muito concentradas, e finalmente, vi) ativação direta de bicamadas lipídicas para o acoplamento covalente da proteína de interesse.

A simplicidade deste método, devido ao facto de todos os componentes da bicamada lipídica serem misturados em conjunto, sem a necessidade de modificação da superfície anterior ou a adição de componentes adicionais, tais como agentes de bloqueio, torna esta interface DPPC/colesterol/decanotiol (65:30:5 mol%) uma alternativa atrativa para ser utilizada como um biossensor baseado em bicamadas lipídicas. Adicionalmente, o acoplamento direto dos anticorpos aos grupos fosfatos das cabeças dos fosfolípidos aumenta ainda mais o potencial desta plataforma.

5.3 Referências bibliográficas

[1] A.G. Burenin, A.E. Urusov, A.V. Betin, A.V. Orlov, M.P. Nikitin, T.I. Ksenevich, B.G. Gorshkov, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev, P.I. Nikitin, Direct immunosensing by spectral correlation interferometry: assay characteristics versus antibody immobilization chemistry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407 (2015) 3955-3964.

[2] Y. Niu, A.I. Matos, L.M. Abrantes, A.S. Viana, G. Jin, Antibody Oriented Immobilization on Gold using the Reaction between Carbon Disulfide and Amine Groups and Its Application in Immunosensing, *Langmuir*, 28 (2012) 17718-17725.

[3] M. Frasconi, F. Mazzei, T. Ferri, Protein immobilization at gold-thiol surfaces and potential for biosensing, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398 (2010) 1545-1564.

- [4] W. Hu, Z. Lu, Y. Liu, C.M. Li, In Situ Surface Plasmon Resonance Investigation of the Assembly Process of Multiwalled Carbon Nanotubes on an Alkanethiol Self-Assembled Monolayer for Efficient Protein Immobilization and Detection, *Langmuir*, 26 (2010) 8386-8391.
- [5] A. Ulman, Formation and structure of self-assembled monolayers, *Chemical Reviews*, 96 (1996) 1533-1554.
- [6] Z.H. Wang, A.S. Viana, G. Jin, L.M. Abrantes, Immunosensor interface based on physical and chemical immunoglobulin G adsorption onto mixed self-assembled monolayers, *Bioelectrochemistry*, 69 (2006) 180-186.
- [7] X. Yang, Y. Guo, A. Wang, Luminol/antibody labeled gold nanoparticles for chemiluminescence immunoassay of carcinoembryonic antigen, *Analytica Chimica Acta*, 666 (2010) 91-96.
- [8] Z. Wang, G. Jin, Feasibility of protein A for the oriented immobilization of immunoglobulin on silicon surface for a biosensor with imaging ellipsometry, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 57 (2003) 203-211.
- [9] K. Saal, V. Sammelseg, A. Löhmus, E. Kuusk, G. Raidaru, T. Rincken, A. Rincken, Characterization of glucose oxidase immobilization onto mica carrier by atomic force microscopy and kinetic studies, *Biomolecular Engineering*, 19 (2002) 195-199.
- [10] Z.H. Wang, G. Jin, Covalent immobilization of proteins for the biosensor based on imaging ellipsometry, *Journal of Immunological Methods*, 285 (2004) 237-243.
- [11] H. Elwing, Protein absorption and ellipsometry in biomaterial research, *Biomaterials*, 19 (1998) 397-406.
- [12] M. Lismont, L. Dreesen, Comparative study of Ag and Au nanoparticles biosensors based on surface plasmon resonance phenomenon, *Materials Science and Engineering: C*, 32 (2012) 1437-1442.
- [13] G. Jin, R. Jansson, H. Arwin, Imaging ellipsometry revisited: Developments for visualization of thin transparent layers on silicon substrates, *Review of Scientific Instruments*, 67 (1996) 2930-2936.
- [14] H. Arwin, S. Welin-Klintström, R. Jansson, Off-Null Ellipsometry Revisited: Basic Considerations for Measuring Surface Concentrations at Solid/Liquid Interfaces, *Journal of Colloid and Interface Science*, 156 (1993) 377-382.
- [15] R.-P. Liang, G.-H. Yao, L.-X. Fan, J.-D. Qiu, Magnetic Fe₃O₄@Au composite-enhanced surface plasmon resonance for ultrasensitive detection of magnetic nanoparticle-enriched α -fetoprotein, *Analytica Chimica Acta*, 737 (2012) 22-28.
- [16] R.F.M. de Almeida, L.M.S. Loura, *Tópicos de Biofísica de Membranas*, LIDEL, Lisboa, 2004.
- [17] D. L.Nelson, M. M.Cox, *Lipids*, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, United States, 2005, pp. 343-366.
- [18] D.L. Nelson, M.M. Cox, *Lehninger, Principles of Biochemistry*, Fourth ed., W.H.Freeman and Company, New York, USA, 2005.
- [19] L. Lins, M. Decaffmeyer, A. Thomas, R. Brasseur, Relationships between the orientation and the structural properties of peptides and their membrane interactions, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1778 (2008) 1537-1544.

- [20] D. Marguet, P.F. Lenne, H. Rigneault, H.T. He, Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order, *Embo Journal*, 25 (2006) 3446-3457.
- [21] R.F. de Almeida, J. Borst, A. Fedorov, M. Prieto, A.J. Visser, Complexity of lipid domains and rafts in giant unilamellar vesicles revealed by combining imaging and microscopic and macroscopic time-resolved fluorescence, *Biophys.J.*, 93 (2007) 539-553.
- [22] C.B. Yuan, J. Furlong, P. Burgos, L.J. Johnston, The size of lipid rafts: An atomic force microscopy study of ganglioside GM1 domains in sphingomyelin/DOPC/cholesterol membranes, *Biophysical Journal*, 82 (2002) 2526-2535.
- [23] S. Chiantia, J. Ries, N. Kahya, P. Schwille, Combined AFM and two-focus SFCS study of raft-exhibiting model membranes, *Chemphyschem*, 7 (2006) 2409-2418.
- [24] Y.H.M. Chan, S.G. Boxer, Model membrane systems and their applications, *Current Opinion in Chemical Biology*, 11 (2007) 581-587.
- [25] A. Berquand, M.P. Mingeot-Leclercq, Y.F. Dufrene, Real-time imaging of drug-membrane interactions by atomic force microscopy, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1664 (2004) 198-205.
- [26] E.I. Goksu, J.M. Vanegas, C.D. Blanchette, W.C. Lin, M.L. Longo, AFM for structure and dynamics of biomembranes, *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1788 (2009) 254-266.
- [27] M. Benes, D. Billy, A. Benda, H. Speijer, M. Hof, W.T. Hermens, Surface-dependent transitions during self-assembly of phospholipid membranes on mica, silica, and glass, *Langmuir*, 20 (2004) 10129-10137.
- [28] J.T. Marques, R.F.M. de Almeida, A.S. Viana, Biomimetic membrane rafts stably supported on unmodified gold, *Soft Matter*, 8 (2012) 2007-2016.
- [29] E. Reimhult, K. Kumar, Membrane biosensor platforms using nano- and microporous supports, *Trends in Biotechnology*, 26 (2008) 82-89.
- [30] W. Ma, Y.L. Ying, L.X. Qin, Z. Gu, H. Zhou, D.W. Li, T.C. Sutherland, H.Y. Chen, Y.T. Long, Investigating electron-transfer processes using a biomimetic hybrid bilayer membrane system, *Nature Protocols*, 8 (2013) 439-450.
- [31] M.B. Fritzen-Garcia, V.C. Zoldan, I.R.W.Z. Oliveira, V. Soldi, A.A. Pasa, T.B. Creczynski-Pasa, Peroxidase immobilized on phospholipid bilayers supported on au (111) by DTT self-assembled monolayers: Application to dopamine determination, *Biotechnology and Bioengineering*, 110 (2013) 374-382.
- [32] J.T. Marques, R.F.M. de Almeida, A.S. Viana, Lipid bilayers supported on bare and modified gold - Formation, characterization and relevance of lipid rafts, *Electrochimica Acta*, 126 (2014) 139-150.
- [33] J.T. Marquês, A.S. Viana, R.F.M. de Almeida, A Biomimetic Platform to Study the Interactions of Bioelectroactive Molecules with Lipid Nanodomains, *Langmuir*, 30 (2014) 12627-12637.
- [34] A. Coutable, C. Thibault, J. Chalmeau, J.M. Francois, C. Vieu, V. Noireaux, E. Trevisiol, Preparation of Tethered-Lipid Bilayers on Gold Surfaces for the Incorporation of Integral Membrane Proteins Synthesized by Cell-Free Expression, *Langmuir*, 30 (2014) 3132-3141.

- [35] J. Lipkowski, Chapter One - Biomimetic Membrane Supported at a Metal Electrode Surface: A Molecular View, in: I. Aleš, V.K. Chandrashekhar (Eds.) *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, Academic Press 2014, pp. 1-49.
- [36] E. Gizeli, M. Liley, C.R. Lowe, H. Vogel, Antibody Binding to a Functionalized Supported Lipid Layer: A Direct Acoustic Immunosensor, *Analytical Chemistry*, 69 (1997) 4808-4813.
- [37] I. Koper, Insulating tethered bilayer lipid membranes to study membrane proteins, *Molecular Biosystems*, 3 (2007) 651-657.
- [38] F. Albertorio, A.J. Diaz, T.L. Yang, V.A. Chapa, S. Kataoka, E.T. Castellana, P.S. Cremer, Fluid and air-stable lipopolymer membranes for biosensor applications, *Langmuir*, 21 (2005) 7476-7482.
- [39] A. Lundquist, S.B. Hansen, H. Nordstrom, U.H. Danielson, K. Edwards, Biotinylated lipid bilayer disks as model membranes for biosensor analyses, *Analytical Biochemistry*, 405 (2010) 153-159.
- [40] T. Hianik, M. Snejdarkova, L. Sokolikova, E. Meszar, R. Krivanek, V. Tvarozek, I. Novotny, J. Wang, Immunosensors based on supported lipid membranes, protein films and liposomes modified by antibodies, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 57 (1999) 201-212.
- [41] Y. Ishizuka-Katsura, T. Wazawa, T. Ban, K. Morigaki, S. Aoyama, Biotin-containing phospholipid vesicle layer formed on self-assembled monolayer of a saccharide-terminated alkyl disulfide for surface plasmon resonance biosensing, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105 (2008) 527-535.
- [42] M. Brzozowska, B.P. Oberts, G.J. Blanchard, J. Majewski, P. Krysinski, Design and Characterization of Novel Tether Layer for Coupling of a Bilayer Lipid Membrane to the Surface of Gold, *Langmuir*, 25 (2009) 9337-9345.
- [43] J.K.R. Kendall, B.R.G. Johnson, P.H. Symonds, G. Imperato, R.J. Bushby, J.D. Gwyer, C. van Berkel, S.D. Evans, L.J.C. Jeuken, Effect of the Structure of Cholesterol-Based Tethered Bilayer Lipid Membranes on Ionophore Activity, *Chemphyschem*, 11 (2010) 2191-2198.
- [44] R.F.M. de Almeida, E. Joly, Crystallization around solid-like nanosized docks can explain the specificity, diversity, and stability of membrane microdomains, *Frontiers in Plant Science*, 5 (2014) 14.
- [45] J.H. Ipsen, G. Karlstrom, O.G. Mouritsen, H. Wennerstrom, M.J. Zuckermann, Phase-equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 905 (1987) 162-172.
- [46] M.R. Vist, J.H. Davis, Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: ²H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry, *Biochemistry*, 29 (1990) 451-464.
- [47] D. Marsh, Liquid-ordered phases induced by cholesterol: A compendium of binary phase diagrams, *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1798 (2010) 688-699.
- [48] M.J. Uline, I. Szleifer, Mode specific elastic constants for the gel, liquid-ordered, and liquid-disordered phases of DPPC/DOPC/cholesterol model lipid bilayers, *Faraday Discuss.*, 161 (2013) 177-191.
- [49] S. Ip, J.K. Li, G.C. Walker, Phase Segregation of Untethered Zwitterionic Model Lipid Bilayers Observed on Mercaptoundecanoic-Acid-Modified Gold by AFM Imaging, *Langmuir*, 26 (2010) 11060-11070.

- [50] N.C.H. Le, V. Gubala, R.P. Gandhiraman, S. Daniels, D.E. Williams, Evaluation of Different Nonspecific Binding Blocking Agents Deposited Inside Poly(methyl methacrylate) Microfluidic Flow-Cells, *Langmuir*, 27 (2011) 9043-9051.
- [51] K. Glasmästar, C. Larsson, F. Höök, B. Kasemo, Protein Adsorption on Supported Phospholipid Bilayers, *Journal of Colloid and Interface Science*, 246 (2002) 40-47.
- [52] K.S. Phillips, Q. Cheng, Microfluidic Immunoassay for Bacterial Toxins with Supported Phospholipid Bilayer Membranes on Poly(dimethylsiloxane), *Analytical Chemistry*, 77 (2004) 327-334.
- [53] A.L. Plant, M. Brighamburke, E.C. Petrella, D.J. Oshannessy, Phospholipid/Alkanethiol Bilayers for Cell-Surface Receptor Studies by Surface Plasmon Resonance, *Analytical Biochemistry*, 226 (1995) 342-348.
- [54] H. Arwin, Optical-properties of thin-layers of bovine serum-albumin, gamma-globulin, and hemoglobin, *Applied Spectroscopy*, 40 (1986) 313-318.
- [55] R.F.M. de Almeida, L.M.S. Loura, A. Fedorov, M. Prieto, Nonequilibrium phenomena in the phase separation of a two-component lipid bilayer, *Biophysical Journal*, 82 (2002) 823-834.
- [56] V.C.Ferreira, F.Silva, L.M.Abrantes, Monocamadas auto-montadas de alcanotióis– das superfícies planas à estabilização de nanopartículas de ouro, *Quimica111*, (2008).
- [57] L. Chen, Z. Yu, P.J. Quinn, The partition of cholesterol between ordered and fluid bilayers of phosphatidylcholine: A synchrotron X-ray diffraction study, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1768 (2007) 2873-2881.
- [58] J.T. Marques, A.S. Viana, R.F. de Almeida, Ethanol effects on binary and ternary supported lipid bilayers with gel/fluid domains and lipid rafts, *Biochim.Biophys.Acta*, 1808 (2011) 405-414.
- [59] J. Lipkowski, Building biomimetic membrane at a gold electrode surface, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12 (2010) 13874-13887.
- [60] Y.D. Zhao, D.W. Pang, S. Hu, Z.L. Wang, J.K. Cheng, H.P. Dai, DNA-modified electrodes; part 4: optimization of covalent immobilization of DNA on self-assembled monolayers, *Talanta*, 49 (1999) 751-756.
- [61] C. Guo, P. Boullanger, L. Jiang, T. Liu, One-step immobilization of alkanethiol/glycolipid vesicles onto gold electrode: Amperometric detection of Concanavalin A, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62 (2008) 146-150.

Capítulo 6

Conclusões Finais

Neste trabalho de investigação pretendeu-se explorar novas metodologias de modificação química de superfícies simples, versáteis e eficazes, conjugando a formação *in situ* de ditiocarbamatos e nanomateriais com o intuito de avaliar a sua aplicabilidade como biossensores eletroquímicos.

A modificação de superfícies de ouro envolvendo um só passo reacional foi conseguida com sucesso, quer em meio aquoso quer em meio orgânico. Esta modificação resultou da reação entre dissulfureto de carbono, nanopartículas de ouro (com dimensões médias de 5 e 20 nm) e compostos simples contendo grupos amina, a epinefrina e um aminoácido. Este método assenta na forte afinidade entre átomos de enxofre e superfícies metálicas, nomeadamente o ouro, e na reação espontânea entre o CS₂ e aminas.

A caracterização por voltametria cíclica demonstrou não só a estabilidade das superfícies modificadas com nanomateriais como também o aumento significativo na quantidade de composto alvo imobilizado, consequência direta do aumento da área superficial. Foi também observado um desvio negativo do valor de potencial em que ocorrem os processos redox, o qual parece ser indicativo de uma transferência eletrónica facilitada pelos nanomateriais condutores.

Através das atividades realizadas no presente trabalho de investigação, foi possível comprovar a formação de ditiocarbamatos por desadsorção eletroquímica redutiva, bem como estimar o recobrimento relativo aos átomos de enxofre ligados à superfície do elétrodo. Este valor deverá também contabilizar os átomos de S que estão ligados às nanopartículas.

Devido à espontaneidade do método explorado neste trabalho, observou-se que são várias as espécies que estão ligadas ao ouro, ditiocarbamatos, moléculas de CS₂ (que não reagiu), e ambas as moléculas ligadas a nanopartículas, onde a ligação ao elétrodo deverá ocorrer por uma ponte entre os dois átomos de S.

A espectroscopia fotoeletrónica de raios-X permitiu corroborar a presença de ligações S-Au e a formação de grupos ditiocarbamatos nos elétrodos (presença das bandas N1s e C1s, com a energia de ionização característica da ligação C-N dos ditiocarbamatos). A ausência de bandas com energia de ionização típicas de espécies de enxofre livres comprovou que todo o enxofre se ligou à superfície de ouro plano

e/ou nanopartículas. No entanto, os resultados obtidos não permitiram distinguir entre uma ligação bidentada do CS₂-Au e uma ligação monodentada Au-S-C-S-NP. Serão portanto necessários estudos complementares para clarificar estes tipos de ligações.

A avaliação eletroquímica da atividade biológica da glucose oxidase após o processo de imobilização demonstrou que, independentemente da reação eletroquímica estudada para avaliar essa bioatividade, a glucose oxidase se manteve biologicamente ativa. O desempenho catalítico para a glucose, avaliado através da detecção eletroquímica da redução do H₂O₂ e/ou da oxidação do derivado de ferroceno no elétrodo, foi melhorado na presença de nanopartículas. Isto deve-se possivelmente ao aumento da quantidade de enzima imobilizada. É de salientar que apenas na presença de AuNPs foi possível observar o processo redox do centro ativo (FAD) do enzima. Este processo foi detetado a um potencial mais positivo do que o normalmente reportado para a transferência eletrónica direta entre o enzima e o elétrodo, o que poderá indicar que a presença deste tipo de nanoestruturas favorece a proximidade/orientação do centro ativo do enzima com a superfície do elétrodo, facilitando assim a transferência eletrónica com o mesmo.

A informação morfológica e ótica recolhida através da caracterização das nanopartículas em suspensão coloidal corroboram os resultados obtidos com as superfícies de ouro planas, demonstrando a eficiente funcionalização das nanopartículas através da formação *in situ* de ditiocarbamatos. Esta constatação está suportada na observação do aumento do tamanho médio das nanopartículas acompanhado pelo desvio da banda de plasmão de superfície das AuNPs e no aparecimento das bandas características dos ditiocarbamatos.

A formação de ditiocarbamatos foi estendida à funcionalização de nanopartículas de Fe₃O₄ com biomoléculas e à sua imobilização em superfícies de ouro. Neste contexto demonstrou-se que este método de modificação pode ser empregue diretamente em nanopartículas de magnetite puras, evitando-se assim o uso de revestimentos (*core-shell*), por exemplo de ouro ou de silício, frequentemente utilizados para facilitar a modificação química da superfície instável do óxido metálico.

Tal como verificado para as AuNPs, também a presença de Fe₃O₄NPs originou um incremento das propriedades eletroquímicas dos elétrodos modificados com

composto modelo, a epinefrina. A presença e a estabilidade das Fe₃O₄NPs imobilizadas em ouro e funcionalizadas com epinefrina foram comprovadas por voltametria cíclica, em meio ácido.

O sucesso desta funcionalização de Fe₃O₄NPs com a lacase foi comprovado pela atividade catalítica dos elétrodos modificados para a oxidação de substrato, o ABTS. Para o efeito, utilizaram-se nanopartículas de magnetite com dois tamanhos médios, de 20 e 40 nm, dado que o diâmetro da nanopartícula de magnetite dita o seu estado de oxidação. Verificou-se que a razão Fe³⁺/Fe²⁺ influencia as propriedades magnéticas e condutoras. Como tal, as nanopartículas maiores são as que contêm a espinela no estado mais puro, como confirmado por difração de raios-X. A presença de nanopartículas melhorou claramente o desempenho do biossensor face a um eléctrodo modificado por apenas CS₂ e Lacase, especialmente as partículas de maiores dimensões. É de salientar que a atividade catalítica de elétrodos semelhantes preparados com nanopartículas de ouro é substancialmente menor do que a obtida com nanopartículas de magnetite. A metodologia utilizada para a imobilização de Lacase, na presença de nanopartículas de ferro, permitiu ainda detetar a transferência direta de electrões entre o enzima e o eléctrodo, correspondente à conversão redox de um dos seus centros de cobre, potenciando, dessa forma, a sua aplicabilidade.

A caracterização morfológica por AFM de todos os elétrodos modificados suportou a exequibilidade desta metodologia simples e permitiu comprovar a presença de nanopartículas à superfície do eléctrodo, incluindo o aumento do seu tamanho após a reacção de modificação. A distribuição uniforme das nanopartículas no eléctrodo é favorecida pelo processo de modificação, com a formação de ditiocarbamatos, o que explica a diminuição significativa da presença de aglomerados de nanopartículas puras, como observado nas imagens de AFM dos elétrodos modificados com CS₂/Fe₃O₄NPs.

Estes resultados permitem concluir que a formação *in situ* de ditiocarbamatos pode ser usada como uma alternativa a metodologias que envolvem vários passos de imobilização usualmente reportadas para a ligação covalente de enzimas na presença de nanopartículas. O método desenvolvido nesta tese mostrou ser mais simples e rápido com a vantagem de dispensar a utilização de agentes de acoplamento para a ligação da biomolécula.

No desenvolver deste trabalho de investigação as nanopartículas de Fe_3O_4 conjugadas com metaloporfirinas foram adsorvidas em superfícies de ouro recorrendo ao CS_2 . Para tal, foram escolhidas metaloporfirinas (Fe e Co) contendo dois grupos carboxílicos com grande afinidade para superfícies de óxidos metálicos. Os elétrodos modificados demonstraram ser catalíticos para a reação de redução do oxigénio em meio ácido. O melhor desempenho foi novamente conseguido para as Fe_3O_4 NPs de 40 nm. No caso da porfirina de Co, o comportamento catalítico para ORR é devido a um efeito sinérgico da composição química das nanopartículas de Fe_3O_4 e à atividade catalítica intrínseca da porfirina de Co. Esta ação conjunta originou um desvio positivo nos valores dos potenciais de redução da ORR face aos valores observados para as nanopartículas nuas, adsorvidas em ouro pelo CS_2 ou mesmo com uma monocamada auto-montada de metaloporfirina. Por outro lado, o processo catalítico dos elétrodos modificados com a porfirina de Fe foi claramente dominado pela atividade catalítica da metaloporfirina, exibindo a densidade de corrente mais elevada para a ORR. Os ensaios com o elétrodo rotativo de disco e anel confirmam inequivocamente que ocorrem processos distintos na ORR nos elétrodos modificados com porfirina de Co e Fe, através da transferência de 2 ou 4 eletrões, com formação de H_2O_2 e H_2O , respetivamente. Estes ensaios comprovaram a excelente estabilidade das nanopartículas de Fe_3O_4 funcionalizadas com CS_2 e metaloporfirinas em ambientes ácidos. Através destes resultados é possível demonstrar as potencialidades desta metodologia de modificação com dissulfureto de carbono, a qual pode ser estendida a outros suportes metálicos além do ouro na preparação de superfícies.

Relativamente ao comportamento do CS_2 , foi possível observar que este também pode adsorver-se no ouro, limitando a quantidade de compostos alvo imobilizados (antes de reagir com aminas ou se ligar a NPs). Quando adsorvido no ouro o carbono do CS_2 fica menos eletrofílico e não reage com aminas livres em solução. Este comportamento constitui uma vantagem pois permite o espaçamento dos centros catalíticos no elétrodo, garantindo assim um melhor desempenho das superfícies modificadas.

A formação *in situ* de ditiocarbamatos na presença de nanopartículas foi igualmente empregue na construção de imunossensores universais (sem marcações). Observou-se que as superfícies modificadas por CS_2 , AuNPs e proteína A eram

adequadas para a deteção da reação de bioreconhecimento entre o IgG e o Anti-IgG. Adicionalmente verificou-se que a razão entre o anticorpo/antigénio é de 2, indicando que uma molécula de IgG é identificada por 2 moléculas de Anti-IgG, provavelmente porque este Anti-IgG é policlonal com especificidade para as regiões Fab e Fc do IgG e, portanto, tem capacidade para identificar diferentes regiões do IgG imobilizado.

Outra das atividades realizada no âmbito deste trabalho foi a preparação de interfaces biomiméticas baseadas na deposição de bicamadas lipídicas para aplicação em imunossensores. A estabilidade destas bicamadas lipídicas em ouro foi conseguida através da incorporação de uma pequena percentagem de um alcanotiol em lipossomas, constituídos por uma mistura de um fosfolípido saturado e colesterol. A robustez desta modificação reside na presença de ligações fortes ouro – tiol e na organização dos lípidos que, de acordo com o diagrama de fases, deverá corresponder a uma fase de líquido ordenado.

Os resultados obtidos pela combinação de técnicas óticas e microscópicas permitiram comprovar o sucesso do método usado na biofuncionalização de superfícies de ouro capazes de permitir fenómenos de reconhecimento biológico entre anticorpo e antigénio. Esta metodologia representa um enorme potencial para ser utilizada na preparação de biossensores dado que combina um grande número de importantes características para o desenvolvimento deste tipo de interfaces, tais como: i) ambiente biomimético; ii) uso de reagentes comuns e disponíveis comercialmente; iii) simples preparação; iv) capacidade para bloquear as interações não específicas com proteínas séricas; v) estabilidade da bicamada lipídica suportada em ouro perante um fluxo contínuo de soluções tampão (mesmo na presença de surfactantes) ou soluções de proteínas muito concentradas; e vi) ativação direta de bicamadas lipídicas para o acoplamento covalente da proteína de interesse aos grupos fosfato.

