

Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos
Programa de Pós-Graduação em Química

Dyovani Coelho

**Caracterização eletroquímica de uma monocamada auto-organizada mista composta
por ácido 3-mercaptopropiônico e ácido 11-mercaptoundecanóico**

São Carlos

2011

Dyovani Coelho

**Caracterização eletroquímica de uma monocamada auto-organizada mista composta
por ácido 3-mercaptopropiônico e ácido 11-mercaptoundecanóico**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química
de São Carlos, da Universidade de São Paulo,
como requisito para obtenção do título de Mestre
em Ciências (Química Analítica).

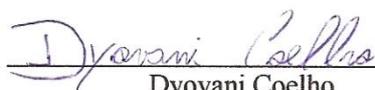
Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado

São Carlos

2011

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, 09/ 06/ 2011


Dyovani Coelho

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Coelho, Dyovani

Caracterização eletroquímica de uma monocamada auto-organizada mista composta por ácido 3-mercaptopropiônico e ácido 11-mercaptoundecanóico. / Dyovani Coelho. -- São Carlos, 2011.
119 p.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2011.
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado

1. Monocamadas auto-organizada. I.Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

*Dissertação dedicada a DEUS, pela chance de testar
meus dons e ampliar meus conhecimentos;*

*Aos meus amados pais, Maura e Sílvio, por estarem
ao meu lado em todos os momentos...*

*Aos meus irmãos, Sílvia Mara e Maurício,
pelo apoio e compreensão...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por sempre estar conosco e sempre nos iluminar tornando nossos obstáculos apenas formas de deixar-nos mais fortes.

Em especial, agradeço aos meus pais, Maura e Silvio, e a meus irmãos, Silvia Mara e Maurício, por saber que vocês estarão sempre comigo. Mesmo que a distância insista em dificultar nossos reencontros, vocês estarão em meu coração. Agradeço a minha família pelos ensinamentos mais preciosos como respeito, honra e dignidade e por sonhar junto comigo, tornando este sonho uma realidade.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado, pela orientação, confiança e profissionalismo dedicados durante esses dois anos. Sinceramente, um dia retribuirei e irei superar suas expectativas.

Também gostaria de agradecer aos meus tios, Geraldo e Marina, que considero como meus segundos pais e a minha tia Angelina e ao meu tio João Alfredo por confiarem a nós sua amizade e nos apoiarem nos momentos mais difíceis de nossa jornada.

Por fim, agradeço aos amigos Diego, Lia, Fernando, Ivana, Rafael, Murilão, Murilinho, Eduardo, Deodato, Samea, Okumura, Livinha, Milena, João Tiengo, Marcelo, Pimpão, Sardinha, Célio e Mateus, que me acompanharam nesses dois anos com conversas animadas e boas risadas. Creio que com vocês fiz uma amizade sincera, próspera e que se estenderá por toda a vida.

Obrigado!

*Há três métodos para ganhar sabedoria:
primeiro, por reflexão, que é o mais nobre;
segundo, por imitação, que é o mais fácil; e
terceiro, por experiência, que é o mais amargo.*
(Confúcio)

Até que o sol não brilhe, acendamos uma vela na escuridão.
(Confúcio)

“Crê nos que buscam a verdade. Duvida dos que a encontram”
(André Gide)

*“... feche a porta, esqueça o barulho,
feche os olhos, tome ar: é hora do mergulho...”*
(Humberto Gessinger - Engenheiros do Hawaíi - Hora do mergulho)

RESUMO

Monocamadas auto-organizadas formadas pela quimissorção de alcanotóis sobre ouro apresentam estruturas bem definidas, organizadas e reprodutíveis. As propriedades de SAMs, aliadas à facilidade de síntese, têm atraído o interesse da comunidade científica o que ocasionou um grande avanço na área de nanotecnologia, especialmente em engenharia de superfícies. Neste trabalho, avaliou-se a modificação de um substrato de ouro com uma mistura dos ácidos 3-mercaptopropiônico e 11-mercaptoundecanóico. Com isso procurou-se controlar a configuração da superfície da SAM a fim de se obter um arranjo com ilhas de 3amp circundadas por 11amu, similar a um conjunto de ultramicroeletrodos. A SAM mista foi produzida por incubação de um substrato de ouro em solução etanólica contendo ambos os tiois. O estudo do processo redox do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ demonstrou que monocamadas de 3amp se comportam como a superfície de ouro não modificado, apresentando os mesmos valores de corrente de pico (I_p), potencial de pico (E_p) e resistência de transferência de carga (R_{tc}), pois permitem que ocorra a transferência eletrônica por efeito de tunelamento quântico dos elétrons através da monocamada. Entretanto monocamadas de 11amu demonstram comportamento isolante, apresentando uma R_{tc} 250 vezes maior e I_p significativamente menores que a observada para a SAM-3amp. As cargas de dessorção redutiva e variação de massa obtidas com a MECQ para a SAM mista evidenciaram alto recobrimento da superfície e um mecanismo de adsorção que varia com o tempo de incubação do substrato em solução contendo os tiois. Assim, a configuração da superfície com domínios de 3amp bem estabelecidos é alcançada com 20 horas de incubação do substrato. O perfil observado com a voltametria cíclica, aliado aos dados obtidos com a EIE comprova a existência de segregação de fases na SAM mista contendo regiões recobertas pelo 3amp (raio médio de 4,3 μm) circundadas por 11amu (com separação média de 75,42 μm). O estudo do comportamento eletroquímico do fisetin confirma o surgimento de propriedades diferenciadas com a SAM mista, onde observou-se apenas um processo redox sem que o analito permanecesse adsorvido na superfície da SAM. Todavia para a SAM-3amp e ouro não modificado foi observado dois processos redoxes seguido de adsorção irreversível do produto da reação na superfície eletródica. Utilizando a SAM mista como sensor eletroquímico para determinação de fisetin em água alcançou-se um limite de detecção de $1,67 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

ABSTRACT

Self-assembled monolayers obtained by chemisorption of alkanethiols on gold present well-defined, organized and reproducible structures. The unique properties exhibited by such surfaces, allied to the great facility to obtain, have attracted the interest of the scientific community and caused a significant advance in the nanotechnology research, especially in the surface engineering one. In this work, the modification of gold substrate with a mixture of 3-mercaptopropionic acid and 11-mercaptoundecanoic acid was evaluated. The aim was control the surface of the SAMs in order to obtain an island arrangement of 3mpa isolated by 11mua, similar to an array of ultramicroelectrodes. The mixed-SAM was built by the incubation of Au substrate in an ethanolic solution containing both thiols. The redox couple $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ study demonstrated that pure 3mpa monolayers behaves like the bare gold surface, presenting barely the same parameters of peak current (I_p), peak potential (E_p) and charge transfer resistance (R_{ct}), since it allows the electronic transference to occurs by quantum tunneling effect through the monolayer. On the other hand the 11mua monolayers showed an insulating behavior and a R_{ct} value nearly 250 times greater and, consequently, I_p values significantly less than that for 3mpa. The reductive desorption charges and mass changes obtained with an EQCM for the mixed-SAM indicated the high coverage of gold surface and a adsorption mechanism that depends on the incubation time of the substrate in the thiols solution. The surface configuration with 3mpa domains is reached after 20 hours of immersion. The cyclic voltammetric profile, together with the data from electrochemical impedance spectroscopy, proved the existence of phases segregation in the mixed-SAM with surface regions covered solely by 3mpa (with mean radius of 4.3 μm) surrounded by 11mua with a mean separation of 75.42 μm . The electrochemical behavior of the flavonoid fisetin confirms the rising of differentiated properties with the mixed-SAM, where only one electrochemical process was able to be observed, without irreversible adsorption of the analyte. For 3mpa and bare gold surfaces, two (or more) electrochemical processes were observed together with the blocking of the electrode surface by irreversible adsorption of the reaction product. The utilization of the mixed-SAM with electrochemical sensor for fisetin determination in pure water yielded a detection limit of $1.67 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Representação de uma molécula de tiol adsorvida sobre ouro onde $\alpha = 30^\circ$, sendo este o ângulo de inclinação da cadeia carbônica em sua orientação padrão.....	17
Figura 2:	Representação esquemática do processo de organização da SAM. (A) adsorção física espontânea, (B) adsorção química espontânea, (C) organização não espontânea por mecanismo de nucleação e (D) monocamada auto-organizada densamente empacotada.....	20
Figura 3:	Representação de uma molécula de alcanotiol adsorvida sobre ouro (superfície em amarelo). Os ângulos α , β e δ são os ângulos que determinam a configuração padrão da monocamada.....	23
Figura 4:	Representação das faces de um cristal de quartzo recoberto com ouro e suas respectivas áreas geométricas. (A) Face exposta à solução. (B) Face que vibra de acordo com a frequência de ressonância.....	33
Figura 5:	Estrutura fundamental de um flavonóide.....	37
Figura 6:	Estrutura química do fisetin.....	39
Figura 7:	Representação esquemática da célula eletroquímica utilizada durante os experimentos.....	43
Figura 8:	Célula eletroquímica utilizada nos experimentos com Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo.....	46
Figura 9:	Rampa de potenciais utilizados para determinar a A_e do eletrodo de ouro policristalino a partir do oxigênio adsorvido sobre a superfície. (a) rampa utilizada quando $E_\lambda < 1,46$ V e (b) quando $E_\lambda > 1,46$ V. $a = 0,68$ V, $b = 1,46$ V e $t_{des} = 240$ s.....	49
Figura 10:	Fórmulas estruturais dos tiois utilizados para obtenção das SAMs.....	50
Figura 11:	Modelo de circuito equivalente utilizado para análise dos dados obtidos com os gráficos de plano complexo obtidos com a EIE.....	52
Figura 12:	Voltamograma cíclico do eletrodo convencional de ouro policristalino em $HClO_4$ 0,05 mol L^{-1} a 20 $mV s^{-1}$ (vs ERH - eletrodo de referência de hidrogênio).....	55
Figura 13:	Variação da Q_{exp} em função de E_λ , as linhas vermelhas mostram regiões de linearidade.....	57
Figura 14:	Voltamogramas cíclicos em tampão BR 0,1 mol L^{-1} pH 3,0 contendo 6,0 mmol L^{-1} do par redox $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ a 100 $mV s^{-1}$ para (—) ouro, (—) SAM-11amu, (—) SAM-3amp e (—) SAM mista obtida com incubação do substrato em uma solução etanólica contendo 1,0 mmol L^{-1} de 11amu e 0,4 mmol L^{-1} de 3amp por um período de 20 horas.....	60
Figura 15:	Voltamogramas lineares para ouro limpo (—), SAM-11amu (—), SAM-3amp (—) e SAM mista, obtida com incubação do substrato de ouro em solução etanólica contendo 0,4 mmol L^{-1} de 3amp e 1,0 mmol L^{-1} de 11amu por um período de 20 horas (—). Eletrólito NaOH 0,1 mol L^{-1} e velocidade de varredura de 20 $mV s^{-1}$	62
Figura 16:	Seqüência de recobrimento do substrato durante a formação da SAM.....	63
Figura 17:	(a) Voltamogramas ciclos utilizando a SAM mista como eletrodo de trabalho com velocidade de varredura de 2 (—), 5 (—), 10 (—), 20 (—), 40 (—), 60 (—) e 80 $mV s^{-1}$ (—). Eletrólito suporte tampão BR 0,1 mol L^{-1} pH 3,0 contendo 6,0 mmol L^{-1} do par redox $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$. (b) Gráfico de I_{po} vs v (●) e I_{po} vs $v^{1/2}$ (●).....	65
Figura 18:	Espectros de plano complexo obtidos para o ouro limpo (●), SAM-3amp (■), SAM-11amu (◆) e SAM-mista (▲) obtida com incubação do substrato de ouro em solução etanólica contendo 0,4 mmol L^{-1} de 3amp e 1,0 mmol L^{-1} de 11amu por um período de 20 horas. Eletrólito suporte tampão BR 0,1 mol L^{-1} pH 3,0 contendo 6,0 mmol L^{-1} de $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$. Faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz, onda senoidal de 10 mV aplicada no Epo observado com a VC. As linhas ultrapassando os identificadores são os resultados de simulação com <i>software</i> empregando o circuito de Randles modificado.....	67

Figura 19: (a) Voltamogramas cíclicos para SAM-11amu (—), SAM-3amp (—) e SAMs mistas obtidas com incubação do substrato de ouro em solução etanólica contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de 11amu e 3amp nas concentrações de: $6,9 \times 10^{-5}$ (—); $1,2 \times 10^{-4}$ (—); $2,4 \times 10^{-4}$ (—); $4,0 \times 10^{-4}$ (—); $5,0 \times 10^{-4}$ (—); $6,0 \times 10^{-4}$ (—) e $2,4 \times 10^{-2}$ (—) mol L^{-1} . Detalhe do gráfico com I_{po} (■) e E_{po} (●), para as SAMs mistas, em função da concentração de 3amp em solução de incubação do substrato. Eletrólito tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,0 contendo $6,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, velocidade de varredura 100 mV s^{-1} . Tempo de incubação do substrato de 150 minutos.....	70
Figura 20: Representação da configuração da SAM mista formada por ilhas de 3amp circundadas por moléculas de 11amu e as regiões com contribuição de transporte de massa difusional linear e hemisférico semi-infinito.....	71
Figura 21: (a) Voltamogramas cíclicos para SAMs mistas obtidas com incubação do substrato de ouro em solução etanólica contendo $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 3amp e $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de 11amu por um período de (—) 5 minutos, (—) 5 h, (—) 10 h, (—) 20 h, (—) 30 h, (—) 40 h, (—) 50 h, (—) 68 h e (—) 96 h. Eletrólito tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, velocidade de varredura 100 mV s^{-1} . Detalhe no gráfico: Respostas de I_{po} (■) e E_{po} (●) em função do tempo de incubação.....	73
Figura 22: Dessorção de SAMs mistas obtidas com incubação do cristal de quartzo recoberto com ouro em solução etanólica contendo $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 3amp e $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de 11amu por um período de (a) 0,08 h, (b) 10 h, (c) 20 h e (d) 96 h. Eletrólito NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} . (—) voltamogramas lineares e (—) massogramas resultantes do monitoramento da varredura linear. Varredura para potenciais mais negativos.....	74
Figura 23: Valores de Δm vs ΔQ obtidos para a Figura 21, onde se observa a região de dessorção de domínios ricos em 3amp - A (—), região de transição de fases - B (—) e domínios ricos em 11amu - C (—).....	78
Figura 24: Valores de M_{ads} vs Δm da região de transição de fases observada na Figura 23 para as SAMs mistas obtidas com (a) 10, (b) 20 e (c) 96 horas de incubação do substrato em solução dos tiois precursores.....	81
Figura 25: Representação da distribuição das moléculas de 3amp (●) e 11amu (●) para as SAMs mistas. O inset corresponde a representação da distribuição dos tiois na região de transição de fases (●).....	82
Figura 26: Espectros de plano complexo obtidos para o ouro limpo (●) e SAM mista (◆). Eletrólito suporte tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,0 contendo $6,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$. Faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz, onda senoidal de 10 mV aplicada no E_{po} observado na Figura 14 para cada superfície. As linhas ultrapassando os identificadores são os resultados de simulação com <i>software</i> empregando o circuito de Randles modificado.....	88
Figura 27: Relação de Z' vs $\omega^{-1/2}$ observada para a SAM mista.....	89
Figura 28: Relação de Z'' vs $\omega^{-1/2}$ observada para a SAM mista.....	90
Figura 29: Representação da SAM mista formada por domínios ricos em 3amp (●) com raio de 4,30 μm circundados por uma região inativa de raio 37,71 μm formados por moléculas de 11amu (●).....	91
Figura 30: Voltamograma cíclico obtido em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $6,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ com velocidade de varredura de 5 mV s^{-1} para a SAM mista. Inset: voltamograma cíclico utilizando um ultramicroeletrodo de ouro não modificado de 25 μm de diâmetro a 100 mV s^{-1} no mesmo eletrólito suporte.....	92
Figura 31: Voltamogramas cíclicos para o eletrodo de ouro (a), SAM-3amp (b), SAM-11amu (c) e SAM mista (d), obtidos em eletrólito tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,0 (—), contendo $4,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de fisetin (—) e novamente em eletrólito puro após 10 varreduras cíclicas na presença de fisetin (—). Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}	94
Figura 32: Mecanismo de oxidação proposto para o fisetin em soluções tamponadas.....	95

Figura 33: Efeito do pH no E_{po} (●) e I_{po} (●) para a oxidação do fisetin sobre a SAM mista em tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ contendo 4,0 mmol L ⁻¹ de fisetin.....	96
Figura 34: pK_a para os hidrogênios ionizáveis do fisetin (a), da SAM-3amp (b) e da SAM-11amu (c).....	97
Figura 35: Voltamogramas cíclicos para a SAM mista em tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 5,0 contendo 0,4 mmol L ⁻¹ de fisetin nas velocidades de 10; 30; 40; 50; 75; 100; 150 e 200 mV s ⁻¹ . <i>Inset:</i> relação linear entre I_{po} e velocidade de varredura.....	98
Figura 36: (a) Voltamogramas de onda quadrada obtidos com fisetin nas concentrações de 1,96 x10 ⁻⁸ ; 2,91 x10 ⁻⁸ ; 3,85 x10 ⁻⁸ ; 4,76 x10 ⁻⁸ ; 5,66 x10 ⁻⁸ ; 7,41 x10 ⁻⁸ ; 8,26 x10 ⁻⁸ ; 9,09 x10 ⁻⁸ ; 9,91 x10 ⁻⁸ ; 1,3 x10 ⁻⁷ ; 1,45 x10 ⁻⁷ ; 1,74 x10 ⁻⁷ ; 1,87 x10 ⁻⁷ e 2,0 x10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ em tampão BR 0,1 mol.L ⁻¹ pH 5,0. $f = 60$ Hz, $\alpha = 70$ mV e $\Delta E_s = 1,0$ mV. (b) curva analítica de I_p (obtidas em 353 mV) em função da concentração de fisetin.....	100
Figura 37: Voltamogramas de onda quadrada obtidos em tampão BR 0,1 mol.L ⁻¹ pH 5,0 contendo 2,0 x10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ de fisetin. $f = 60$ Hz, $\alpha = 70$ mV e $\Delta E_s = 1,0$ mV com fisetin. Correntes resultantes da correção de linha de base dos voltamogramas.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Corrente e potenciais de pico referentes à oxi-redução do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$	66
Tabela 2: Dados obtidos com os espectros de plano complexo da Figura 18.....	68
Tabela 3: Dados obtidos com a dessorção das SAMs mistas.....	75
Tabela 4: Δm (em ng cm^{-2}) referentes às regiões A , B e C da Figura 23.....	80
Tabela 5: Comparação das respostas eletroquímicas com as Δm durante a dessorção das SAMs mistas....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SAM	<i>Self-assembled monolayer</i>
LB	Langmuir-Blodgett
STM	<i>Scanning Tunneling Microscopy</i>
STM-UHV	<i>Scanning Tunneling Microscopy - Ultrahigh Vacuum</i>
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
DRS	Deposição sob Regime de Subtensão
UME	Ultramicroeletrodo
SCE	Eletrodo Saturado de Calomelano
MCQ	Microbalança de Cristal de Quartzo
Δf	Variação de frequência
Δm	Variação de massa
MECQ	Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo
$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$	$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] / \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
3amp	Ácido 3-mercaptopropiônico
11amu	Ácido 11-mercapundecanóico
BR	Solução tampão Britton-Robinson
Ag/AgCl	Eletrodo de referência de Ag/AgCl/KCl 3 mol.L ⁻¹
PTFE	Politetrafluoretileno
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
E_λ	Potencial aplicado para formação do óxido de ouro
t_{ox}	Tempo de aplicação do E_λ
t_{des}	Tempo para dessorção de O ₂
Q_{exp}	Densidade de carga de redução experimental
Q_t	Densidade de carga de redução teórica
F_R	Fator de rugosidade
A_e	Área eletroquímica
A_g	Área geométrica
DR	Dessorção Redutiva em meio alcalino
I_p	Corrente de pico
E_p	Potencial de pico
R_s	Resistência da solução
R_{tc}	Resistência de transferência de carga
Z_w	Impedância de Warburg
CPE	Elemento constante de fase
VOQ	Voltametria de onda quadrada
A	Amplitude de pulso

ΔE_s	Incremento de potencial de varredura
f	Frequência de pulso
ERH	Eletrodo de referência de hidrogênio
SAM-3amp	Monocamada auto-organizada de ácido 3-mercaptopropiônico
SAM-11amu	Monocamada auto-organizada de ácido 11-mercaptoundecanóico
E_{po}	Potencial de pico de oxidação
E_{pr}	Potencial de pico de redução
I_{po}	Corrente de pico de oxidação
I_{pr}	Corrente de pico de redução
ΔQ	Variação da densidade de carga
M	Massa molar
n	Número de elétrons transferidos
M_{ads}	Massa molar da espécie desorvida
Q_r	Densidade de carga de redução da SAM
κ_{11amu}	Proporção de 11amu na região de transição de fases
κ_{3amp}	Proporção de 3amp na região de transição de fases
Φ_{11amu}	Distribuição de 11amu na região de transição de fases
Φ_{3amp}	Distribuição de 3amp na região de transição de fases
χ_{11amu}	Fração molar de 11amu na região de transição de fases
χ_{3amp}	Fração molar de 3amp na região de transição de fases
θ_{11amu}	Recobrimento da superfície com 11amu
θ_{3amp}	Recobrimento da superfície com 3amp
D_o	Coefficiente de difusão da espécie eletroativa (em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)
k_{app}	Constante de velocidade de transferência eletrônica heterogênea aparente
Z'	Impedância real
Z''	Impedância imaginária
ω	Frequência radial
R	Constante física dos gases
m	Inclinação da curva da impedância real (Z') vs $\omega^{-1/2}$ em regiões de altas frequências
σ_w	Coefficiente angular da impedância de Warburg
q	Frequência de transição radial
r_a	Raio das ilhas de 3amp formadas na SAM mista
r_b	Raio da região inativa ao redor das ilhas de 3amp
δ_{dom-3}	Quantidade de domínios ricos em 3amp
i_{lim}	Corrente limite para UME em estado estacionário
K_a	Constante de dissociação de ácidos
LD	Limite de detecção
S_b	Desvio padrão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS DE ALCANOTIÓIS	16
1.1.1. <i>A interface enxofre-metal</i>	17
1.1.2. <i>A cadeia carbônica do alcanotiol</i>	19
1.1.3. <i>O grupo terminal</i>	22
1.2. MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS CONTENDO DIFERENTES ADSORBATOS	25
1.2.1. <i>Co-adsorção com ambos os tióis precursores em solução</i>	27
1.2.2. <i>Substituição eletroquímica seletiva de tióis adsorvidos</i>	27
1.2.3. <i>Controle estrutural da superfície do substrato</i>	29
1.3. APLICAÇÃO DE SAMs EM ELETROANALÍTICA.....	31
1.4. MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO (MCQ)	33
1.5. FLAVONÓIDES	37
1.5.1. <i>Fisetin: Características, propriedades e métodos de determinação</i>	38
2. OBJETIVOS	41
3. METODOLOGIA	42
3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	42
3.2. MATERIAIS E INSTRUMENTOS PARA MEDIDAS ELETROQUÍMICAS.....	43
3.2.1. <i>Medidas voltamétricas</i>	43
3.2.2. <i>Medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica</i>	45
3.2.3. <i>Medidas com a Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo</i>	45
3.3. INSTRUMENTAÇÃO GERAL.....	47
3.4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	47
3.4.1. <i>Pré-tratamento da superfície dos eletrodos convencionais de ouro</i>	47
3.4.2. <i>Preparação das monocamadas auto-organizadas de alcanotióis</i>	50
3.5. CARACTERIZAÇÃO DAS MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS	51
3.5.1. <i>Estudos Voltamétricos</i>	51
3.5.2. <i>Estudos de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica</i>	52
3.5.3. <i>Medidas com a Microbalança eletroquímica de Cristal de Quartzo</i>	52
3.6. ESTUDO DO COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO Fisetin	53
3.6.1. <i>Estudo do mecanismo redox do fisetin</i>	53

3.6.2. Otimização dos parâmetros de análise para a construção da curva analítica.....	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1. PRÉ-TRATAMENTO DO ELETRODO.....	55
4.2. MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS MISTAS.....	58
4.3. MODIFICAÇÃO DO SUBSTRATO COM OS ALCANOTIOIS ÁCIDO 11-MERCAPTOUNDECANÓICO, ÁCIDO 3-MERCAPTOPROPIONICO E UMA MISTURA DE AMBOS.....	59
4.3.1. Estudo eletroquímico da composição superficial da SAM mista.....	69
4.3.1.1. Influência da concentração dos tiois na solução de incubação do substrato.....	69
4.3.1.2. Influência do tempo de incubação do substrato na organização da SAM mista.....	72
4.3.1.3. Distribuição de domínios ricos em 3amp e em 11amu na SAM mista.	76
4.3.2. Configuração superficial da SAM mista	86
4.4. ESTUDO DO COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO Fisetin	93
4.4.1. Estudo do mecanismo redox do fisetin.....	93
4.4.2. Construção da curva analítica para fisetin em água pura.....	99
4.4.2.1. Otimização dos parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada.....	99
4.4.2.2. Curva analítica.....	99
5. CONCLUSÃO	103

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INTRODUÇÃO

A ciência vem estudando mecanismos de reações e processos ocorridos em superfícies orgânicas, tais como membranas celulares, relativamente há poucas décadas. O estudo desses sistemas, apesar de extremamente importantes, tornava-se muito complexo uma vez que superfícies orgânicas reprodutíveis e bem definidas eram difíceis de serem obtidas ^[1]. Porém a descoberta de superfícies orgânicas formadas pela quimissorção de alcanotóis sobre ouro, gerando estruturas bem definidas, organizadas e reprodutíveis mudou profundamente este cenário nas últimas décadas ^[2]. Essas estruturas, chamadas de monocamada auto-organizada (SAM - *self-assembled monolayer*), permitiram elucidar sistemas complexos como a permeabilidade química, transferência eletrônica e comportamento de microambientes em membranas celulares. De fato, o uso desse método de modificação de superfícies e das propriedades exibidas por estes sistemas permitiu o desenvolvimento de sensores ^[3], biosensores ^[4], métodos de produção e estabilização de nanopartículas ^[5-7] e tecnologias litográficas ^[8] até então inviáveis utilizando outros métodos.

A princípio a primeira forma de auto-organização de moléculas orgânicas em substratos sólidos foi constatada pela formação de camadas de derivados de silanos sobre superfícies hidroxiladas de silício. Essa técnica de produção de monocamadas era impulsionada pela formação de polissilanos via ligação Si—O—Si ^[9]. Outra forma de produção de filmes finos foi descoberta por Blodgett, ao desenvolver uma técnica atualmente conhecida como Langmuir-Blodgett (LB) ^[10]. Os filmes são produzidos através da transferência de um filme de Langmuir, composto por moléculas anfifílicas na interface água-ar, para um substrato sólido. Desde então a técnica LB tem se expandindo para adsorção de diferentes tipos de moléculas compreendendo complexos metálicos ^[11], fosfolipídeos ^[12] e nanotubos de carbono modificados ^[13].

Na década de 90 uma nova forma de produção de filmes auto-organizados, desenvolvido por Nuzzo e Allara ^[14], chamou a atenção da comunidade científica. Os pesquisadores estudaram o comportamento de dissulfetos na presença de um substrato de ouro e observaram a formação espontânea de uma monocamada auto-organizada, resultando em uma estrutura ordenada e orientada. Mais tarde constatou-se que a adsorção dessas moléculas ocorria através da quimissorção dos tióis na superfície de ouro, formando uma ligação com caráter covalente, o que aumentava a estabilidade das monocamadas formadas, quando comparadas as demais técnicas de produção de filmes. Desde então, inúmeros trabalhos tem discutido o mecanismo de formação de monocamadas auto-organizadas, a partir da quimissorção de alcanotióis em superfícies de ouro ^[15-18].

1.1. Monocamadas auto-organizadas de alcanotióis

A SAM pode ser formada por imersão do substrato em solução contendo a molécula adsorvente, ou por deposição em vapor da molécula adsorvente no substrato sólido. As propriedades da SAM podem ser controladas a partir da escolha da molécula adsorvente, que por sua vez, está relacionada com a propriedade requerida na aplicação. Uma visão geral de uma molécula de tiol permite a identificação de três partes principais (Fig. 1): (1) o grupo cabeça contendo o átomo de enxofre que se ligará à superfície de ouro, (2) a cadeia de hidrocarbonetos responsável pela organização da SAM e (3) o grupo terminal que pode ter funcionalidade variável ^[19]. Cada parte da molécula apresenta uma função específica e determinante para a estabilidade da SAM

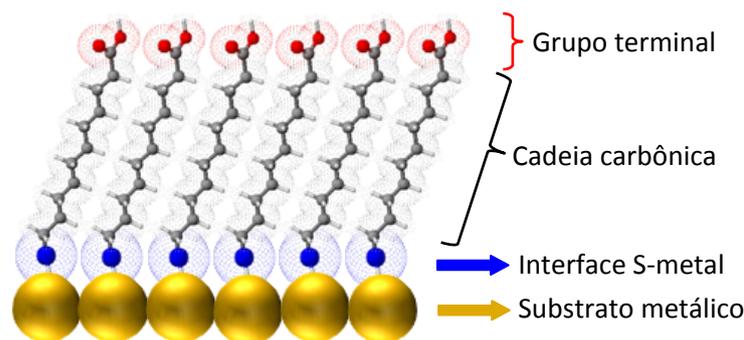


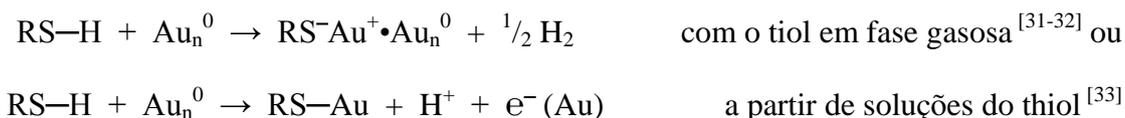
Figura 1: Representação de uma molécula de tiol adsorvida sobre ouro onde $\alpha = 30^\circ$, sendo este o ângulo de inclinação da cadeia carbônica em sua orientação padrão ^[8].

Várias técnicas têm sido usadas para estudar a quimissorção e organização das SAMs incluindo Elipsometria, medidas de Ângulos de Contato ^[20], Microbalança de Cristal de Quartzo ^[21], Voltametria Cíclica e Linear ^[22-23], Espectroscopia de Impedância Eletroquímica ^[24-25], Difração de raio-X ^[26-27], Microscopia de Força Atômica ^[28] e Microscopia de Varredura Eletroquímica ^[29]. As informações obtidas com estas técnicas providenciam evidências suficientes para se determinar qual a função específica de cada parte da molécula adsorvente no mecanismo de adsorção, organização e função exibida pela SAM.

1.1.1. A interface enxofre-metal

O grupo tiol RSH (adsorbato), é responsável pela adsorção da molécula na superfície do substrato (adsorvente) e, conseqüentemente, controla a energia associada à adesão da monocamada ao substrato. Devido a isso, têm-se empregado principalmente moléculas contendo grupos tíois para adsorção sobre ouro. A interação RS—Au é extremamente forte o que confere à SAM estabilidade adicional. Mesmo assim, diversas moléculas anfóteras têm sido usadas na obtenção de SAMs. Alguns estudos foram realizados empregando, como adsorbato, moléculas de derivados de silanos ^[30], alquil, alcoóis, entre outros ^[31].

A adsorção de alcanotióis sobre ouro ocorre em função da afinidade do enxofre da molécula RS— pelos átomos de ouro expostos na superfície metálica formando uma ligação RS—Au. De acordo com a literatura a reação pode ocorrer seguindo dois mecanismos diferentes dependendo do meio reacional em que a SAM é formada, podendo ser:



onde (RS⁻Au⁺•Au_n⁰) e (RS—Au) representam a adsorção do alcanotiol na superfície de ouro e (e⁻ (Au)) representa elétrons acumulados na superfície de ouro.

Não há consenso entre os pesquisadores a respeito da natureza da ligação S—Au, no entanto ela é melhor compreendida como uma interação forte entre o grupo RS— do tiolato e a superfície de ouro. O mecanismo de reação com formação de H₂ é deduzido a partir da formação de SAMs por deposição a vapor na ausência de oxigênio. Este cuidado evitaria a formação do óxido de ouro e conseqüente adsorção do tiol por interação com a camada de óxido superficial.

Como substratos para modificação podem ser citados superfícies de metais de transição como Pt^[34], Au^[15], Ag^[35], Cu^[36], Ni^[37], Fe^[38], Pd^[39] e até mesmo Hg^[40] (o qual consiste em um substrato com a superfície virtualmente livre de defeitos por ser líquido). A interação substrato-alcanotiol varia de acordo com a natureza do substrato, estrutura da superfície de adsorção e obviamente, com a estrutura química do alcanotiol utilizado. Essas interações podem variar desde ligações covalentes a interações eletrostáticas, a energia envolvida entre uma ligação RS—Au, por exemplo, está na ordem de 40 kcal mol⁻¹ (cerca de 170 kJ mol⁻¹), uma energia que pode ser considerada como uma ligação covalente^[31, 41]. Essa energia da ligação RS—Au é o principal motivo de SAMs de tíois sobre ouro apresentarem

uma notável estabilidade quando comparada a outras técnicas de produção de filmes monomoleculares.

Monocamadas auto-organizadas também podem ser formadas a partir de dialquil-dissulfetos, no entanto o mecanismo de adsorção envolvido se baseia na quebra homolítica da ligação RS—SR e formação da ligação de RS—Au. Evidências desse mecanismo se baseiam na formação de monocamadas a partir de um dialquil-dissulfeto assimétrico ($X(CH_2)_nSS(CH_2)_nZ$) contendo proporções iguais de $X(CH_2)_nS—Au$ e $Z(CH_2)_nS—Au$ [19, 42]. No entanto a organização tanto de moléculas de tióis ou ditióis na superfície do substrato ocorre pelo mesmo mecanismo: interações laterais entre as cadeias carbônicas. Logo a discussão a respeito da natureza dessas interações torna-se relevante para compreender a formação de SAMs.

1.1.2. A cadeia carbônica do alcanotiol

Após a adsorção das moléculas de alcanotiol na superfície do substrato, interações do tipo van der Waals, entre as cadeias de hidrocarbonetos de moléculas vizinhas, impulsionam a organização das moléculas fazendo com que a monocamada torne-se mais compacta. A energia associada a essa interação está na ordem de $7,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ (por grupo metileno) [19].

Termodinamicamente a organização de uma SAM não é espontânea, visto que a entropia do sistema diminui, todavia a energia adquirida entre as interações laterais da cadeia carbônica é suficiente para sobrepor essa barreira energética [43]. Por isso, apesar da adsorção dos alcanotióis ser espontânea a organização demanda tempo [44]. Novamente, não há um consenso entre os pesquisadores quanto ao tempo necessário para se obter uma SAM densamente empacotada. De acordo com a literatura a organização pode levar de segundos [45]

a horas ^[44] ou dias ^[46] para se obter o máximo de recobrimento possível da superfície do substrato.

A investigação de estruturas formadas por monocamadas permaneceu intuitiva durante décadas devido à ausência de ferramentas que permitissem estudar como as moléculas se orientavam e como se organizavam a nível molecular ^[47]. No entanto com o desenvolvimento da microscopia de varredura por tunelamento (STM – *Scanning Tunneling Microscopy*) foi possível estabelecer e analisar estruturas detalhadamente, monitorando inclusive a adsorção *in situ* de moléculas nos seus substratos ^[48-49]. Tentando elucidar o mecanismo de organização de alcanotióis sobre ouro, Poirier ^[50] realizou um estudo usando STM-UHV (*Ultrahigh Vacuum*) acompanhando a organização de SAMs desde baixos recobrimentos até a formação de SAMs densamente empacotadas. Os resultados revelaram que o recobrimento abaixo da saturação de um substrato de Au(111) por moléculas de decanotiol ocorre de tal forma que se indentifica a formação de diferentes fases (Fig. 2).

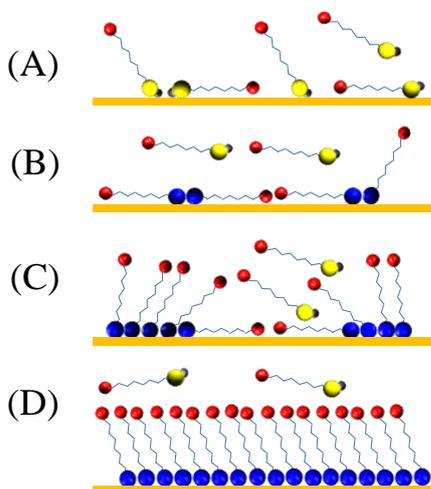


Figura 2: Representação esquemática do processo de organização da SAM. (A) adsorção física espontânea, (B) adsorção química espontânea, (C) organização não espontânea por mecanismo de nucleação e (D) monocamada auto-organizada densamente empacotada ^[50].

A primeira fase se assemelha a moléculas de gás adsorvido aleatoriamente sobre a superfície, no entanto a partir de um recobrimento crítico as moléculas se condensam e formam-se ilhas alinhadas paralelamente a superfície do substrato. Ao aumentar o

recobrimento as moléculas tendem a se alinhar verticalmente a superfície do plano do substrato. Nesta etapa a organização começa a ser evidenciada e as interações de van der Waals tornam-se cada vez mais numerosas, resultando no aumento discreto do ângulo entre as cadeias carbônicas e a superfície do substrato. A fase mais densa da SAM, onde o recobrimento máximo é alcançado, se forma por meio de um mecanismo de nucleação^[46]. As ilhas que se formam e se organizam impulsionam a adsorção de outras moléculas em sítios próximos, que se alinham com a fase densa, assim aumentando o recobrimento^[51].

Como a organização das moléculas inicia-se com as interações de van der Waals entre moléculas vizinhas, esperava-se que SAMs formadas por moléculas cadeia longa apresentassem maior estabilidade que aquelas formadas por moléculas de cadeia curta. Isso é exatamente o que acontece experimentalmente^[52]. Este fato tem sido estudado e confirmado por diversos pesquisadores. Bain et. al.^[15, 53] estudou o comportamento de SAMs formadas por alcanotióis de diferentes comprimentos de cadeia carbônica avaliando o ângulo de contato formado em água e em hexadecano. Os resultados mostraram que alcanotióis com estrutura $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{SH}$ com $n < 8$ formam SAM desordenadas. Resultados semelhantes foram obtidos por Gorham et. al.^[27] ao avaliarem o comportamento de SAMs com cadeias carbônicas de diferentes comprimentos na presença de hidrogênio atômico. Eles observaram que SAMs com comprimentos de cadeia maiores exibiam maior resistência à erosão que as de cadeias curtas. Neste mesmo raciocínio o grupo de Waring et al.^[54] avaliou a foto-oxidação e a penetração de SAMs com diferentes comprimentos de cadeia carbônica e concluíram que cadeias longas são mais resistentes à penetração e foto-oxidação de cadeias curtas.

Uma observação interessante foi descoberta por Shao et al.^[55] ao investigar a influência da cadeia carbônica em SAMs compostos por moléculas quirais. Eles descobriram que o comprimento da cadeia carbônica influencia não só a estabilidade da SAM, mas também a quiralidade da molécula. Logo, essa propriedade pode ser usada para construir

dispositivos de reconhecimento molecular, uma vez que moléculas quirais podem reconhecer especificamente outras moléculas quirais, tais como em separação de enantiômeros [3].

Contudo a organização da SAM não é dirigida somente pela cadeia carbônica, o grupo terminal também desempenha um papel importante na organização, além de atribuir a monocamada funcionalidades específicas.

1.1.3. O grupo terminal

A representação de monocamadas como estruturas estáticas não representam a realidade destes sistemas. SAMs também apresentam movimentos vibracionais e rotacionais que variam de acordo com a estrutura química da molécula adsorvente [41]. Evidências desse comportamento podem ser encontradas no trabalho realizado por Evans et al. no qual constatou que SAMs em contato com o ar continuam a se reorganizar para diminuir a energia livre de superfície [56]. Essa reorganização acontece porque as moléculas não estão totalmente rígidas na superfície do substrato, elas mantêm determinada flexibilidade e podem responder a variações na energia ambiente.

Quanto mais densa a monocamada, mais rígido é o filme formado sobre o substrato, no entanto o empacotamento da SAM está relacionado com a estrutura do adsorbato e obviamente com as condições da superfície adsorvente. Na Figura 3 se mostra como as moléculas podem adotar uma determinada configuração durante sua organização. Para monocamadas de alcanotíóis contendo $-\text{CH}_3$ como grupo terminal os ângulos típicos são $\alpha = 30^\circ$, $\beta = 55^\circ$ e $\delta = 14^\circ$ [19]. Essa configuração é determinada pelo volume que o grupo terminal e os grupos metílenos da cadeia carbônica ocupam no espaço [57]. Isso ocorre porque a área seccional ocupada pelo grupo tiol adsorvido na superfície do substrato é de aproximadamente

21,7 Å², enquanto as cadeias alquílicas formadas por metilenos ocupam uma área de somente 18,4 Å² [41]. Dessa forma as interações de van der Waals entre moléculas vizinhas apresentam um máximo de estabilidade com a cadeia ligeiramente inclinada em relação ao plano da superfície.

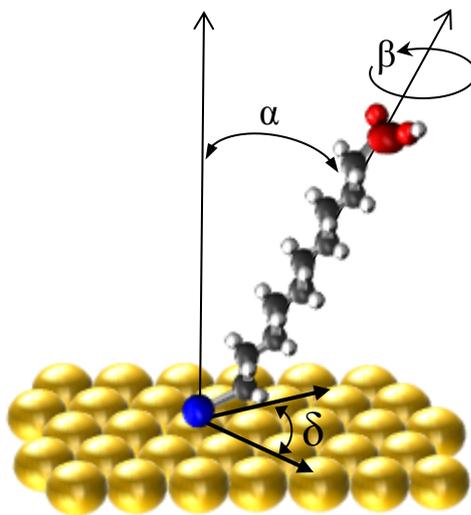


Figura 3: Representação de uma molécula de alcanotiol adsorvida sobre ouro (superfície em amarelo). Os ângulos α , β e δ são os ângulos que determinam a configuração padrão da monocamada [19].

Contudo, em alguns casos o grupo terminal apresenta um volume relativamente maior que a área ocupada pelo grupo tiol adsorvido, portanto a inclinação da monocamada passa a ser influenciada mais pela disposição do grupo terminal do que pelo grupo adsorvido no substrato. Esse é o caso para SAM produzidas a partir de alcanotióis ω -funcionalizados com grupos grandes como ferrocenos [58], ditióis [19] ou carboxila [59]. Se esses grupos são capazes de formar interações intermoleculares fortes entre eles, tais como ligação de hidrogênio, sua influência sobre a organização da SAM torna-se ainda mais evidente.

De acordo com um estudo realizado por Brewer et al. [59] SAMs obtidas de alcanotióis terminados com grupos carboxílicos e alcoóis são marcadamente mais resistentes a fricção do que SAMs terminadas em grupos metilenos. Em contraste as SAMs terminadas em alcoóis não se diferem no comportamento de resistência à fricção daquelas com terminações carboxílicas. Ainda empregando microscopia de fricção, Kelley et al. [60] avaliaram a

reconstrução de SAMs com diferentes grupos terminais ($-\text{COOH}$, $-\text{SH}$, $-\text{OH}$ e $-\text{CH}_3$) empregando a técnica de AFM (*Atomic Force Microscopy*). Com este estudo eles observaram que a orientação das moléculas na SAM variavam com a função do grupo terminal. SAMs terminadas em $-\text{OH}$ e $-\text{CH}_3$ demonstravam uma orientação vertical. As demais funções tinham sua orientação afetada por dimerizações (no caso de SAMs terminadas em $-\text{SH}$).

É evidente que o grupo terminal de monocamadas não influencia somente a organização das moléculas na superfície do substrato. Uma vez que as terminações de SAMs são responsáveis pela interface com o meio reacional, a escolha da funcionalidade do grupo terminal é crucial para o desempenho requerido ^[61]. Logo, mudanças do grupo terminal implicam na alteração das propriedades físicas e químicas da SAM e isso tem sido intensamente explorado para produção de superfícies diferenciadas ^[19, 62-64].

Talvez o exemplo mais comum de alteração das propriedades superficiais de uma SAM seja a mudança de um grupo terminal $-\text{CH}_3$ por grupos polares, dessa forma a monocamada passa de um comportamento hidrofóbico para hidrofílico ^[5]. Há exemplos em que SAMs contendo alcanotóis ω -funcionalizados com $-\text{OH}$, $-\text{CN}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{CONHR}$, são usados para imobilização de proteínas ^[65-66], introdução de cargas na superfície da SAM ^[67], estabilização de nanopartículas metálicas ^[68] e até mesmo produção de superfícies com atividades bactericidas ^[69].

Como a função do grupo terminal também pode influenciar a organização da SAM, alguns pesquisadores, vislumbrando a possibilidade de se obter uma superfície com múltiplas funcionalidades, estudaram o comportamento de monocamadas obtidas a partir de uma mistura de alcanotóis com diferentes grupos terminais ^[53, 70-71]. Com isso uma questão de suma importância foi levantada: quais seriam as interações que levam a segregação de fases em monocamadas binárias? E como controlá-las?

1.2. Monocamadas auto-organizadas contendo diferentes adsorbatos

Ainda hoje o mecanismo de formação de SAMs por co-adsorção de diferentes tióis (SAM mista) não é inteiramente compreendido. Alguns estudos mostram a formação de fases segregadas enquanto outros mostram a formação de uma mistura homogênea.

Como exemplo tem-se o estudo realizado por Bain et al. ^[70], o qual avaliou a formação de monocamadas a partir de uma solução etanólica contendo $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ e $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{OH}$. Analisando o ângulo de contato formado com água e hexadecano sobre a SAM mista, os autores concluíram que não se observa a formação de fases segregadas, mas sim uma mistura homogênea. Neste caso, o comprimento da cadeia carbônica influencia diretamente a formação da mistura homogênea. Isso ocorre por que as interações de van der Waals entre as cadeias carbônicas são as mesmas para ambos os tióis. No entanto alterando o solvente empregado, pode se favorecer a adsorção de um dos tióis em relação ao outro. Em solventes polares observa-se que a adsorção do componente apolar é favorecida devido às interações entre os grupos metilenos serem favorecidas pela baixa solvatação do tiol. A situação inversa também é observada, onde em solventes apolares a adsorção do componente mais polar é favorecida.

Mais tarde, Folkers et al. ^[72] analisaram a formação de uma SAM a partir da mistura de tióis de cadeia longa e curta contendo grupos terminais $-\text{CH}_3$ e $-\text{OH}$ chegando à conclusão de que possivelmente forma-se fases segregadas com dimensões microscópicas. A segregação de fases é o resultado da diferença de interações entre tióis de cadeia longa e curta, onde a estabilidade da interação é longa-longa > curta-curta > longa-curta. Têm-se ainda a influência do grupo terminal, onde ilhas do tiol terminado em $-\text{OH}$ podem formar ligações de hidrogênio entre as moléculas e estabilizar ainda mais o domínio formado por essas ilhas.

Um estudo realizado por Lewis et al.^[73] demonstrou a possibilidade de induzir a formação de fases diferentes em uma monocamada utilizando um tiol com funcionalidades presentes na cadeia carbônica da molécula. Ao empregar alcanotióis contendo amidas em sua estrutura química, os autores observaram a formação espontânea de fases diferentes na monocamada confirmadas por STM. A separação de fases é impulsionada pela formação de ligações de hidrogênio na parte interna da SAM. Essas interações intermoleculares internas fazem com que a estrutura de rede formada por ilhas dos alcanotióis amida-substituídos seja diferente da estrutura adotada pela fase formada por *n*-alcanotióis^[71].

Uma forma pouco comum de se obter uma monocamada binária com fases diferentes consiste na adsorção de um segundo componente em uma SAM previamente produzida. O segundo componente se adsorve nos sítios de vacância da monocamada existente, formando assim uma SAM mista com fases distintas. Utilizando essa metodologia Frasconi et al.^[74] produziu uma SAM mista contendo fases de β -ciclodextrina e ferrocenil-alcanotióis. Moléculas contendo grupos terminais muito volumosos induzem a formação de uma SAM com sítios livres para a adsorção entre as moléculas já adsorvidas, ao tratar a monocamada pré-existentes com um segundo alcanotiol que possa acessar os sítios não ocupados forma-se uma monocamada com dois componentes segregados, onde o segundo componente se adsorve nos interstícios da SAM previamente formada. É importante ressaltar que a extensão da segregação de fases é de curto alcance, visto que a adsorção do segundo componente ocorre somente nos defeitos da SAM primária causados pelo grupo terminal volumoso. Em alguns casos o pesquisador usa exatamente a presença de defeitos para obtenção de uma SAM mista. Como exemplo tem-se um estudo realizado por Fontaine et al.^[75] no qual os autores formam uma SAM primária, intencionalmente defeitos, para então adsorver um segundo componente nos sítios não ocupados.

Até o presente momento foi apresentado somente a co-adsorção de tióis como forma de produção de SAM mista, todavia existem três maneiras principais para isso, (i) a partir da imersão em solução contendo ambos os tióis precursores ^[8], por substituição eletroquímica seletiva de tióis adsorvidos ^[76] e por controle estrutural da superfície do substrato ^[77]

1.2.1. Co-adsorção com ambos os tióis precursores em solução

A co-adsorção de tióis em solução frequentemente produz monocamadas com componentes misturados homogeneamente. A obtenção de uma SAM mista com fases bem organizadas e separadas com a simples imersão do substrato em solução dos tióis precursores, exige atenção a alguns fatores importantes. Deve-se escolher tióis com estruturas químicas que garantam interações laterais mais estáveis com moléculas com a mesma estrutura ^[71]. Dessa forma a formação de ilhas contendo majoritariamente um dos componentes da mistura será favorecida e a SAM mista apresentará domínios distintos ^[73, 78].

Em resumo, ilhas com diferentes domínios e diâmetros podem ser obtidas a partir do controle da fração molar e estrutura química dos tióis precursores, tempo de adsorção e condições superficiais do substrato ^[33, 71].

1.2.2. Substituição eletroquímica seletiva de tióis adsorvidos

Quando se deseja a formação de uma SAM mista com fases distintas, mas os componentes da mistura são estruturalmente semelhantes, a co-adsorção simultânea não pode ser empregada, visto que a probabilidade de se formar uma mistura homogênea é grande ^[79].

Logo, outro método deve ser empregado, sendo a substituição eletroquímica seletiva uma opção interessante.

A substituição eletroquímica seletiva é realizada em duas etapas. A primeira etapa consiste na formação de uma SAM mista por co-adsorção de tióis com estruturas químicas diferentes para criar a plataforma artificial com fases separadas^[80]. Para isso emprega-se uma mistura contendo um dos componentes desejados e um tiol que possa ser desorvido seletivamente da superfície aplicando um determinado potencial. A desorção do tiol cria vacâncias na monocamada que podem ser ocupadas pelo segundo componente^[76]. Na segunda etapa a SAM-mista é obtida pela imersão do substrato contendo somente o primeiro componente (e regiões de vacâncias) em uma solução do segundo componente da mistura. Com isso têm-se uma SAM mista com fases segregadas mesmo que os tióis sejam estruturalmente semelhantes.

Alguns pesquisadores têm adotado essa forma de produção de SAMs mistas para obter uma superfície com propriedades químicas diferentes. O trabalho realizado por Hobara et al.^[76] pode ser citado como um exemplo, nele os autores obtiveram sucesso na produção de uma SAM mista com domínios distintos de 1-undecanotiol e ácido 11-mercaptoundecanóico ou 1-hexadecanotiol. A mistura de tióis utilizada inicialmente para obtenção de uma plataforma artificial continha 1-undecanotiol e ácido 3-mercaptopropiônico, este último foi seletivamente desorvido por aplicação de um potencial no qual somente os domínios do ácido 3-mercaptopropiônico seriam afetados. Os domínios de ácido 11-mercaptoundecanóico ou 1-hexadecanotiol foram obtidos pela imersão do substrato contendo 1-undecanotiol em soluções do segundo componente.

Phong et al.^[80] também obtiveram SAMs mistas contendo domínios ricos em ácido 10-mercaptodecanóico e 11-amino-1-undecanotiol por substituição eletroquímica seletiva

empregando 2-hidroxi-1-etanotiol para obtenção de uma plataforma com segregação de fases artificial.

Com essa metodologia, controlando o potencial aplicado, pode-se substituir o tiol que apresentar o potencial menos negativo para a dessorção redutiva pelo tiol requerido. A vantagem desse método é a formação de domínios pré-estabelecidos dos tióis, os quais podem ser controlados pela fração molar das espécies em solução responsáveis pela formação da plataforma artificial. Com isso, a dissolução de um tiol em outro formando domínios homogêneos pode ser evitada ^[8, 76].

1.2.3. Controle estrutural da superfície do substrato

A distribuição dos domínios de diferentes tióis em uma SAM pode ser obtida também pelo controle estrutural da superfície do substrato. Utilizando a Deposição sob Regime de Subtensão (DRS) de um metal sobre o substrato, sítios heterogêneos são gerados a nível molecular. Imergindo o substrato em solução contendo um dos tióis forma-se uma SAM sobre toda a superfície. No entanto os sítios gerados com a DRS podem ser dissolvidos aplicando um potencial para oxidação do metal. Assim formam-se ilhas com a superfície do substrato exposta. Para a obtenção de uma SAM mista basta que o substrato seja imerso em uma solução contendo o segundo tiol, o qual adsorverá sobre os sítios expostos, formando assim domínios distintos ^[77].

Inicialmente a DRS foi utilizada para avaliar a organização de SAMs verificando a presença de sítios de vacância na superfície, ou estudar a influência da DRS na organização da monocamada ^[81]. Assim Shimazu et al. ^[77] aplicaram a DRS de chumbo sobre ouro, para controlar a composição de uma SAM mista a nível molecular. Os autores estudaram as

combinações de n-alcanotióis com ácido 3-mercaptopropiônico, depositando primeiramente uma SAM do n-alcanotiol sobre a superfície de ouro contendo a DRS de chumbo. Em seguida efetuavam a dissolução da DRS e imergiam o substrato em solução contendo o ácido 3-mercaptopropiônico. A quantidade de sítios da superfície do substrato ocupada pelo segundo componente da SAM mista, o ácido 3-mercaptopropiônico, foi calculada indiretamente com precisão a partir da deposição de chumbo e dessorção redutiva da SAM mista. Os autores concluíram que a estrutura obtida com as combinações de tíois e controle da DRS é análogo a um conjunto de nanoeletrodos, o que possibilita a aplicação desses sistemas como sensores analíticos.

Para o caso de monocamadas mistas formadas por uma espécie que permita transferência de carga e outra completamente isolante, com fases distintas, é coerente afirmar que a SAM mista provavelmente assimile uma característica de um arranjo de ultramicroeletrodos (UMEs). UMEs são definidos como eletrodos que apresentam ao menos uma de suas dimensões na ordem de micrômetros e perfil voltamétrico sigmoidal^[82].

O principal interesse analítico nesses sistemas se deve a elevada corrente limite de difusão exibida por microeletrodos^[82]. Em UMEs o transporte de massa ocorre por difusão hemisférica semi-infinita, o que implica no aumento da taxa de espécies que se aproximam da superfície do eletrodo num dado instante de tempo e, conseqüentemente, no aumento da corrente limite de difusão observada numa voltametria linear^[83-84]. Para aplicações eletroanalíticas é interessante empregar um arranjo de ultramicroeletros para a obtenção de valores de correntes mais expressivos, uma vez que medidas realizadas com um único ultramicroeletrodo apresentam normalmente correntes na ordem de nanoampères a picoampères, enquanto um arranjo de UMEs exibiu uma considerável discriminação da relação sinal/ruído em favorecimento do sinal analítico e correntes na ordem dos microampères^[85].

1.3. Aplicação de SAMs em eletroanalítica

A aplicação de SAMs em eletroanalítica também tem sido muito explorada, visto que monocamadas bem organizadas e compactas oferecem vantagens tais como seletividade, sensibilidade, curto tempo de resposta, e sobrepotencial reduzido em reações eletrocatalíticas [2, 4, 9, 43, 86-87]. Vários trabalhos têm demonstrado que a modificação da superfície eletródica pode afetar sensivelmente a velocidade de transferência eletrônica entre compostos eletroativos e o eletrodo. Se a cinética de transferência eletrônica ocorre por um processo de sobreposição com interação fraca entre reagentes e a superfície do eletrodo, a modificação superficial do eletrodo não afetará expressivamente o processo eletroquímico. Todavia, se essa interação é forte, a modificação da superfície eletródica pode controlar e alterar significativamente este processo [88]. Por isso o uso de SAMs em eletroanalítica como uma forma de controle da modificação da superfície do eletrodo a nível molecular tem atraído tanta atenção nos últimos anos na produção de sensores eletroquímicos [89] e biossensores [2, 87].

Algumas SAMs têm exibido estabilidade em intervalos de potencial de +0,8 a -1,4 V (vs SCE – Eletrodo Saturado de Calomelano), portanto dentro da janela de potencial compatível com aplicações eletroquímicas. A janela de potencial em que uma SAM permanece estável é dependente da integridade da monocamada e pode ser usada para auxiliar e controlar a formação da monocamada na superfície do eletrodo.

As monocamadas auto-organizadas foram utilizadas pela primeira vez por Malem e Mandler, utilizando uma SAM de ácido 3-mercaptopropiônico eles separaram os potenciais de oxidação do ácido ascórbico da dopamina [92]. Com o mesmo propósito Ohsaka e Raj [93] desenvolveram um eletrodo modificado com uma SAM de um complexo de níquel obtendo bons resultados na determinação de dopamina. Outras moléculas de interesse biológico tais

como noradrenalina ^[94], tiamina ^[95] citocromo-c ^[96] e lipossomos ^[97] também tem sido estudadas empregando SAMs

Monocamadas auto-organizadas também têm sido utilizadas como plataforma para imobilização de nanotubos de carbono alinhados perpendicularmente com o plano da superfície ^[98]. Rahman et al. ^[99] utilizaram uma SAM de cisteamina (2-amino-etanotiol) para imobilizar nanotubos de carbono via ligação covalente através da reação de acoplamento com carbodiimida. Com a mesma metodologia Guiseppi-Elie et al. ^[100] construíram um conjunto de ultramicroeletrodos com nanotubos de carbono empregando SAMs de cisteamina e 11-amino-1-undecanotiol.

Mas outra forma de produção de monocamadas para aplicações analíticas tem-se destacado nos últimos anos. Monocamadas contendo dois ou mais componentes tem atraído considerável atenção dos pesquisadores devido à possibilidade infinita de produção de superfícies com arranjos em duas, ou até mesmo três dimensões, e propriedades anisotrópicas. Um exemplo elegante do uso de superfícies multifuncionais geradas por monocamadas mistas é a imobilização de enzimas para construção de biossensores. Park et al. ^[101] utilizando a metodologia de substituição eletroquímica seletiva produziram uma SAM mista contendo domínios bem estabelecidos de ditiobis-*N*-succinimidil-propionato e tetradecanotiol. Em seguida imobilizaram covalentemente enzimas *Horseradish peroxidase* sobre os domínios de ditiobis-*N*-succinimidil-propionato, visto que a enzima não forma ligações covalentes com o *n*-alcanotiol.

Humblot et al. ^[102] também utilizaram uma SAM mista de 6-mercaptohexanol e ácido 11-mercaptoundecanóico para imobilizar Magainin I, um composto com atividade bactericida e fungicida. A SAM mista foi produzida por co-adsorção com ambos os tióis em solução e a imobilização do Magainin I foi procedida por reação de acoplamento com carbodiimida.

No entanto outras aplicações são conhecidas, tais como, revestimento de superfícies contra corrosão, obtenção de superfícies impermeáveis, controle de fricção e lubrificação, obtenção de propriedades adesivas, sistemas modelos para estudo de química de superfície, entre outros^[103].

1.4. Microbalança de Cristal de Quartzo (MCQ)

A microbalança de cristal de quartzo fundamenta-se no efeito piezoelétrico de um cristal de quartzo com depósitos metálicos em ambas as faces dos cristais (Fig. 4). O efeito piezoelétrico corresponde à propriedade de certos materiais responderem a deformações ou pressões externas gerando um campo elétrico proporcional a força imposta^[104].



Figura 4: Representação das faces de um cristal de quartzo recoberto com ouro e suas respectivas áreas geométricas. (A) Face exposta à solução. (B) Face que vibra de acordo com a frequência de ressonância^[104].

O efeito inverso, isto é, a geração de uma deformação no cristal devido à aplicação de um campo elétrico externo fazendo com que as variações mecânicas no cristal possam seguir da mesma maneira as variações do campo elétrico aplicado, é conhecido como efeito piezoelétrico reverso.

Se a perturbação elétrica apresentar características específicas de amplitude e frequência (determinadas pela geometria do cristal), uma onda acústica transversal é gerada e se propaga através do cristal de um modo ressonante. Essa forma de oscilação é chamada de

oscilação no modo de cisalhamento do cristal. A propagação da onda acústica acarreta em uma vibração dos átomos do cristal paralelo a superfície, assim se um material é depositado, ocorre uma redução nesse deslocamento e a frequência de ressonância do cristal diminui ^[105]. Esse é o princípio de funcionamento da MCQ, onde o campo elétrico é aplicado sobre o depósito metálico de uma das faces do cristal de quartzo, estando a outra face ligada ao terra e monitorando a frequência de ressonância do cristal.

Como a onda acústica gerada com a excitação elétrica se propaga pelo cristal, o ângulo de corte em relação ao eixo do monocristal exerce influência na velocidade de propagação sendo que cada corte exibi diferentes propriedades. Para o cristal de quartzo existem três tipos de corte principais, AT, BT e SC, sendo o corte AT o mais utilizado para estudos eletroquímicos por sofrer menor influência com a variação de temperatura. A frequência fundamental de vibração do cristal de quartzo pode variar, sendo as mais utilizadas entre 5 e 10 MHz, por apresentarem facilidade de manuseio e excelente sensibilidade.

No decorrer da medida experimental a variação na frequência correspondente a adição ou subtração de massa na superfície do cristal de quartzo é descrita pela equação de Sauerbrey:

$$\Delta f = - \left(\frac{2 f_0^2}{A (\mu_q \rho_q)^{\frac{1}{2}}} \right) \Delta m = -K \Delta m \quad \text{equação 1}$$

onde Δf é a variação de frequência de ressonância em Hz, A é a área geométrica piezoelectricamente ativa em cm^2 (definida pela área de intersecção entre os depósitos metálicos das duas faces do quartzo na Figura 4 B), f_0 é a frequência fundamental do cristal, μ_q é o modo de cisalhamento do quartzo, ρ_q é a densidade do quartzo e Δm representa a variação da massa na superfície do cristal. Para um cristal com corte AT a temperatura

ambiente $K = 0,0566 \text{ Hz } /(\text{ng cm}^{-2})$. Isto permite medidas com variação de massa menores que 1 ng cm^{-2} [106].

Todavia a **equação 01** foi desenvolvida para condições de aplicação no vácuo, sendo que para sistemas aquosos a Δf pode variar em função de propriedades do solvente tais como viscosidade, densidade e pressão hidrostática, ou ainda em função da rugosidade e hidrofília ou hidrofobia da superfície do depósito sobre o cristal. Em pequenas variações de frequência como na deposição de monocamadas os efeitos causados pelo solvente ou pela superfície do depósito podem ser expressivos [106-107].

O emprego da equação de Sauerbrey em sistemas com variação de massa exige a consideração de alguns fatores importantes como:

- Os filmes devem estar rigidamente ligados ao depósito metálico;
- As variações de frequência observadas devem ser menores que 2 % da frequência de ressonância fundamental do cristal;

Ao tratarmos de filmes muito finos tais como monocamadas de tióis adsorvidos sobre o depósito de ouro na superfície do cristal é viável a suposição de que as variações de frequência podem ser atribuídas a variações de massa.

Quando aquisição de dados com a MCQ é realizada simultaneamente com experimentos eletroquímicos, a técnica é comumente chamada de Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (MECQ). A geração da onda acústica é da mesma forma que a discutida anteriormente. A monitoração do transporte de massa em sistemas eletroquímicos permite ao usuário da técnica obter informações mecânicas e cinéticas a respeito de processos de adsorção ou dessorção. Dessa forma Karpovich e Blanchard [108] utilizaram a MECQ para determinar a cinética de adsorção de 1-octadecanotiol e 1-octanotiol utilizando como solvente n-hexano. Os autores acompanharam a formação da SAM *in situ*, mas apenas nos primeiros segundos, tentando dessa forma aproximar a adsorção de tióis a um

comportamento definido por isoterma de Langmuir. Todavia, como já mencionado no texto, as interações laterais entre as cadeias carbônicas são tão intensas que não podem ser simplesmente ignoradas.

Mais tarde Kim et al. ^[109] estudaram a cinética de adsorção de tióis $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{n-1}\text{SH}$ (com $n = 8, 12$ e 16) observando um comportamento que pode ser separado em dois passos, primeiro uma adsorção rápida e em seguida um processo de organização da SAM. Contudo os autores observaram que o comportamento da adsorção muda com o solvente utilizado. Ao analisar a formação da SAM de 1-dodecanotiol em hexano notam-se dois processos distintos, a adsorção rápida e a organização, mas durante a formação da mesma monocamada em etanol, verifica-se apenas um processo, adsorção lenta.

Outra forma de se avaliar a composição de uma SAM consiste no monitoramento da variação de massa durante o processo de dessorção redutiva de monocamadas, dessa forma é possível comparar a Δm com a carga de dessorção dos dados eletroquímicos. Utilizando essa metodologia Sato e Mizutani ^[110] determinaram a composição real de uma SAM mista obtida a partir dos tióis ácido 3-mercaptopundecanóico e 1-octadecanotiol. Informações a respeito de processos de solvatação, presença de domínios diferentes ou integridade da SAM, podem ser obtidas a partir da análise simultânea dos dados eletroquímicos e de variação de massa ^[21].

Um estudo realizado por Kawaguchi et al. ^[111] avaliou o comportamento da dessorção de SAMs contendo apenas um componente de n-alcanotióis e ácidos mercaptoalcanóicos empregando a MECQ. Os resultados demonstraram a existência de domínios com estabilidades diferentes em todas as SAMs causadas por diferenças no empacotamento das monocamadas induzidas pela rugosidade do substrato. Com a variação de massa também foi possível verificar a adsorção simultânea de cátions durante o processo de dessorção sobre as SAMs de ácidos mercaptoalcanóicos, causada principalmente pela atração

eletrostática entre cátions e grupos ácidos desprotonados, visto que o eletrólito era fortemente alcalino.

1.5. Flavonóides

Flavonóides são compostos polifenólicos com estrutura química variável, onde seu núcleo fundamental contém 15 átomos de carbono (Fig. 5). Os flavonóides podem ser divididos em grupos segundo sua estrutura química e biossíntese, os quatro grupos principais são as flavonas, flavonóis, antocianinas e os catecóis ^[112]. As principais diferenças entre os grupos são a presença ou não da ligação insaturada entre o C2 e C3 e o número e posição de substituintes hidroxilas nas demais posições.

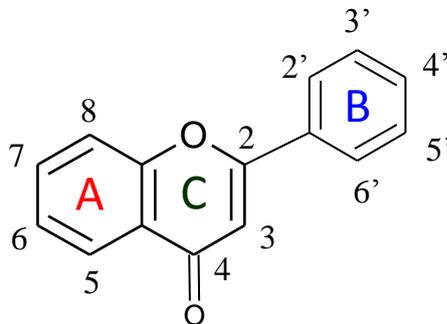


Figura 5: Estrutura fundamental de um flavonóide.

Atualmente existem mais de seis mil estruturas conhecidas de flavonóides, das quais aproximadamente quatro mil são de origem natural, sendo produzidas principalmente por frutas e vegetais. Estes compostos são conhecidos por sua potente ação antioxidante antiinflamatória, antialérgica, antivirais, antitumorais e eficiência no tratamento de doenças cardiovasculares ^[113]. Devido a essas características, os flavonóides vêm sendo intensamente

investigados, principalmente por indústrias farmacêuticas e alimentícias, visto que o potencial de mercado para essas substâncias é extraordinário.

Obviamente, a atividade bioquímica dos flavonóides está relacionada com a estrutura química dos mesmos, onde o número e a posição de substituintes —OH nos anéis **A** e **B** constituem o fator mais importante (Fig. 5) ^[114]. A extensa cadeia carbônica π -conjugada e a presença de grupos hidroxilas nos anéis aromáticos **A** e **B**, principalmente nas posições 3',4', permitem a esses polifenóis atuarem como agentes doadores de átomos de hidrogênio a radicais peróxidos, finalizando a propagação da cadeia radicalar e formando a quinona correspondente ^[115-117].

O fisetin é um exemplo de flavonóide contendo substituintes —OH nas posições 3',4', estando presente em alimentos tais como frutas cítricas, morango, uva, gengibre, cebola e pepino, por exemplo ^[118]. Como esta é a molécula alvo do presente estudo, faz-se necessário conhecer um pouco mais sobre ela.

1.5.1. Fisetin: Características, propriedades e métodos de determinação

O fisetin (3,7,3',4'-tetrahidroxiflavona - Fig. 6) é um flavonóide com ação neurotrófica capaz de diferenciar células nervosas ativando sinais extracelulares regulados por Quinases. Quinases são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas através da transferência de um grupo fosforila de ATP e, em casos excepcionais, de GTP, para treonina, serina ou resíduos de tirosina. Por este motivo, o fisetin é capaz de reverter declínios no processo cognitivo relacionados à idade, visto que sua interação específica com Quinases faz com que aumente o número de conexões entre os neurônios ^[119-121].

A atividade antiinflamatória do fisetin também tem sido estudada recentemente levando os pesquisadores a concluírem que ele atua não só interagindo com Quinases, mas também na ativação de fatores nucleares importantes para o tratamento de processos inflamatórios^[122].

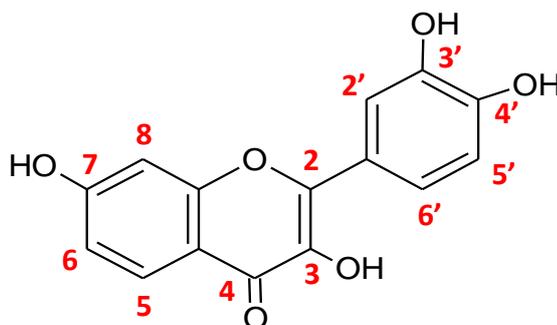


Figura 6: Estrutura química do fisetin.

Alguns estudos da atividade antioxidante do fisetin envolvendo técnicas eletroquímicas têm demonstrado que o processo de oxidação do composto é dependente do pH do meio, onde os primeiros grupos a se oxidarem são as —OH nas posições C4' e C3', formando a quinona correspondente. Na seqüência, o grupo —OH na posição C3 oxida-se após um rearranjo intramolecular em que a quinona formada no processo anterior se converte novamente a —OH ^[123]. Este rearranjo com a formação de anel com o grupo hidroxil em C3, é formado também quando o fisetin encontra-se no seu estado eletronicamente excitado^[113].

Quantitativamente o fisetin tem sido determinado por técnicas cromatográficas^[124], eletroforéticas^[125] e eletroquímicas^[126], no entanto são poucos os trabalhos com este objetivo. Como exemplo têm-se o trabalho realizado por Brondani et al.^[118], no qual utilizou nanopartículas de ouro dispersas em líquido iônico e um complexo binuclear de níquel imobilizado sobre sílica a fim de se obter um sensor para fisetin. O limite de detecção do sensor foi de $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ utilizando a voltametria de onda quadrada como técnica de análise.

Jiang et al. ^[124] utilizaram a cromatografia eletroforética capilar para determinar fisetin e outros flavonóides em amostras de própolis. Com esta técnica os autores alcançaram um limite de detecção para o fisetin de $2,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ o que não possibilitou a detecção do mesmo em amostras reais de própolis.

Uma alternativa para construção de sensores foi idealizada por Moccelini et al. ^[127] que aplicaram monocamadas auto-organizadas de ácido 3-mercaptopropiônico e um complexo de níquel para determinação de catequina. Com este sensor os pesquisadores obtiveram um limite de detecção de $8,26 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

Visto a relevância do fisetin na manutenção do organismo humano fica clara a necessidade de se desenvolver métodos de determinação em amostras reais, visto a grande atenção dada à pesquisa deste composto como potencial medicamento para diversas doenças associadas ao envelhecimento. Dessa forma, as informações levantadas acima motivaram a aplicação de monocamadas auto-organizadas mistas como uma proposta de sensor para determinação de fisetin.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi preparar, modificar e caracterizar eletrodos de ouro recobertos com uma monocamada mista auto-organizada dos ácidos 3-mercaptopropiônico e 11-mercaptoundecanóico e verificar a influência da modificação na determinação do flavonóide fisetin em água.

Os objetivos específicos foram:

- Otimização da concentração dos tiois na solução etanólica de incubação do substrato de ouro, visando à formação de uma SAM mista com segregação de fases.
- Investigação do mecanismo de formação da SAM mista e sua relação com o tempo de incubação do substrato a partir da dessorção redutiva empregando a MECQ.
- Caracterização das monocamadas auto-organizadas contendo a mistura de tiois pela análise do comportamento eletroquímico do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ na interface SAM-eletrólito empregando voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica em meio tamponado.
- Estudo da influência da modificação da superfície do substrato com a monocamada mista no comportamento eletroquímico do fisetin.
- Comparação entre as respostas voltamétricas referentes à oxi-redução do fisetin na superfície de ouro com as obtidas sobre monocamadas dos tiois puros e com a monocamada mista.

3. METODOLOGIA

3.1. Reagentes e soluções

O ácido 3-mercaptopropiônico (3amp), o ácido 11-mercapundecanóico (11amu) e a 3,3',4',7-tetrahidroxiflavona (fisetin) foram obtidos da Sigma-Aldrich. O hexacianoferrato de potássio trihidratado, o hexacianoférrico de potássio anidro e o hidróxido de sódio, foram adquiridos da J.T. Baker. O ácido sulfúrico 98,0 %, o ácido nítrico 65,0 % têm procedência Mallinckrodt e Qhemis, respectivamente. O peróxido de hidrogênio 30,0 % (m:v) foi adquirido da Tec-Lab. O álcool etílico absoluto anidro (etanol) foi obtido da J.T. Baker.

Os reagentes utilizados no preparo da solução tampão Britton-Robinson (BR), NaClO_4 anidro, H_3PO_4 85,0 %, H_3BO_3 anidro e CH_3COOH glacial foram todos adquiridos da Merck. Os reagentes, HCl 36,0 %, AgNO_3 , KCl e Hg_2Cl_2 , e mercúrio metálico, utilizados para o preparo dos eletrodos de referências de $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ 3 mol.L⁻¹(Ag/AgCl) e Eletrodo Saturado de Calomelano (SCE) foram obtidos da J.T.Baker. Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico e usados como recebidos, sem prévia purificação. Todas as soluções foram preparadas com água purificada no sistema Milli-Q com resistividade de 18 $\text{M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ (Millipore Inc.).

O protocolo de limpeza adotado no presente estudo consistia no tratamento de todo o material em duas soluções. Um tratamento oxidante empregando solução sulfonítrica (H_2SO_4 + HNO_3 3:1, v:v, ambos concentrados) e um tratamento químico com solução etanólica de NaOH (10 g de NaOH dissolvidos em 500 mL de etanol) . Os materiais de vidro e de politetrafluoretileno (PTFE) foram imersos em ambas as soluções por 30 minutos, em seguida, enxaguados com água purificada em abundância. Tal procedimento garante a eliminação de resíduos orgânicos e metálicos adsorvidos no material.

Para o preparo da solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, misturou-se iguais volumes das soluções NaClO_4 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, H_3BO_3 $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, H_3PO_4 $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ e CH_3COOH $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$. O pH da solução foi ajustado com adição de NaOH $5,0 \text{ mol.L}^{-1}$.

3.2. Materiais e instrumentos para medidas eletroquímicas

3.2.1. Medidas voltamétricas

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT30/Autolab® utilizando o *software* GPES.

Célula eletroquímica

Para as medidas eletroquímicas utilizou-se uma célula eletroquímica de vidro borossilicato de compartimento único de 25 mL com tampa de PTFE contendo orifícios de encaixe para três eletrodos (Fig. 7). Os três eletrodos foram: (i) um contra-eletródo de placa de platina (com $0,2 \text{ cm}^2$), (ii) um eletródo de referência de Ag/AgCl (para medidas realizadas em meios ácidos) ou SCE (para medidas realizadas em meio alcalino) e (iii) um eletródo de trabalho de ouro com área geométrica de $0,031 \text{ cm}^2$ da superfície exposta à solução.

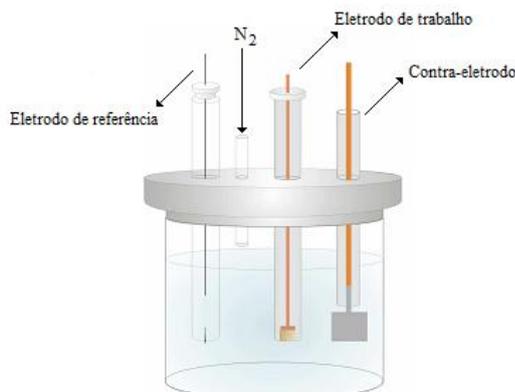


Figura 7: representação esquemática da célula eletroquímica utilizada durante os experimentos.

Eletrodo de referência

O eletrodo de referência Ag/AgCl/KCl 3,0 mol L⁻¹ foi construído embutindo um fio de prata, previamente polido com lixas 600 e anodizado em uma solução de HCl 0,3 mol L⁻¹, em um compartimento próprio completamente preenchido com solução de KCl 3,0 mol L⁻¹ contendo alguns cristais de AgNO₃. A anodização do fio de prata em solução de HCl é necessária para formar um filme de cloreto de prata na superfície do fio.

Para a construção do eletrodo de calomelano saturado (SCE), adicionou-se uma pequena quantidade de mercúrio em um tubo de vidro contendo um fio de platina para contato elétrico. Em seguida preparou-se uma pasta, obtida com a mistura de cloreto mercurioso, mercúrio e algumas gotas de solução de KCl saturado. Preencheu-se o volume vazio do tubo contendo mercúrio deixando um espaço para vedação com fibra de amianto. Logo após inseriu-se o tubo contendo mercúrio e pasta de cloreto mercurioso em um compartimento próprio contendo solução saturada de KCl, cuidando para que não se formassem bolhas de ar.

Contra-eletrodo

Utilizou-se uma placa de platina com 1,0 cm² de área geométrica, soldada a um fio de platina e embutido em tubo de vidro. Antes dos experimentos aquecia-se o contra-eletrodo em chama redutora e lavava-se o eletrodo com água Milli-Q.

Eletrodos de trabalho (eletrodos convencionais de ouro)

Os eletrodos de trabalho foram construídos embutindo fios de ouro com 2,0 mm de diâmetro em um cilindro de PTFE. Para o embutimento do fio de ouro fez-se um orifício com 1,5 mm de diâmetro no cilindro. Em seguida o PTFE foi aquecido em banho de água quente, enquanto um pequeno fio de Au com 0,5 cm de comprimento foi mantido em água pura com gelo. Após um período de 20 minutos o fio de ouro foi retirado do banho de gelo e

imediatamente embutido no PTFE ainda aquecido. Após as temperaturas chegarem ao valor de temperatura ambiente, os eletrodos foram polidos com lixas d'água (grids 600 – 1200 – 2000 e 2500), até a exposição de um disco do metal.

3.2.2. Medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Para a realização dos experimentos de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) utilizou-se os mesmos materiais das medidas voltamétricas. Os experimentos foram realizados em um potenciostato PGSTAT30/ Autolab® acoplado a um microcomputador e controlado pelo software FRA. Os espectros de plano complexo foram analisados com o *software Electrochemistry-ZView2*. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente após desaeração da solução por 10 minutos com borbulhamento de N₂.

3.2.3. Medidas com a Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo

As medidas com a Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (MECQ) foram realizadas utilizando a RQCM/Maxtek acoplada a um potenciostato PGSTAT30/Autolab, interfaceados pelos programas RQCM e GPES, respectivamente. O eletrodo de trabalho utilizado no estudo consistia em um cristal de quartzo, com corte AT de frequência fundamental de ressonância de 5 MHz, e sensibilidade calculada de 0,056 Hz /ng cm⁻².

A fim de diminuir a interferência de ruídos na leitura, os experimentos foram realizados em uma gaiola de Faraday. Todavia, os gráficos de variação de massa (Δm) em função do potencial (E), foram previamente tratados com um filtro FFT do *software Origin*

8.0 (OriginLab Corp., MA, USA). Os filtros foram devidamente utilizadas preservando as características dos dados originais.

Célula eletroquímica

As medidas com a MECQ foram realizadas em uma célula eletroquímica adaptada ao probe que comporta o cristal de quartzo (eletrodo de trabalho). A Figura 8 mostra o desenho esquemático da célula eletroquímica, a qual contém uma tampa de PTFE e orifícios para encaixe do probe, eletrodo de referência, contra-eletrodo e entrada e saída de gás nitrogênio. O volume total desta célula é de 100 mL.

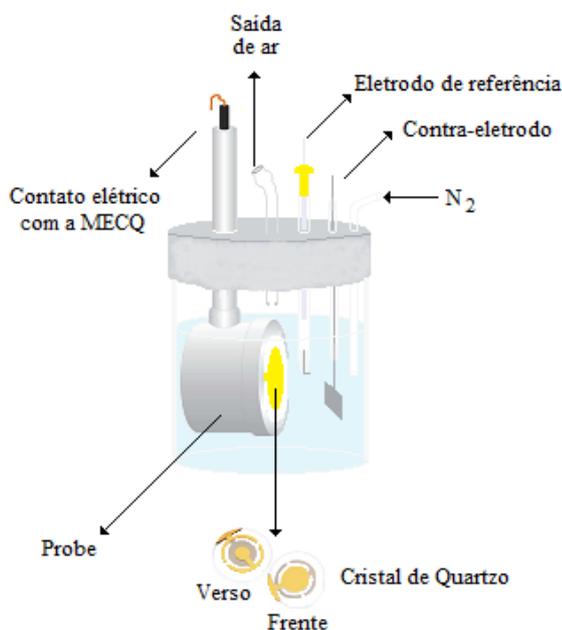


Figura 8: Célula eletroquímica utilizada nos experimentos com Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo

A escolha do projeto da célula visou minimizar ao máximo os ruídos nas leituras de Δm e a pressão hidrodinâmica sobre os cristais de quartzo.

Cristal de quartzo

Inicialmente todos os experimentos foram realizados com eletrodos de ouro embutidos em PTFE. Na seqüência realizou-se medida com o cristal piezo-elétrico de quartzo recoberto com um filme de ouro em ambas as faces como na Figura 4.

3.3. Instrumentação Geral

Utilizou-se uma balança analítica Mettler Toledo da Micronal S/A modelo AL 204 para pesagens.

Para ajustes e medidas de pH utilizou-se um pH-metro Qualxtron modelo 8010.

O ultrassom utilizado na etapa de limpeza dos eletrodos convencionais de ouro foi adquirido da Unique (Ultrassom MaxiClean modelo 1450 com frequência de 25 kHz).

3.4. Procedimentos Experimentais

3.4.1. Pré-tratamento da superfície dos eletrodos convencionais de ouro

O pré-tratamento da superfície do eletrodo de ouro convencional foi realizado segundo a metodologia adotada por Tkac e Davis ^[128]. O procedimento é dividido em quatro etapas, (i) redução eletroquímica de contaminantes orgânicos em meio alcalino, (ii) polimento mecânico, (iii) oxidação química e (iv) polimento eletroquímico.

A redução eletroquímica foi realizada aplicando-se um potencial de -1,3 V (vs SCE) por 60 segundos no eletrodo ao qual seria produzida a SAM. O eletrólito suporte consistia em uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹.

O polimento mecânico foi realizado usando lixas d'água grid 600, 1200, 2000 e 2500, seguida de um polimento em suspensão de alumina (1:5 de alumina:água) utilizando tecido de polimento como base para fricção. O polimento seguia até que as superfícies apresentassem um aspecto espelhado. A cada troca da granulometria, seja da lixa d'água ou de alumina, todo o conjunto era lavado com água destilada e os eletrodos sonicados em água purificada por cinco minutos para remoção de partículas residuais.

A oxidação química de possíveis contaminantes adsorvidos foi realizada por imersão dos eletrodos em uma solução “piranha” (1:3 de H₂O₂ e H₂SO₄, respectivamente, ambos concentrados) por 5 minutos. Posteriormente os eletrodos foram lavados exaustivamente com água purificada.

A etapa de polimento eletroquímico foi procedida empregando a voltametria cíclica variando o potencial de 0,0 a 1,7 Volts (vs Ag/AgCl) utilizando como eletrólito suporte solução de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ e variando a velocidade de varredura com 100 ciclos a 1 V s⁻¹, 50 ciclos a 0,5 V s⁻¹, 25 ciclos a 0,25 V s⁻¹ e 10 ciclos a 0,1 V s⁻¹. A cada velocidade de varredura o eletrólito suporte era trocado e o conjunto da cela eletroquímica lavado com água.

Como as respostas eletroquímicas das superfícies de Au de alta pureza são bem conhecidas ^[129], os perfis voltamétricos obtidos foram utilizados também como critério para a observação do perfeito funcionamento dos eletrodos.

O fator de rugosidade, tanto do cristal de quartzo (exposta à solução) quanto dos eletrodos de ouro, foi determinado pelo método proposto por Rand e Woods ^[130]. De acordo com o procedimento, aplica-se um potencial inicial por 10 segundos, garantindo a redução dos óxidos previamente formados e em seguida forma-se uma camada de AuO aplicando um

potencial E_λ por 100 segundos (t_{ox}). Imediatamente após a formação de AuO, aplica-se uma varredura de potenciais para reduzir o óxido formado. Um segundo ciclo de oxidação e redução é usado para avaliar a linha de base e assim calcular a carga de redução do óxido formado no potencial E_λ (Figura 9).

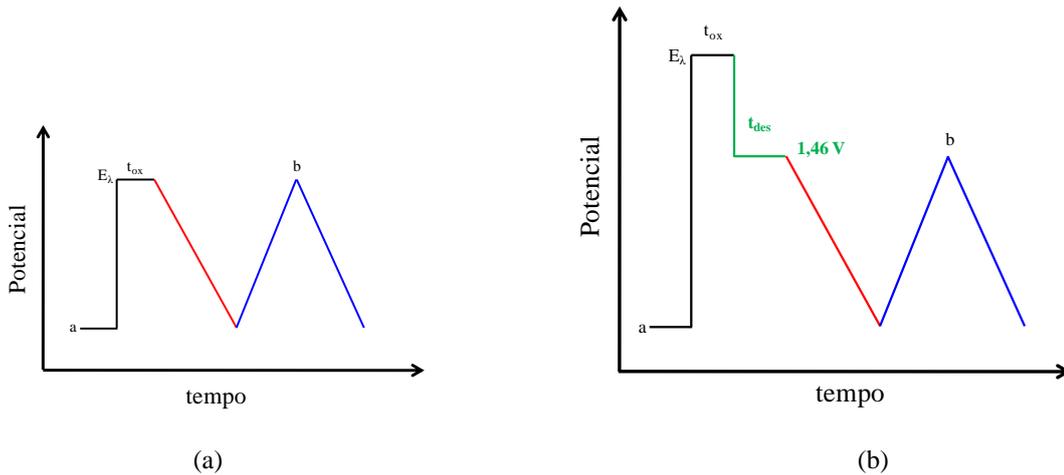


Figura 9: Rampa de potenciais utilizados para determinar a A_e do eletrodo de ouro policristalino a partir do oxigênio adsorvido sobre a superfície. (a) rampa utilizada quando $E_\lambda < 1,46$ V e (b) quando $E_\lambda > 1,46$ V. $a = 0,68$ V, $b = 1,46$ V e $t_{des} = 240$ s.

Aplicando-se uma integral definida sobre a região de corrente faradaica do pico de redução observado com a primeira varredura para potenciais mais negativos e dividindo-se a área encontrada pela velocidade de varredura e pela área geométrica do eletrodo, obtêm-se a densidade de carga de redução experimental (Q_{exp}) do óxido superficial do substrato de ouro.

Identificada a Q_{exp} correspondente a formação de uma monocamada de AuO sobre o eletrodo, compara-se o valor com o valor teórico ($Q_t = 390 \mu C \text{ cm}^{-2}$) usando a equação ^[131]:

$$F_R = \frac{Q_{exp}}{Q_t} = \frac{A_e}{A_g} \quad \text{equação 2}$$

onde A_e é a área eletroquímica e A_g a área geométrica do eletrodo.

Para os cristais de quartzo o procedimento de limpeza adotado consistia apenas no tratamento químico com solução “piranha” e polimento eletroquímico com voltametria cíclica

em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. No entanto o fator de rugosidade foi determinado com a mesma metodologia empregado para os eletrodos de ouro convencionais.

3.4.2. Preparação das monocamadas auto-organizadas de alcanotióis

Realizou-se a adsorção dos alcanotióis nas superfícies eletródicas previamente limpas por imersão dos eletrodos de ouro na solução etanólica do respectivo alcanotiol, na concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ por um período de 20 horas. Após o período de imersão, o substrato de ouro foi novamente lavado com etanol (para retirar moléculas fracamente adsorvidas), com água pura e seco em temperatura ambiente. Só então procedeu-se com a caracterização da modificação da superfície do substrato. Os tiois utilizados nesse estudo foram o ácido 3-mercaptopropiônico (3amp), o ácido 11-mercaptoundecanóico (11amu) e uma mistura de ambos (Fig. 10).

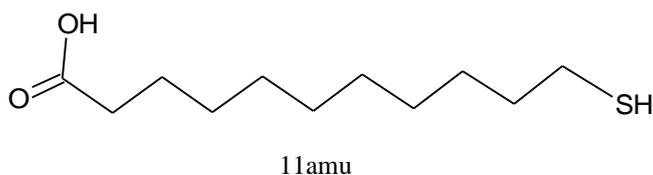
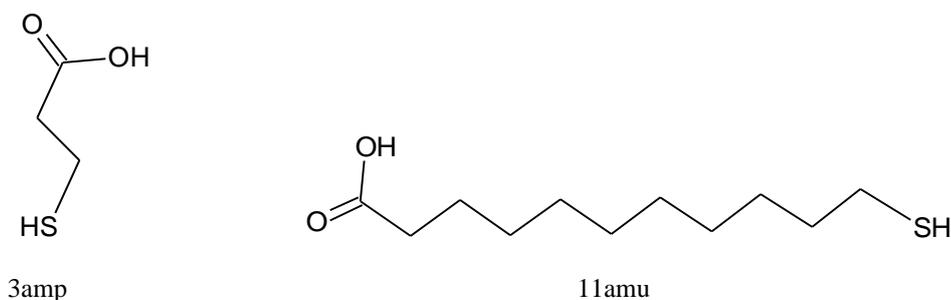


Figura 10: Fórmulas estruturais dos tiois utilizados para obtenção das SAMs

Para a obtenção da monocamada auto-organizada mista contendo ambos os precursores (SAM mista), tanto a concentração dos tiois quanto o tempo de imersão do substrato, foram avaliadas empregando a voltametria cíclica, a EIE e a DR acompanhada pela variação de massa empregando a MECQ.

As SAMs mistas foram obtidas a partir da combinação binária entre os tióis 3amp e 11amu. Para todas as soluções contendo ambos os tióis a concentração de 11amu foi fixada em $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, enquanto a concentração de 3amp variou de $6,9 \times 10^{-5}$ a $2,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

3.5. Caracterização das monocamadas auto-organizadas

3.5.1. Estudos Voltamétricos

Avaliou-se a modificação do substrato empregando a voltametria cíclica e a DR. Para a caracterização empregando voltametria cíclica utilizou-se tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,0 como eletrólito suporte e o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ $6,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (equimolar) como molécula de sonda da modificação da superfície do eletrodo de ouro. A faixa de potencial variou de -0,3 a 0,8 V (vs Ag/AgCl) a 100 mV s^{-1} . A análise dos dados obtidos foi realizada considerando as repostas de corrente de pico (I_p) e potencial de pico (E_p). Para uma correta comparação, um eletrodo de Au liso foi submetido ao mesmo processo de obtenção das monocamadas dos alcanotióis, sendo imerso somente no solvente etanol.

A dessorção redutiva das SAMs foi avaliada empregando a técnica de voltametria cíclica em meio alcalino. Utilizou-se como eletrólito uma solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ variando o potencial de 0,0 V a -1,5 V (vs SCE) a uma velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} . As soluções foram desaeradas por 20 minutos antes de cada experimento.

3.5.2. Estudos de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

O circuito modelo utilizado nesse estudo foi o circuito de Randles $R_s(CPE[R_{ct}Z_w])$ como mostra a Figura 11:

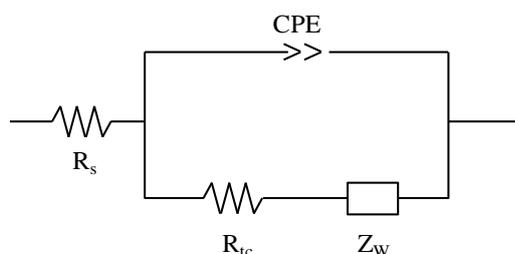


Figura 11: Modelo de circuito equivalente utilizado para análise dos dados obtidos com os gráficos de plano complexo obtidos com a EIE.

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

As medidas de EIE foram realizadas em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 3,0 contendo 6,0 mmol L⁻¹ do par redox $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$. Aplicou-se uma onda senoidal com 10 mV de amplitude no potencial de pico observado com os experimentos de voltametria cíclica (nas mesmas condições) em uma faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz.

3.5.3. Medidas com a Microbalança eletroquímica de Cristal de Quartzo

A MECQ foi utilizada para monitorar a variação de massa do cristal de quartzo durante a dessorção dos tiois nos experimentos de DR.

O monitoramento da variação de massa durante a dessorção reductiva das SAMs foi realizado simultaneamente com a DR. Para o experimento adicionava-se 100 mL de NaOH

0,1 mol L⁻¹ na célula eletroquímica e borbulhava-se gás nitrogênio no conjunto por 20 minutos. Em seguida realizava-se uma varredura linear de 0,0 a -1,5 V (vs SCE) com velocidade de 20 mV s⁻¹.

3.6. Estudo do comportamento eletroquímico do fisetin

3.6.1. Estudo do mecanismo redox do fisetin

Avaliou-se o mecanismo de oxidação e redução do fisetin a partir de estudos da variação de pH e variação de velocidade de varredura de potenciais, empregando a voltametria linear e a voltametria cíclica. As medidas foram realizadas em tampão BR 0,1 mol L⁻¹, cujo pH foi corrigido com solução de NaOH 5,0 mol L⁻¹ para a concentração hidrogeniônica requerida. A faixa de potencial estudada variou de -0,2 a 0,8 V (vs Ag/AgCl) e a velocidade de varredura de 5 a 200 mV s⁻¹. Utilizou-se uma concentração de 0,1 mmol L⁻¹ de fisetin para ambos os estudos. A análise dos dados obtidos foi realizada considerando as repostas de corrente de pico e potencial de pico.

3.6.2. Otimização dos parâmetros de análise para a construção da curva analítica

Utilizou-se como técnica de análise a voltametria de onda quadrada (VOQ). Os parâmetros da técnica como a amplitude de pulso (A), incremento de potencial de varredura (ΔE_s) e frequência de pulso (f), foram avaliados e otimizados em tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0 contendo 0,1 mmol L⁻¹ de fisetin.

Par a determinação do limite de detecção e limite de quantificação construiu-se uma curva analítica utilizando a VOQ com os parâmetros otimizados. Utilizou-se como sensor o eletrodo de ouro contendo a SAM mista.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Pré-tratamento do eletrodo

Após a submissão dos eletrodos de trabalho (eletrodo de ouro convencional e cristal de quartzo recoberto com ouro) ao pré-tratamento descrito na parte experimental constatou-se a eficiência da metodologia de limpeza da superfície pelo perfil voltamétrico obtido em HClO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, mostrado na Figura 12. De acordo com Angerstein-Kozłowska et al. ^[129] o perfil voltamétrico mostra a formação de óxido de ouro no intervalo de potencial de 1,25 a 1,6 V, com a inversão no sentido de varredura, o óxido formado é reduzido com um potencial de pico de redução (E_{pr}) em 1,16 V.

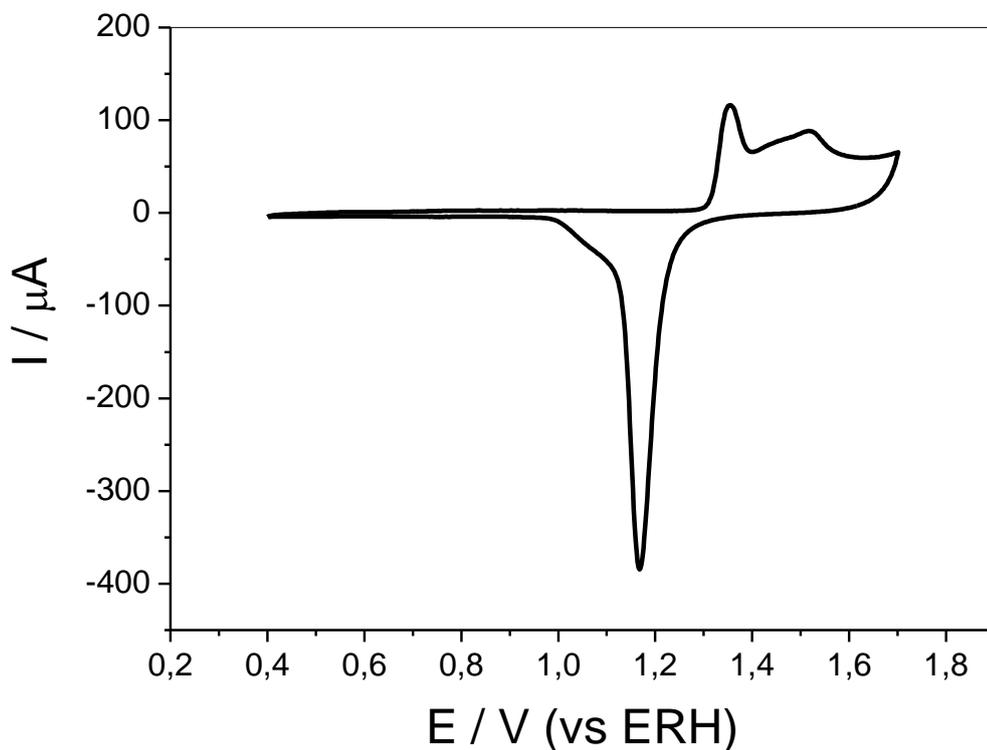
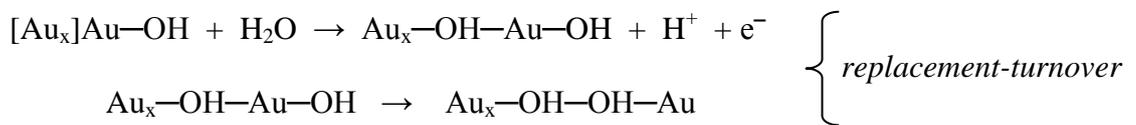


Figura 12: Voltamograma cíclico do eletrodo convencional de ouro policristalino em HClO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ a 20 mV s^{-1} (vs ERH - eletrodo de referência de hidrogênio).

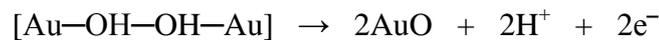
O mecanismo de formação de óxido na superfície de ouro é dinâmico e ocorre a partir da substituição de ânions especificamente adsorvidos, por moléculas de água e sua conseqüente oxidação com transferência de um elétron ^[132]:



simultaneamente ocorre uma rotação da camada mais superficial do metal contendo a hidroxila adsorvida, processo denominado *replacement-turnover* por Angerstein-Kozłowska et al. ^[129]:



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



No processo inverso ocorre novamente a rotação da camada mais superficial do metal e a redução do óxido de ouro, todavia ambos os processos são rápidos a temperatura ambiente e em baixas velocidades de varreduras. Dessa forma observa-se apenas um pico de redução tal como mostrado na Figura 12.

O mecanismo de formação e redução de óxidos na superfície do substrato torna-se importante em trabalhos com monocamadas auto-organizadas, pois uma vez que são processos que ocorrem por quimiossorção envolvendo um sítio ativo da superfície por molécula do adsorbato, esse fenômeno pode ser usado para calcular a área eletroquímica do substrato. A área eletroquímica (A_e), ou área microscópica, ou ainda área eletroativa, é definida como a área da superfície total exposta, incluindo cavidades, ondulações ou qualquer defeitos mesmo a nível atômico ^[133]. Assim a A_e dá informações a respeito da quantidade de sítios de adsorção disponíveis na superfície do substrato. Para conhecer A_e é necessário

conhecer primeiro o fator de rugosidade da superfície (F_R), que pode ser calculado segundo a **equação 2**, relembra abaixo:

$$F_R = \frac{Q_{\text{exp}}}{Q_t} = \frac{A_e}{A_g}$$

onde Q_{exp} é a densidade de carga de redução de uma monocamada de AuO obtida experimentalmente e Q_t é a carga de redução teórica para uma monocamada de óxido de ouro ($390 \mu\text{C cm}^{-2}$).

A densidade de carga, Q_{exp} , é obtida de acordo com Rand e Woods^[130] integrando-se o pico de redução observado com a primeira varredura linear para potenciais mais negativos após aplicação de um potencial E_λ por 100 segundos. A avaliação da Q_{exp} em função do potencial de formação do óxido de ouro (E_λ), exposta na Figura 13, mostra que para $E_\lambda > 2,0$ a Q_{exp} aumenta exponencialmente devido à evolução de O_2 , o qual permanece adsorvido na superfície de ouro, superestimando Q_{exp} , visto que este também se reduz com a varredura catódica.

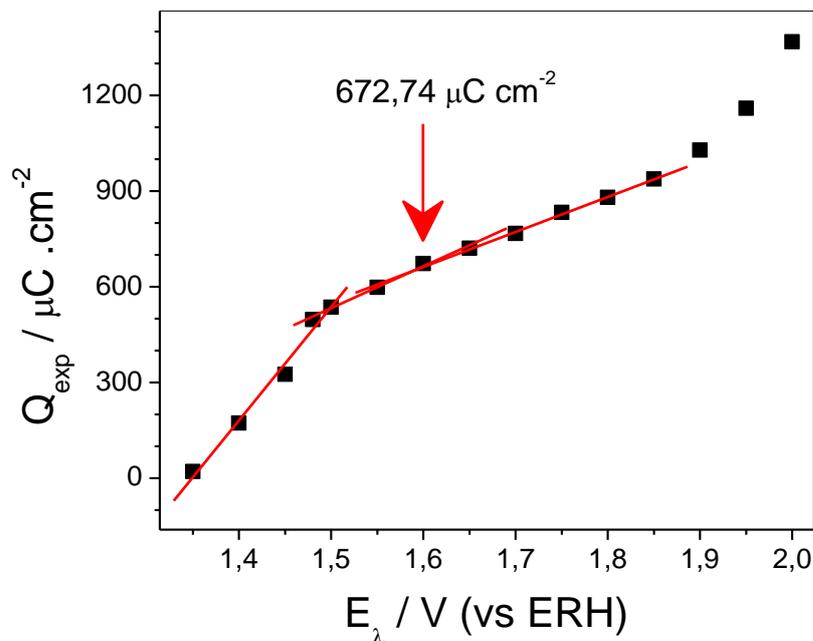


Figura 13: Variação da Q_{exp} em função de E_λ , as linhas vermelhas mostram regiões de linearidade.

Para $E_\lambda < 1,5$ a Q_{exp} diminui linearmente indicando que a camada do óxido AuO encontra-se incompleta. Para valores de E_λ entre 1,5 e 1,9 V observa-se um aumento na densidade de carga e uma mudança na inclinação da tangente com $E_\lambda=1,6$ V. A variação de Q_{exp} de 1,6 a 1,9 V é de aproximadamente $355,7 \mu\text{C cm}^{-2}$, valor próximo ao esperado para a redução de uma monocamada de AuO, considerando transferência de 2 elétrons. Portanto a mudança na inclinação da tangente e ΔQ_{exp} indicam que a primeira monocamada de óxido de ouro encontra-se completa com $E_\lambda \approx 1,6$ V. Logo, considerou-se para o cálculo da área eletroquímica do eletrodo a Q_{exp} obtida com $E_\lambda = 1,6$ V. Assim, utilizando o procedimento descrito acima, obteve-se $F_R = 1,70 \pm 0,19$ para os eletrodos de ouro convencionais polidos até aparência especular. Com a mesma metodologia calculou-se $F_R = 2,56 \pm 0,25$ para os cristais de quartzo recoberto com ouro. Conhecendo F_R e garantindo a integridade da superfície dos eletrodos de ouro, iniciou-se a formação das SAMs.

4.2. Monocamadas auto-organizadas mistas

A formação de SAMs de alcanotióis sobre substratos de ouro é amplamente estudada e mesmo assim muitas discussões ainda giram em torno do tempo necessário e do controle da formação de SAMs com múltiplos componentes.

A formação de monocamadas com segregação de fases contendo mais de um componente, pode ser alcançada pela escolha de alcanotióis com estruturas químicas distintas, visto que a cinética de adsorção está relacionada com a estrutura química do adsorbato ^[76]. Como a organização das moléculas na superfície do substrato é impulsionada por interações de van der Waals entre os grupos metílenos da cadeia carbônica do alcanotiol, quanto maior o número de grupos metílenos, maior será a interação entre moléculas de mesma identidade

química e conseqüentemente mais estável será a SAM^[19, 103]. Assim é provável a formação de domínios diferentes na superfície do substrato se o número de grupos metílenos de dois possíveis adsorbatos forem muito diferentes^[76]. Logo, optou-se por tióis com tamanhos distintos da cadeia carbônica, para formar uma SAM mista por co-adsorção dos tióis em solução etanólica. O 11amu possui oito grupos metílenos a mais que o 3amp, o que pode fazer com que ocorra separação de fases durante a formação da SAM mista^[52].

4.3. Modificação do substrato com os alcanotiois ácido 11-mercaptoundecanóico, ácido 3-mercaptopropionico e uma mistura de ambos.

Para entender o efeito da modificação da superfície do eletrodo de ouro com a monocamada mista (SAM mista) é necessário observar as características de monocamadas com apenas ácido 3-mercaptopropiônico (SAM-3amp) ou ácido 11-mercaptoundecanóico (SAM-11amu), além da resposta do ouro limpo nas mesmas condições. Portanto analisou-se a transferência de carga entre o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ e a superfície de ouro limpo e das monocamadas SAM-3amp, SAM-11amu e SAM mista. Uma vez que o comportamento eletroquímico deste par redox é amplamente conhecido na literatura, ele foi utilizado como uma forma de avaliar indiretamente a modificação da superfície de ouro.

A utilização de tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 3,0 como eletrólito suporte visou manter ambos os tióis protonados durante as medidas, visto que o pKa tanto do 3amp quanto do 11amu estão entre 5 e 7, respectivamente^[134]. Essa cautela previne a variação das respostas eletroquímicas em função de interações eletrostáticas entre moléculas de 3amp, ou de 11amu, e o par redox.

De acordo com a Figura 14 o perfil voltamétrico obtido com a SAM-3amp apresenta os mesmos potenciais de pico de oxidação (E_{po}) e redução (E_{pr}) e praticamente as mesmas magnitudes de corrente de pico de oxidação (I_{po}) e redução (I_{pr}) observadas para o eletrodo de ouro não modificado. Como a resposta eletroquímica varia em função da área eletroativa da superfície do eletrodo ^[133], pode se constatar que a SAM-3amp exibe uma área eletroativa praticamente igual à observada para o ouro limpo. Na ausência do par redox, a SAM-3amp não exibi nenhum processo faradaico, sendo o voltamograma obtido representativo para as demais superfícies eletródicas. Mesmo o 3amp não apresentando nenhuma insaturação conjugada a transferência eletrônica entre a superfície metálica e o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ ocorre quase sem nenhuma resistência imposta pela monocamada. A dessorção da SAM-3amp confirma a modificação da superfície de ouro com 3amp, mostrada na Figura 15, onde se observa picos de redução em -0,79 e -0,98 V (vs SCE). Nenhum processo faradaico é observado para o eletrodo de ouro não modificado até a evolução de H_2 em -1,3 V (vs SCE)

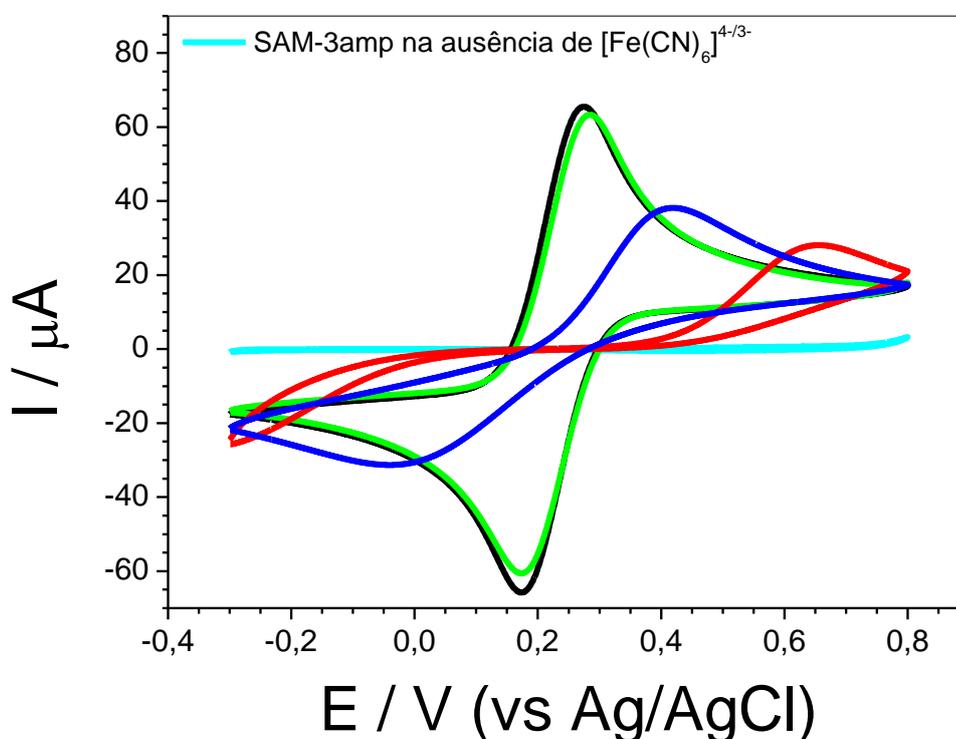


Figura 14: Voltamogramas cíclicos em tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 3,0 contendo 6,0 mmol L⁻¹ do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ a 100 mV s⁻¹ para (—) ouro, (—) SAM-11amu, (—) SAM-3amp e (—) SAM mista obtida com incubação do substrato em uma solução etanólica contendo 1,0 mmol L⁻¹ de 11amu e 0,4 mmol L⁻¹ de 3amp por um período de 20 horas.

Com a SAM-11amu apenas o processo de oxidação apresenta-se definido e, mesmo assim, mostra um deslocamento do E_{po} de 370 mV para potenciais mais positivos somado a uma I_{po} correspondente a apenas 44 % do valor observado para a SAM-3amp. Novamente, a modificação da superfície do substrato pode ser confirmada com a dessorção da SAM-11amu mostrada na Figura 15, onde se observa picos de redução em -1,02 e -1,15 V (vs SCE).

Já a SAM mista apresentou um comportamento eletroquímico intermediário ao demonstrado com as SAMs dos tióis puros. Embora as magnitudes das respostas eletroquímicas sejam intermediárias, o perfil voltamétrico apresenta um máximo de corrente, com E_p mais afastado do que esperado para processos reversíveis. Os deslocamentos no E_{po} observados para a SAM mista e para SAM-11amu, também fornecem evidências de que o processo redox do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ ocorre por tunelamento dos elétrons através da cadeia carbônica dos tióis.

Uma vez que para a SAM-11amu a barreira energética imposta pelo comprimento da cadeia carbônica exige uma energia maior para que ocorra a transferência eletrônica, o E_{po} se desloca para potenciais mais positivos e, conseqüentemente, a I_{po} diminui devido a resistência a transferência eletrônica imposta pelas moléculas de 11amu. Na literatura, essas respostas faradaicas são comumente atribuídas à presença de *pinholes* e defeitos da SAM. *Pinholes* são sítios onde a superfície do substrato está exposta a solução e os defeitos da SAM são locais onde outras moléculas podem se aproximar da superfície do substrato a uma distância tão pequena quanto à espessura da monocamada ^[23]. Se o processo eletroquímico ocorresse somente pelos *pinholes* e defeitos da SAM, o perfil voltamétrico seria semelhante ao observado para UMEs sem a ocorrência de deslocamento de E_p ^[44] e com correntes significativamente menores ^[135]. Embora a existência destas falhas na SAM seja inegável, elas não explicam as respostas eletroquímicas observadas na Figura 14. Assim, é plausível atribuir

às respostas eletroquímicas referentes à oxi-redução do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ ao efeito de tunelamento quântico de elétrons entre as moléculas de 3amp até a superfície metálica.

Quanto à dessorção da SAM mista, mostrada na Figura 15, observa-se processos de redução em -0,96 e -1,13 V (*vs* SCE), comprovando a modificação da superfície e evidenciando a presença de domínios ricos em 3amp e domínios ricos em 11amu, visto que também se observa um deslocamento dos E_{pr} para valores mais positivos.

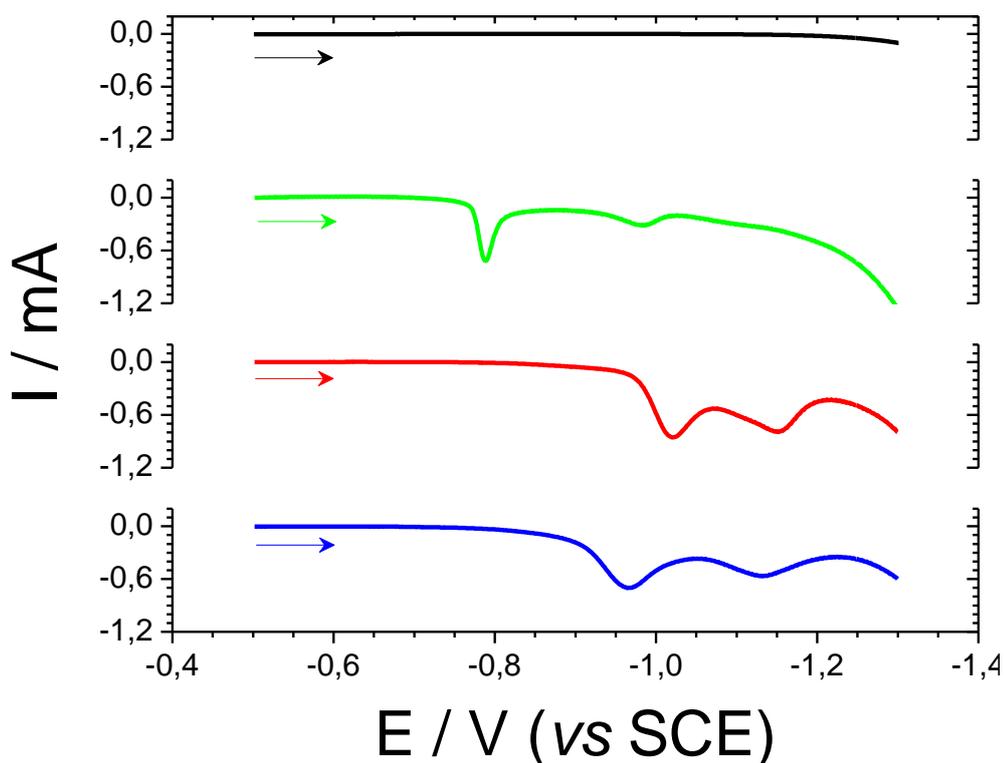


Figura 15: Voltamogramas lineares para ouro limpo (—), SAM-11amu (—), SAM-3amp (—) e SAM mista, obtida com incubação do substrato de ouro em solução etanólica contendo $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de 3amp e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de 11amu por um período de 20 horas (—). Eletrólito NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} .

A dessorção de monocamadas de tióis é característica para cada espécie adsorvida, visto que quanto mais compacta e estável é a monocamada, maior é a energia necessária para sua dessorção redutiva^[136]. A reação envolvida no processo de redução é^[111]:



A presença de dois picos de redução pode ser consequência da formação de regiões com domínios de fase diferentes ^[19]. Domínios de fase se referem a diferentes formas de organização da monocamada (Fig. 16). Cada maneira de organização apresenta uma energia de adsorção, portanto a dessorção de diferentes fases apresenta energias diferentes e consequentemente são dessorvidas em potenciais também diferentes uma das outras.

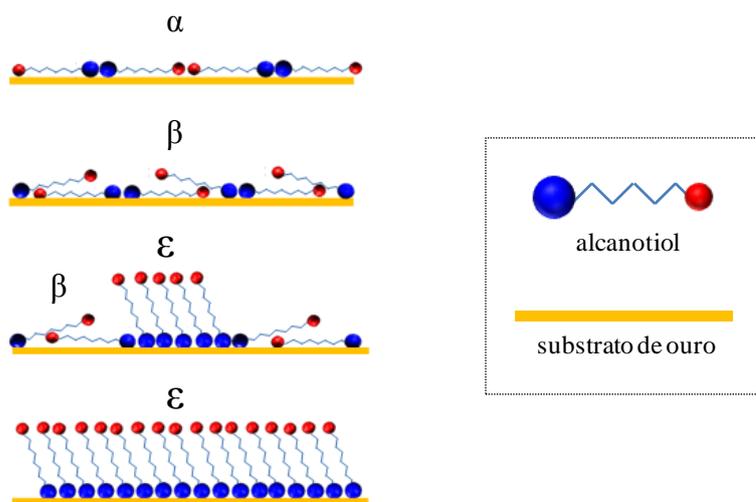


Figura 16: Sequência de recobrimento do substrato durante a formação da SAM ^[50].

Na Figura 16 são representados os diferentes tipos de domínios de fase. Na fase α a adsorção das moléculas ocorre com interação entre os grupos adsorventes (neste caso entre os átomos de enxofre) fazendo com que a cadeia carbônica esteja paralela ao plano da superfície do substrato. Na fase β as cadeias carbônicas começam a interagir umas com as outras ocasionando um efeito onde moléculas se adsorvem umas sobre as outras, na tentativa de minimizar a energia do sistema. A fase ϵ é originada por interações laterais entre as moléculas, sendo caracterizada pela adsorção axial das moléculas em relação à superfície do substrato com crescimento lateral da monocamada por interações do tipo van der Waals entre as cadeias carbônicas. A fase ϵ representa uma SAM compacta e com estrutura altamente ordenada ^[51].

Alguns dos fatores que contribuem para a presença de mais de uma onda de redução, durante a dessorção da SAM, são o substrato e o tamanho da cadeia carbônica do tiol. O substrato utilizado no presente estudo é ouro policristalino, portanto apresenta defeitos em sua superfície que impossibilitam a organização efetiva das moléculas em apenas um domínio de fase. Por isso é crucial que se faça um pré-tratamento da superfície do substrato para obter a superfície mais plana possível. Todavia, mesmo após o pré-tratamento, o substrato de ouro continua policristalino e apresentará defeitos de superfície na escala nanométrica, os quais são suficientes para acarretar em uma região onde a monocamada não será formada ordenadamente.

O tamanho da cadeia carbônica do adsorbato também exercerá grande influência sobre a organização da SAM. Quando a molécula adsorvente contém um número pequeno de grupos metílicos em sua cadeia carbônica as interações laterais não são suficientes para estabilizar a estrutura. Esse fator aliado a possíveis defeitos de superfície ocasionam a formação de diferentes domínios de fase^[72]. O 3amp possui somente dois grupos metílicos, logo, a interação lateral entre esses grupos é fraca e não estabiliza tão fortemente a monocamada quanto o 11amu, que possui oito grupos metílicos a mais que o 3amp. Isso explicaria a presença de dois picos distintos para a dessorção de todas as SAMs e a dessorção da SAM-3amp em potenciais mais positivos que a SAM-11amu, observados na Figura 15. Quanto a SAM mista, o deslocamento dos E_p de dessorção para potenciais mais positivos se deve à interação entre o tiol de cadeia curta e o tiol de cadeia longa, o que acarreta em uma estabilização efetiva da SAM mista intermediária a SAM dos tiois puros.

O estudo da influência da velocidade de varredura de potencial na resposta eletroquímica do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ utilizando a SAM mista como eletrodo de trabalho, sugere que o processo é controlado por difusão no transporte de massa da espécie eletroativa (Fig. 17).

Essa conclusão se deve à maior linearidade entre a corrente de pico de oxidação (I_{po}) e a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) conforme observado na Figura 17 (b).

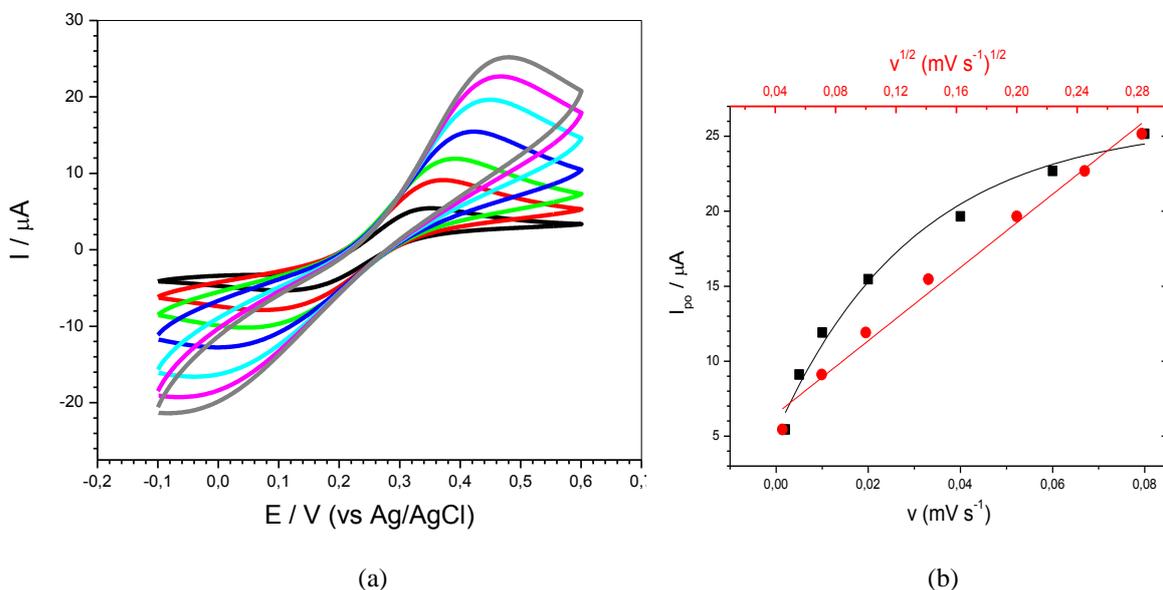


Figura 17: (a) Voltamogramas ciclos utilizando a SAM mista como eletrodo de trabalho com velocidade de varredura de 2 (—), 5 (—), 10 (—), 20 (—), 40 (—), 60 (—) e 80 $mV s^{-1}$ (—). Eletrólito suporte tampão BR 0,1 mol L^{-1} pH 3,0 contendo 6,0 $mmol L^{-1}$ do par redox $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$. (b) Gráfico de I_{po} vs v (●) e I_{po} vs $v^{1/2}$ (●).

A linearidade observada entre I_{po} vs $v^{1/2}$ permite assumir que a corrente de pico pode ser expressa pela equação de Randles-Sevick^[133]:

$$I_p = (2,69 \times 10^5) \times n^{3/2} \times A_e \times D_o^{1/2} \times C \times v^{1/2} \quad \text{equação 3}$$

onde n é o número de elétrons transferidos, v é a velocidade de varredura, A_e é a área eletroativa do eletrodo e D_o e C são o coeficiente de difusão e a concentração da espécie eletroativa, respectivamente,^[137].

Utilizando os valores de n $1e^-$ para Fe^{2+}/Fe^{3+} , v 0,1 $V s^{-1}$, D_o 7,17 $\times 10^{-6} cm^2 s^{-1}$ e C 6,0 $\times 10^{-6} mol cm^{-3}$ para o $[Fe(CN)_6]^{4-}$ e a I_{po} em ampère, pode-se calcular a área eletroativa dos eletrodos utilizando a equação 3, visto que todos os parâmetros da equação são conhecidos.

A Tabela 1 mostra os valores de I_{po} e I_{pr} , assim como E_{po} , E_{pr} e a área eletroativa para os eletrodos, calculada pela equação de Randles-Sevick.

Tabela 1: Corrente e potenciais de pico referentes à oxidação do par $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$

Superfície	I_{po} (μA)	E_{po} (mV)	I_{pr} (μA)	E_{pr} (mV)	A_e (cm^2)
Ouro limpo	66,30	281	- 66,3	176	0,048
SAM-3amp	61,83	289	- 57,03	157	0,045
SAM-mista	38,16	420	- 31,42	- 44	0,028
SAM-11amu	25,51	634	Não observado		0,019

Conhecendo a área eletroativa do eletrodo de ouro calculada com a **equação 3** é possível estimar o F_R para o mesmo eletrodo com a **equação 2**, visto que tanto A_e quanto A_g são conhecidas. O valor de F_R encontrado é de 1,54, portanto em concordância com o valor determinado pelo método de Rand e Woods ^[130] ($1,70 \pm 0,19$). Isto comprova a eficiência do método para calcular F_R .

A hipótese de que o 3amp permite o tunelamento de elétrons por sua cadeia carbônica sem oferecer resistência à transferência de carga é reforçada, uma vez que A_e para a SAM-3amp é praticamente a mesma que para o ouro limpo. O extremo é observado para a SAM-11amu onde A_e é apenas um terço da área eletroativa do eletrodo de ouro limpo, apresentando ainda um E_{po} deslocado 350 mV para potenciais mais positivos.

O efeito da modificação com os tióis na cinética de transferência eletrônica fica mais evidente ao analisar a Figura 18. A resistência para transferência de carga exibida pela SAM está intrinsecamente relacionada com o comprimento da cadeia carbônica do tiol utilizado na modificação do substrato de ouro. A simulação dos resultados, aplicando um circuito de Randles modificado $R_s(CPE[R_c Z_w])$, com o *software Electrochemistry-ZView2* forneceu os parâmetros apresentados na Tabela 2. R_s consiste na resistência da solução, o elemento de

fase constante (CPE) representa um capacitor não ideal, enquanto R_{tc} é a resistência de transferência de carga e Z_W a impedância de Warburg (domínio difusional do sistema).

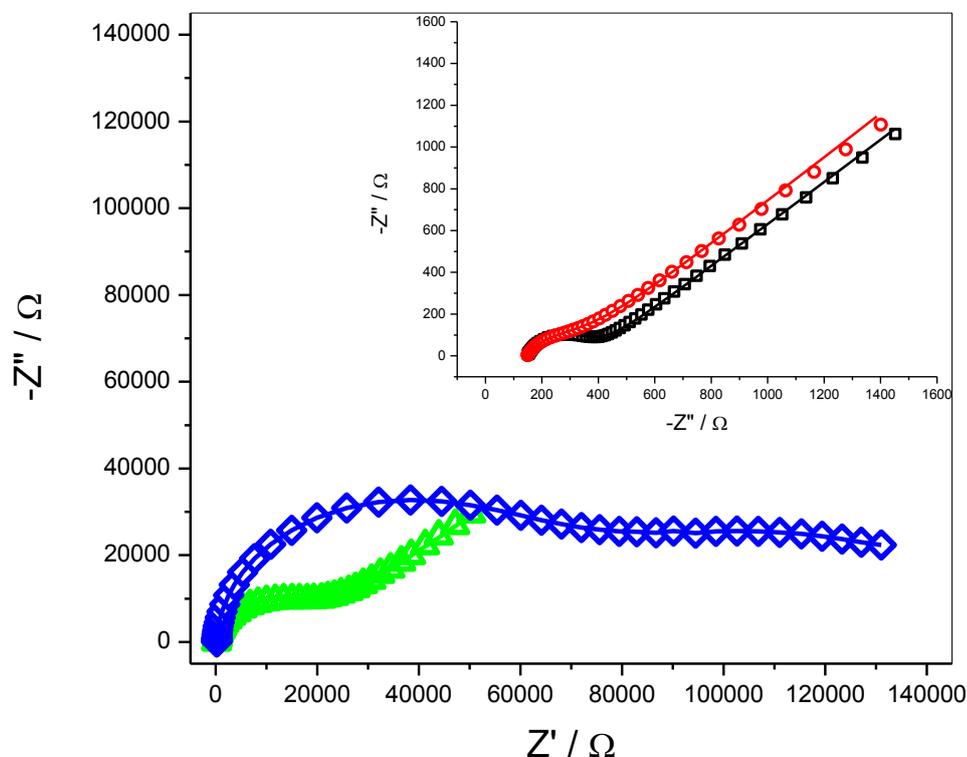


Figura 18: Espectros de plano complexo obtidos para o ouro limpo (●), SAM-3amp (■), SAM-11amu (◆) e SAM-mista (▲) obtida com incubação do substrato de ouro em solução etanólica contendo $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de 3amp e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de 11amu por um período de 20 horas. Eletrólito suporte tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,0 contendo $6,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$. Faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz, onda senoidal de 10 mV aplicada no Epo observado com a VC. As linhas ultrapassando os identificadores são os resultados de simulação com *software* empregando o circuito de Randles modificado.

Ao comparar as R_{tc} obtidas para as diferentes superfícies eletródicas, fica claro que ao aumentar o comprimento da cadeia carbônica do tiol adsorvido, a energia requerida para que os elétrons possam tunelar até a superfície metálica aumenta drasticamente. Os dados da Tabela 2 mostram que a SAM-11amu aumenta 245 vezes a R_{tc} . Para a SAM-3amp o valor de resistência de transferência de carga não se difere significativamente do valor observado para o ouro não modificado, confirmando os resultados obtidos com a voltametria cíclica. Dessa forma, os resultados de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica deixam claro que as monocamadas de 3amp e 11amu demonstram comportamentos

eletroquímicos distintos. Novamente, a SAM-mista exibiu valores de R_{tc} , CPE e α intermediários aos observados para as monocamadas contendo os tióis puros.

Como mostrado na Figura 18, a aplicação de ondas senoidais de baixa amplitude possibilitou uma boa separação de regiões de frequência onde a oxidação-redução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} \rightleftharpoons [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ se dá por controle cinético e por controle de transporte de massa. Sob essas condições a constante de velocidade de transferência eletrônica heterogênea aparente (k_{app}) da reação pode ser determinada pela equação ^[138]:

$$k_{app} = \frac{RT}{F^2 R_{tc} C A_e} \quad \text{equação 4}$$

onde F é a constante de Faraday (96485 C mol^{-1}), C a concentração de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em solução ($6,0 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$), R a constante física dos gases ($8,3145 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T a temperatura em Kelvin (298 K), A_e a área eletroquímica calculada com a equação 3 e R_{tc} a resistência de transferência de carga obtida com a simulação dos resultados da Figura 18.

Tabela 2: Dados obtidos com os espectros de plano complexo da Figura 18

SAM	R_s (Ω)	CPE (μF)	R_{tc} (Ω)	α	A_e (cm^2)	k_{app} (cm s^{-1})
Au	148,6	19,0	230,0	0,76	0,048	$3,97 \times 10^{-3}$
SAM-3amp	146,8	2,6	240,0	0,81	0,045	$4,09 \times 10^{-3}$
SAM-mista	155,0	0,6	17143,0	0,94	0,028	$9,28 \times 10^{-5}$
SAM-11amu	158,0	0,1	58800,0	0,94	0,019	$4,05 \times 10^{-5}$

De acordo com a Tabela 2, a k_{app} é praticamente a mesma para o eletrodo de ouro limpo e para a SAM-3amp, indicando que o 3amp não influencia na cinética de transferência eletrônica da interface eletrodo-solução. Em contraste a SAM-11amu apresenta uma k_{app} 100 vezes menor e uma R_{tc} 245 vezes maior que a SAM-3amp. Contudo a SAM mista apresentou um valor de k_{app} maior que a SAM-11amu, porém menor que a SAM-3amp, confirmando a hipótese levantada com a voltametria cíclica, de que a transferência eletrônica, sobre a SAM

mista, ocorre em domínios ricos em 3amp, gerando o sinal correspondente. Logo, a cinética de transferência eletrônica é afetada pelo comprimento da cadeia carbônica, o que tem sido confirmado por outros trabalhos envolvendo SAMs^[23].

Até o momento os resultados demonstram que com a co-adsorção dos tiois 11amu e 3amp em solução etanólica é possível obter uma monocamada mista, mas não temos informação a respeito da configuração da superfície da SAM, isto é, se os domínios são distintos ou se há uma mistura homogênea dos tiois. Para analisar com maiores detalhes essa incógnita, faz-se necessário um estudo da composição da SAM mista.

4.3.1. Estudo eletroquímico da composição superficial da SAM mista

4.3.1.1. Influência da concentração dos tiois na solução de incubação do substrato

As SAMs mistas foram obtidas pela imersão do eletrodo de ouro em uma solução etanólica contendo uma concentração de 11amu fixada em $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e concentrações de 3amp variando de $6,9 \times 10^{-5}$ a $2,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. De acordo com a Figura 19, ao aumentar a concentração de 3amp na solução de incubação do substrato o E_{po} , observado para o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, se desloca para potenciais mais negativos. Isso indica que a cinética de adsorção do 3amp na superfície do eletrodo de ouro é mais rápida. Esse comportamento já era esperado, visto que a cadeia carbônica do 3amp é menor do que a do 11amu, o que possibilita uma difusão mais rápida no solvente. Assim a probabilidade de moléculas de 3amp se adsorverem na superfície de ouro primeiro que moléculas de 11amu é maior.

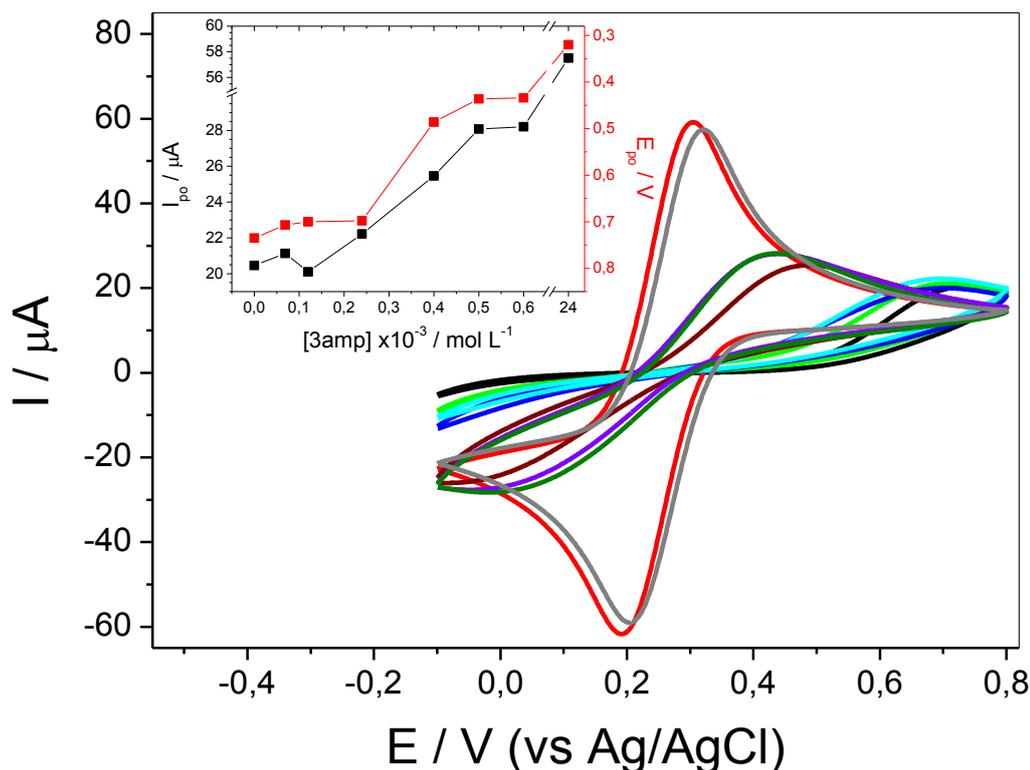


Figura 19: (a) Voltamogramas cíclicos para SAM-11amu (—) e SAM-3amp (—) e SAMs mistas obtidas com incubação do substrato de ouro em solução etanólica contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de 11amu e 3amp nas concentrações de: $6,9 \times 10^{-5}$ (—); $1,2 \times 10^{-4}$ (—); $2,4 \times 10^{-4}$ (—); $4,0 \times 10^{-4}$ (—); $5,0 \times 10^{-4}$ (—); $6,0 \times 10^{-4}$ (—) e $2,4 \times 10^{-2}$ (—) mol L^{-1} . Detalhe do gráfico com I_{po} (■) e E_{po} (●), para as SAMs mistas, em função da concentração de 3amp em solução de incubação do substrato. Eletrólito tampão BR $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 3,0 contendo $6,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, velocidade de varredura 100 mV s^{-1} . Tempo de incubação do substrato de 150 minutos.

Outro fator interessante é o perfil voltamétrico exibido pela SAM mista em valores altos de concentração de 3amp, tais como $2,4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, onde observa-se um máximo de corrente seguido por uma queda, indicando transporte de massa por difusão linear semi-infinita para o eletrodo^[133]. Entretanto, em concentrações baixas de 3amp, tais como $6,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, o voltamograma é similar ao obtido com a SAM-11amu. Isto ocorre porque a concentração de 3amp em solução é ≈ 14 vezes menor que a concentração de 11amu e mesmo que a cinética de adsorção do 3amp seja mais rápida que a do 11amu, sua baixa concentração limita a formação de domínios ricos em 3amp. Portanto o perfil voltamétrico da SAM mista apresenta contribuições de transporte de massa linear semi-infinito (característico para eletrodos convencionais) e hemisférico semi-infinito (característico para ultramicroeletrodo)^[82]. Deve-se ressaltar ainda que a SAM mista, caso seja formado ilhas de 3amp circundadas

por domínios ricos em 11amu, apresenta uma configuração de UME recessado ^[139], visto que as ilhas de 3amp seriam 8 grupos metílenos mais profundas que os domínios de 11amu, tal como na Figura 20.

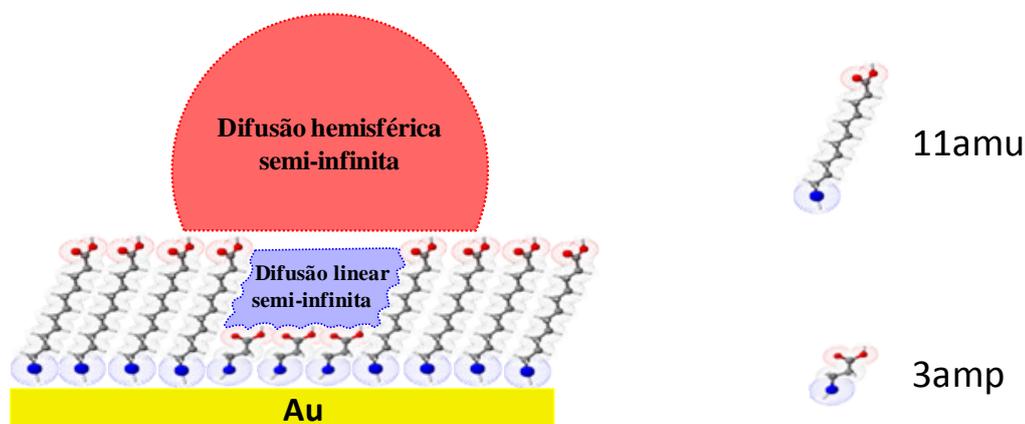


Figura 20: Representação da configuração da SAM mista formada por ilhas de 3amp circundadas por moléculas de 11amu e as regiões com contribuição de transporte de massa difusional linear e hemisférico semi-infinito.

Para a configuração superficial requerida, as ilhas de 3amp formadas na SAM mista não podem ser muito pequenas, pois o desempenho do conjunto formado seria limitado pela resistência à transferência eletrônica imposta pelo 11amu. Ao contrário, se as ilhas de 3amp forem muito grandes, o comportamento eletroquímico da SAM mista é equivalente ao comportamento da SAM-3amp. Dessa forma, como se pretende obter uma SAM mista com uma configuração próxima a um conjunto de ultramicroeletrodos, contendo ilhas de 3amp com dimensões que evitem as situações extremas expostas acima, optou-se por fixar a concentração dos tióis em $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 3amp e $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de 11amu na solução etanólica para a formação das monocamadas mistas. Todos os demais estudos foram realizados com a SAM mista obtida nessas proporções dos tióis em solução.

Entretanto, outro fator é extremamente importante para a organização da SAM, o tempo de incubação do substrato em solução contendo os tióis precursores. Assim é de suma importância estudar a influência desse fator na formação da SAM-mista.

4.3.1.2. Influência do tempo de incubação do substrato na organização da SAM mista

O tempo de incubação do substrato em uma solução contendo apenas um tiol precursor é crucial para a formação de uma monocamada densamente empacotada [46]. Com o tempo as moléculas adsorvidas podem ocupar a menor área possível na superfície do substrato aumentando a intensidade de interação do tipo van der Waals entre as cadeias carbônicas, o que acarreta na formação de uma SAM compacta e bem definida [51]. Porém qual seria o efeito do tempo de incubação na formação de uma SAM mista obtida por co-adsorção dos tióis precursores em solução?

Na Figura 21 são mostrados os voltamogramas cíclicos para o par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ sobre o eletrodo modificado por SAM mistas obtidas com diferentes tempos de incubação do substrato em solução dos tióis. De acordo com a Figura as respostas máximas de I_{po} com menor E_{po} ocorrem para os tempos de incubação do substrato de 0,08 e 20 horas. O comportamento da curva de I_{po} e E_{po} em função do tempo de incubação do substrato mostra que ao aumentar o tempo para cinco horas de incubação, a corrente de pico diminui drasticamente e o potencial de pico se desloca para potenciais mais positivos.

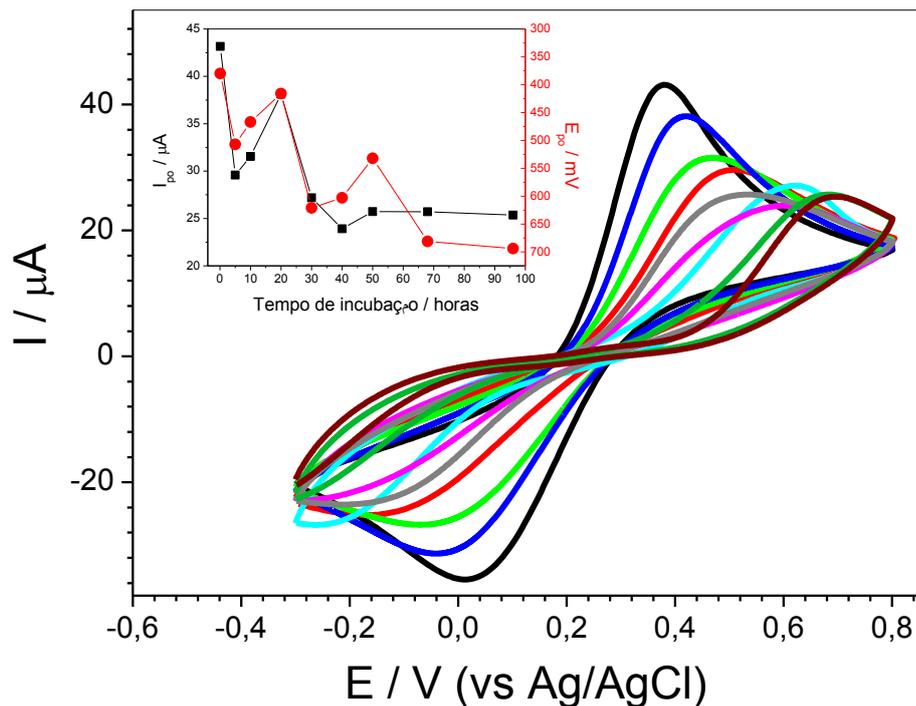


Figura 21: (a) Voltamogramas cíclicos para SAMs mistas obtidas com incubação do substrato de ouro em solução etanólica contendo $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 3amp e $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de 11amu por um período de (—) 0,08 h, (—) 5 h, (—) 10 h, (—) 20 h, (—) 30 h, (—) 40 h, (—) 50 h, (—) 68 h e (—) 96 h. Eletrólito tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, velocidade de varredura 100 mV s^{-1} . Detalhe no gráfico: Respostas de I_{po} (■) e E_{po} (●) em função do tempo de incubação.

O comportamento da SAM mista obtida com 0,08 horas de incubação do substrato pode ser explicado segundo duas hipóteses, (i) a superfície encontra-se recoberta principalmente por 3amp e (ii) o recobrimento da superfície é baixo possibilitando a resposta eletroquímica do par redox diretamente sobre a superfície de ouro em alguns locais. Ambas as hipóteses contribuiriam para aumentar a resposta de corrente e tornar o sistema mais reversível se aproximando do comportamento do ouro limpo ou da SAM-3amp. Mas a probabilidade de ocorrer ambos os fenômenos simultaneamente também não pode ser descartada. De fato, de acordo com as variações de massa monitoradas com a MECQ durante a dessorção das SAMs mistas, a primeira hipótese é mais plausível para explicar o comportamento eletroquímico exibido pela SAM mista obtida com 0,08 horas de incubação do substrato. Na Figura 22 são mostrados os voltamogramas lineares obtidos com a dessorção redutiva das SAMs mistas e os massogramas resultantes do monitoramento simultâneo da

variação de massa (Δm) durante a varredura de potenciais. O valor teórico de Δm resultante da dessorção de uma monocamada dos tiois puros seria $-198,71$ e $-410,79$ $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ para a SAM-3amp e SAM-11amu, respectivamente. A densidade de carga (Q_r) para o mesmo processo seria de $\approx 195,0$ $\mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$, considerando a reação geral abaixo, um substrato de ouro policristalino e que a SAM apresenta um recobrimento similar ao óxido de ouro, isto é, uma molécula de tiol por átomo de ouro:

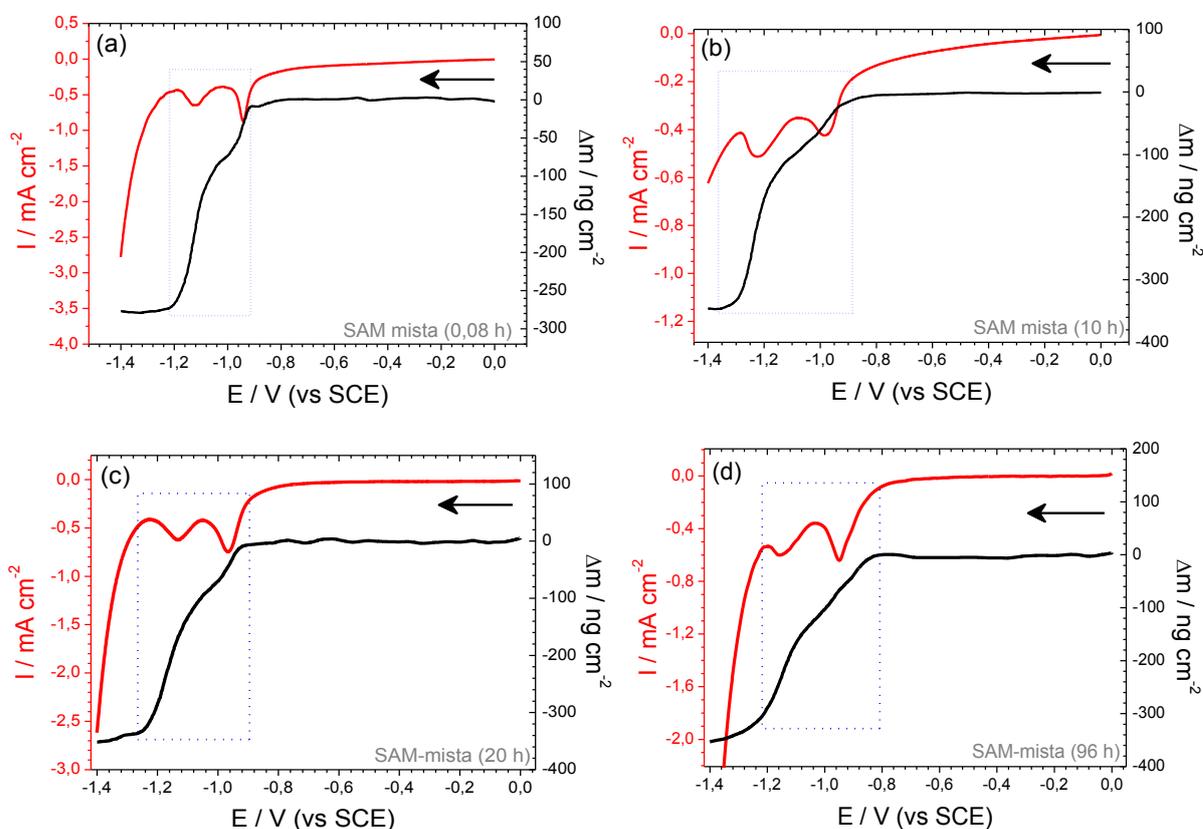
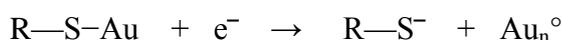


Figura 22: Dessorção de SAMs mistas obtidas com incubação do cristal de quartzo recoberto com ouro em solução etanólica contendo $4,0 \times 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de 3amp e $1,0 \times 10^{-3}$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de 11amu por um período de (a) 0,08 h, (b) 10 h, (c) 20 h e (d) 96 h. Eletrólito NaOH $0,1$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ com velocidade de varredura de 20 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. (—) voltamogramas lineares e (—) massogramas resultantes do monitoramento da varredura linear. Varredura para potenciais mais negativos.

Em relação ao estudo voltamétrico anterior, a única diferença na dessorção das SAMs mistas da Figura 22 consiste no substrato utilizado. Para medidas com MECQ é

utilizado um cristal de quartzo recoberto com ouro como substrato, o qual atua como eletrodo de trabalho e sensor da variação de massa (Δm) simultaneamente.

A dessorção da SAM mista obtida com incubação de 0,08 horas resulta em uma variação de massa $\approx 72,69 \text{ ng cm}^{-2}$, menor que a observada para as demais monocamadas mistas, mas ao comparar as variações de massa obtidas para as SAMs mistas com 10, 20 e 96 horas de incubação do substrato, observa-se uma Δm praticamente constante.

Os valores de densidade de carga de redução (Q_r) e Δm obtidos da análise da Figura 22 podem ser visualizados na Tabela 3. De acordo com a tabela, a dessorção da SAM mista (0,08 h) apresentou uma Q_r de $199,63 \text{ } \mu\text{C cm}^{-2}$, evidenciando um elevado recobrimento superficial. As demais SAMs mistas, obtidas com incubação do cristal de quartzo por 10, 20 e 96 horas em solução contendo os tióis precursores, apresentaram valores de Q_r próximos ao esperado para um recobrimento completo e Δm semelhantes entre si. Isso indica que para todas as SAMs mistas, independente do tempo de incubação do substrato, é alcançado o recobrimento máximo possível com a mistura de tióis.

Tabela 3: Dados obtidos com a dessorção das SAMs mistas

Tempo de incubação (horas)	$\Delta m \text{ (ng cm}^{-2}\text{)}$	$Q_r \text{ (}\mu\text{C cm}^{-2}\text{)}$
0,08	278,39	199,63
10,0	346,79	192,51
20,0	351,07	193,43
96,0	351,88	203,17

Assim, a Q_r e a Δm observadas para a SAM mista (0,08 h), corroboram com os dados obtidos com a voltametria cíclica, para as mesmas SAMs, apresentados na Figura 21, onde o maior recobrimento com 3amp faz com que a oxi-redução do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ resulte em respostas de I_p maiores e E_p mais reversíveis.

Se as SAMs mistas obtidas com 0,08; 10; 20 e 96 horas de incubação do cristal de quartzo em solução dos tióis resultam em Q_r e a Δm semelhantes, como explicar as diferenças nos voltamogramas cíclicos da Figura 21? A resposta para esta pergunta baseia-se no mecanismo de organização da SAM. Embora a adsorção dos tióis seja espontânea a organização demanda tempo e ambos os processos são dinâmicos em solução^[8, 15].

A ordem de estabilidade de interações entre tióis de cadeia carbônica longa e curta pode ser representada como longa-longa > curta-curta > longa-curta^[72]. Assim sendo, com o tempo, a organização da SAM mista pode assumir uma configuração onde ocorra segregação de fases resultando em domínios ricos em 3amp e domínios ricos em 11amu. Deve-se considerar ainda que a organização dentro desses domínios também esteja relacionada com o tempo de incubação do substrato na solução dos tióis precursores. Assim, acredita-se que as diferenças de comportamento das SAMs mistas estão relacionadas com a organização dos domínios ricos em 3amp na monocamada.

Para avaliar qual a influência da organização de domínios ricos em 3amp ou 11amu e se esses domínios segregados realmente existem é necessário conhecer a distribuição desses domínios na superfície do substrato. Esse tipo de informação pode ser obtida indiretamente avaliando minuciosamente as curvas de desorção acompanhadas com a MECQ.

4.3.1.3. Distribuição de domínios ricos em 3amp e em 11amu na SAM mista.

Maiores detalhes a respeito da composição da SAM mista podem ser obtidos adaptando uma relação utilizada inicialmente por Uchida et al.^[140] para estudar a adsorção de ânions e moléculas de água em deposição de cátions metálicos com deposição de regime de subtensão. Para isso utiliza-se a lei de Faraday, onde é estabelecido que durante uma

eletrólise, a massa de uma substância dissolvida em qualquer um dos eletrodos é diretamente proporcional à quantidade de densidade de carga fornecida aos eletrodos ^[141]. Logo, tem-se a seguinte relação ^[142]:

$$\Delta m = \frac{\Delta Q M}{nF} \quad \text{equação 5}$$

onde Δm é a variação de massa, ΔQ é a variação da densidade de carga de redução, M é a massa molar, n é o número de elétrons transferidos e F é a constante de Faraday. Com esta equação tem-se uma relação linear quando plota-se uma curva de Δm vs ΔQ , com inclinação igual à massa molar da espécie desorvida segundo a equação abaixo:

$$\frac{\Delta m}{\Delta Q} = \frac{M}{nF} \quad \text{equação 6}$$

Para a desorção da SAM mista contendo os tiois 3amp e 11amu a Δm pode ser expressa como:

$$\Delta m = n_{3amp} M_{3amp} + n_{11amu} M_{11amu} \quad \text{equação 7}$$

e ΔQ para a mesma região de potenciais pode ser expressa como:

$$\Delta Q = n_{3amp} \gamma F + n_{11amu} \gamma F \quad \text{equação 8}$$

onde γ é a valência de eletrossorção para os tiois (neste caso específico $\gamma = 1$ para ambos os tiois). Combinando as **equações 7 e 8**, pode-se conhecer a massa molar da espécie desorvida (M_{ads}) durante a desorção das SAMs mistas, multiplicando a inclinação da reta pela constante de Faraday.

$$M_{ads} = \left(\frac{\Delta m}{\Delta Q} \right) \times F \quad \text{equação 9}$$

Este método permite descobrir as contribuições das regiões contendo somente 3amp, somente 11amu e regiões de transição de fases contendo ambos os tióis, para a variação de massa total observada com a dessorção redutiva.

A Figura 23 mostra a relação entre Δm e ΔQ para as SAMs mistas obtidas com diferentes tempos de incubação do substrato em solução contendo os tióis precursores. De acordo com a Figura 23 (com exceção da Figura 23a e 23d) a Δm em função da ΔQ pode ser dividida em três regiões **A**, **B** e **C**. A **região A** é atribuída à dessorção de domínios ricos em 3amp, visto que a M_{ads} , calculada com **equação 9**, é próxima da massa molar do 3amp. Na **região C** a M_{ads} varia de um valor que indica a adsorção de somente moléculas de 11amu até um valor nulo, indicando que a partir de um potencial todas as moléculas dos tióis forma dessorvidas.

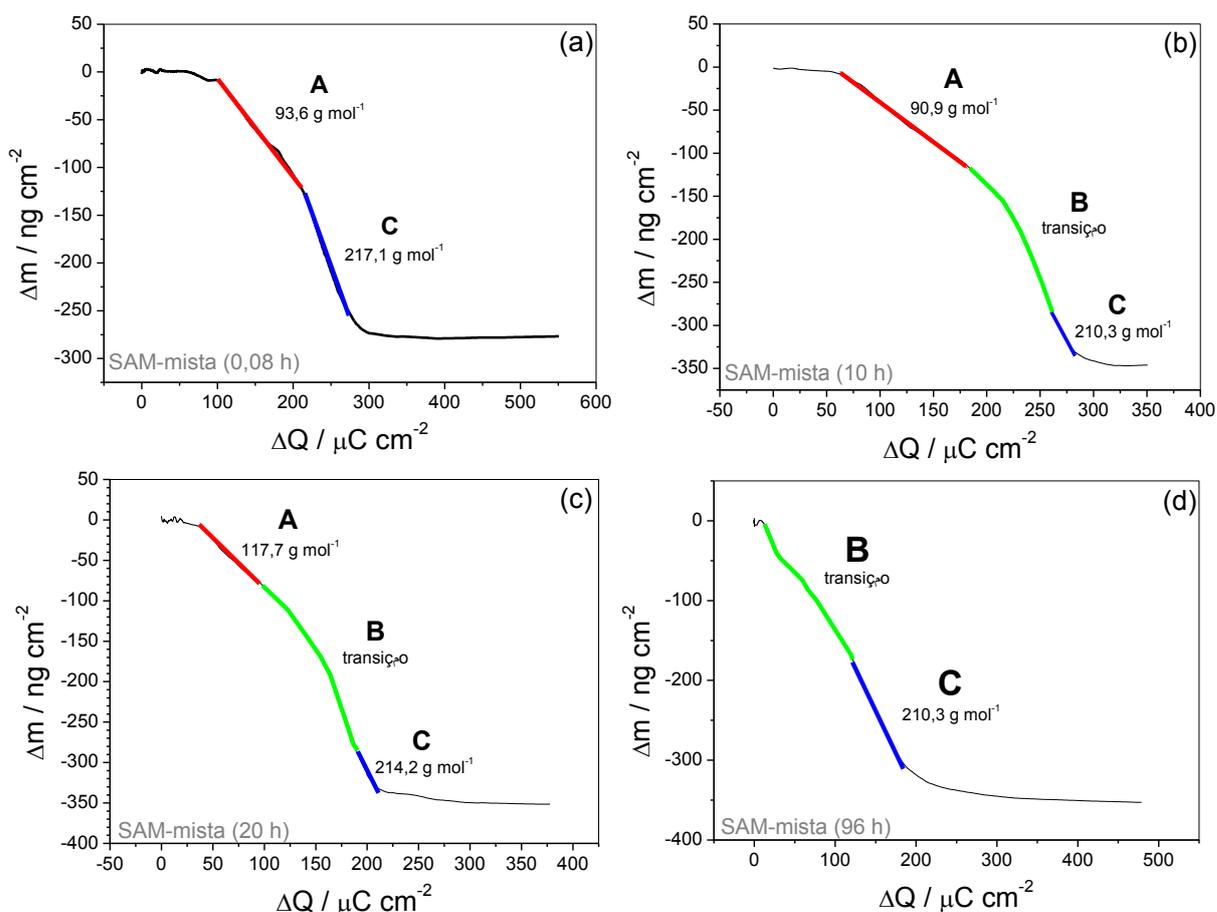


Figura 23: Valores de Δm vs ΔQ obtidos para a Figura 21, onde se observa a região de dessorção de domínios ricos em 3amp - **A** (—), região de transição de fases - **B** (—) e domínios ricos em 11amu - **C** (—).

Para a Figura 23a observa-se somente as regiões **A** e **C** devido ao tempo de incubação ser muito pequeno e com isso permitir que se formem domínios bem definidos de 3amp e 11amu, mas não ser suficiente para que se forme uma fase de transição apreciável entre esses domínios. Na Figura 23d observa-se apenas as regiões **B** e **C** porque o tempo de incubação é longo o suficiente para permitir que moléculas de 11amu desloquem moléculas de 3amp formando uma mistura homogênea em locais onde haviam domínios (em breves períodos de incubação), ricos em 3amp. Isso ocorre porque as interações entre moléculas de 11amu são mais estáveis que interações entre moléculas de 3amp, por isso ocorre deslocamento de moléculas de 3amp em longos períodos de incubação do substrato.

De fato, a afirmação de que a composição da **região A** é rica em 3amp está de acordo com a teoria. Visto que a dessorção redutiva da SAM-3amp ocorre em potenciais mais positivos que a SAM-11amu, em uma monocamada mista contendo ambos os tióis, se houvesse fases segregadas, domínios ricos em 3amp também se dessorveriam em potenciais mais positivos que domínios ricos em 11amu.

Quanto à **região B** a M_{ads} , calculada com a **equação 9** para cada ponto da curva, varia de uma região que indica adsorção de somente moléculas de 3amp, a um valor que indica adsorção de moléculas de 3amp e 11amu em proporções iguais e então para um valor que indica adsorção de somente 11amu. Logo, esta é a região de transição de fases, onde se tem uma mistura de ambos os componentes. Conforme esperado, nesta região o potencial de dessorção da SAM situa-se entre observado para as SAMs contendo os tióis puros, visto que a mistura dos tióis não é compacta como a SAM-11amu pura, mas também não apresenta apenas interações laterais de baixa intensidade como a SAM-3amp.

A Tabela 4 mostra os dados de Δm para cada região obtidos a partir da análise da Figura 23. De acordo com a Tabela observa-se que Δm correspondente à região de transição

de fases aumenta com o tempo de incubação de 10 para 20 horas, enquanto para 96 horas de incubação observa-se um recobrimento majoritário com 11amu.

Tabela 4: Δm (em ng cm^{-2}) referentes às regiões **A**, **B** e **C** da Figura 23

Tempo de incubação (horas)	Δm_{total}	Δm_{regA}	Δm_{trans}	Δm_{regC}
0,08	278,38	125,50	-	152,88
10	346,78	113,69	203,35	29,75
20	351,07	79,70	236,84	34,52
96	351,88	-	175,73	176,15

Δm_{regA} se refere a Δm da região A; Δm_{trans} se refere a Δm na região B e Δm_{regC} se refere a Δm na região C

Para calcular a composição da SAM mista na **região B**, deve-se considerar o comportamento da variação de massa em relação à M_{ads} e dessa forma assumir que, na região de transição de fases, têm-se uma proporção variando de um domínio rico em 3amp para um domínio rico em 11amu. A dessorção de SAMs ocorre por um processo de erosão^[54], dessa forma, é correto afirmar que na região de transição de fases a dessorção se inicia em domínios contendo um número maior de moléculas de 3amp do que 11amu, visto que os domínios ricos em 3amp são dessorvidos primeiro.

Assim, a partir da variação de M_{ads} na curva da Figura 24, pode se estabelecer como ocorre a distribuição das moléculas de 3amp e 11amu para cada situação na fase de transição. Para os tempos de incubação de 10, 20 e 96 horas os componentes da SAM mista estão distribuídos de forma hiperbólica, onde tem-se uma distribuição com as extremidades contendo 1:0 e 0:1 de 3amp:11amu, respectivamente, e um máximo correspondendo uma proporção fixa de 3amp:11amu.

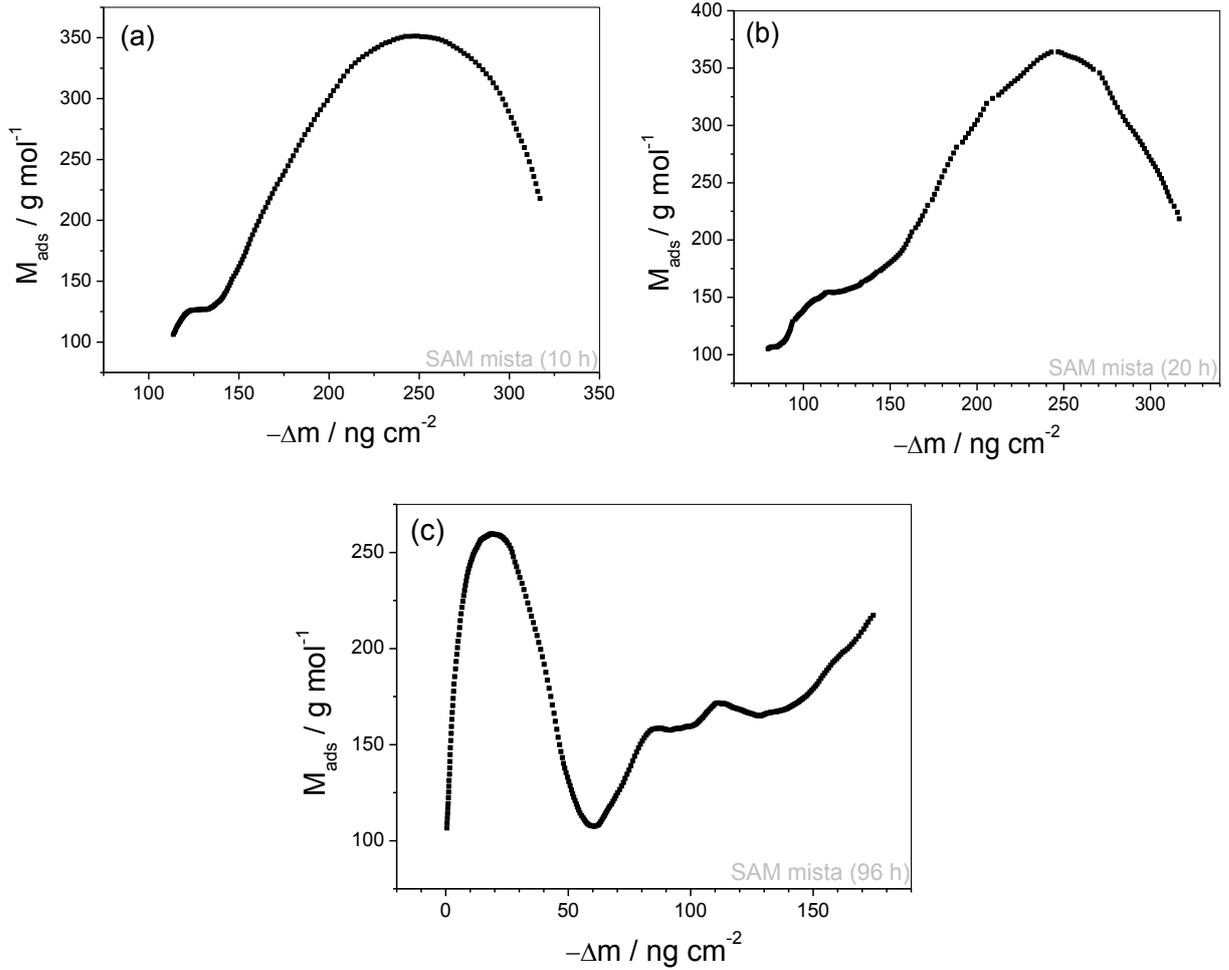


Figura 24: Valores de M_{ads} vs Δm da região de transição de fases observada na Figura 23 para as SAMs mistas obtidas com (a) 10, (b) 20 e (c) 96 horas de incubação do substrato em solução dos tióis precursores.

Para calcular qual a contribuição de cada tiol para a variação de massa deve-se então converter a variação de M_{ads} para uma proporção relacionada à massa molar de um dos tióis adsorvidos na mesma região (κ), que pode ser calculada da seguinte maneira:

$$\kappa_{11\text{amu}} = \frac{M_{11\text{amu}}}{M_{\text{ads}}} \quad \text{equação 10a}$$

e

$$\kappa_{3\text{amp}} = \frac{M_{3\text{amp}}}{M_{\text{ads}}} \quad \text{equação 10b}$$

A distribuição, tanto de 11amu ($\Phi_{11\text{amu}}$) quanto de 3amp ($\Phi_{3\text{amp}}$), correspondente à mesma região pode então ser calculada considerando que no início tem-se apenas 3amp e no

final tem-se somente 11amu, dessa forma respeitando a relação da curva observada na Figura 24. Logo a conversão é realizada da seguinte forma:

$$\Phi_{11amu} = -\kappa_{11amu} + \kappa_{11amu} \text{ máx} \quad \text{equação 11a}$$

e

$$\Phi_{3amp} = -\kappa_{3amp} + \kappa_{3amp} \text{ máx} \quad \text{equação 11b}$$

onde $\kappa_{11amu} \text{ máx}$ é o valor máximo de κ_{11amu} calculado com a **equação 10a** e $\kappa_{3amp} \text{ máx}$ é o valor máximo de κ_{3amp} calculado com a **equação 10b**. Neste ponto, é crucial observar a forma da curva M_{ads} vs Δm na Figura 24 para cada situação, pois o modelo de distribuição dos tiois é diretamente afetado pela ΔM_{ads} observada na região.

As SAMs mistas com 10, 20 e 96 horas de incubação do substrato apresentam uma distribuição gaussiana dos componentes da monocamada. Logo a distribuição de 11amu e 3amp pode ser aproximada de forma que as regiões extremas contenham 1:0 e 0:1 de 3amp:11amu, respectivamente, e um máximo correspondendo uma proporção fixa de 3amp:11amu (Fig. 25).

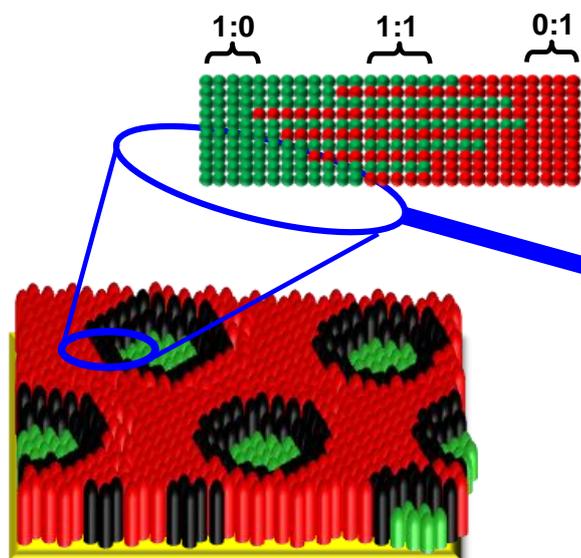


Figura 25: Representação da distribuição das moléculas de 3amp (●) e 11amu (●) para as SAMs mistas. O *inset* corresponde a representação da distribuição dos tiois na região de transição de fases (●).

Para as SAMs mistas (10 h) e (20 h) é correto afirmar que no ponto máximo tem-se uma distribuição de 1:1 dos tióis 11amu:3amp, visto que a M_{ads} no ponto máximo observado na Figura 24a e 24b é de aproximadamente 348 g mol^{-1} , e pode ser atribuída à adsorção de uma molécula de 11amu para cada molécula de 3amp, ambas hidratadas. Deve-se recordar que a dessorção é realizada em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e que neste potencial hidrogênionico o grupo terminal dos tióis encontra-se desprotonado, portanto possivelmente hidratados.

Baseando-se no modelo representado na Figura 25, a fração molar de 11amu pode ser calculada considerando que o ponto máximo de Φ_{11amu} corresponde a 0,5 da fração molar total de 11amu, visto que neste ponto a proporção é de 1:1 de 3amp:11amu. Assim χ'_{11amu} até o ponto $\Phi_{11amu \text{ máx}}$ pode ser calculado como se segue:

$$\chi'_{11amu} = \left(\frac{\Phi_{11amu}}{\Phi_{11amu \text{ máx}}} \right) \times 0,5 \quad \text{equação 12}$$

A partir do ponto máximo de Φ_{11amu} a fração molar de 11amu aumenta e a fração molar de 3amp diminui à medida que se aplica potenciais mais negativos para a dessorção das SAMs mistas. Com isso a fração molar de 11amu a partir do ponto máximo de Φ_{11amu} pode ser obtida a partir da seguinte equação:

$$\chi''_{11amu} = 1 - \left[\left(\frac{\Phi_{3amp}}{\Phi_{3amp \text{ máx}}} \right) \times 0,5 \right] \quad \text{equação 13}$$

A aplicação da **equação 13** para calcular a fração molar de 11amu a partir do ponto máximo de Φ_{11amu} é válida visto que $\Phi_{3amp \text{ máx}}$ e $\Phi_{11amu \text{ máx}}$ correspondem ao mesmo ponto da curva na Figura 24 e satisfazem a condição de que neste ponto têm-se uma proporção de 1:1 dos tióis. Assim sendo, a fração molar de 11amu na região de transição é conhecida e, então, a fração molar de 3amp pode ser calculada para a mesma região a partir da **equação 14**.

$$\chi_{3amp} = 1 - \chi_{11amu} \quad \text{equação 14}$$

A SAM mista (96 h) demonstra duas regiões com comportamentos distintos, uma região onde se observa uma distribuição gaussiana e outra com distribuição linear. A região gaussiana é tratada da mesma forma que a SAM mista (20 h), enquanto para a região linear a distribuição dos componentes segue uma relação de 1:0 e 0:1 de 3amp:11amu, respectivamente. Dessa forma a fração molar de 11amu (χ_{11amu}) é obtida diretamente da **equação 11a**, pois:

$$\chi_{11amu} = \Phi_{11amu} \quad \text{equação 15}$$

e a fração molar de 3amp (χ_{3amp}) pode ser obtida a partir da **equação 14**.

Conhecendo χ_{11amu} e χ_{3amp} para o intervalo de Δm , a contribuição de cada tiol é calculada multiplicando-se a fração molar de cada tiol pela variação de massa daquela região específica.

Conhecendo a variação de massa decorrente da dessorção de 3amp nas **regiões A e B** e de 11amu das **regiões B e C**, da Figura 23, é possível comparar os dados de dessorção das monocamadas com as respostas eletroquímicas observadas com a Figura 21. Os principais resultados são mostrados na Tabela 5, na qual se observa que apesar da SAM mista (0,08 h) não apresentar Δm_{total} similar as demais monocamadas mistas, a densidade de carga de redução (Q_r) da monocamada indica alto recobrimento da superfície. Além disso, a resposta eletroquímica de oxidação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ apresenta os maiores valores de I_{po} e o menor E_{po} , mesmo esta superfície não apresentando o maior recobrimento com 3amp (θ_{3amp}). O fato da SAM mista (0,08 h) não apresentar uma região de transição de fases é decorrente da formação de ilhas de 3amp maiores e bem definidas, o que resulta em uma menor resistência a transferência eletrônica e, conseqüentemente, respostas mais reversíveis e maiores densidades de corrente para a oxidação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$.

Tabela 5: Comparação das respostas eletroquímicas com as Δm durante a dessorção das SAMs mistas

Incubação (h)	Tempo de incubação (h)			
	0,08	10	20	96
Δm_{total} (ng cm ⁻²)	278,38	346,78	351,07	351,88
Δm_{trans} (ng cm ⁻²)	----	203,35	236,84	175,73
$\Delta m_{trans-3amp}$ (ng cm ⁻²)	----	82,35	93,49	69,84
$\Delta m_{trans-11amu}$ (ng cm ⁻²)	----	143,35	121,00	105,89
θ_{3amp} (%)	45,08	56,52	49,33	19,84
θ_{11amu} (%)	54,92	43,47	50,66	80,15
Q_r (μC cm ⁻²)	199,63	192,51	193,43	203,17
I_{po} (μA)	43,16	31,55	38,13	25,36
E_{po} (mV)	380	467	416	694

Quanto à SAM mista (10 h), apesar de ser a monocamada com maior porcentagem de recobrimento com moléculas de 3amp (θ_{3amp}) e apresentar Δm_{total} e Q_r muito próximas ao observado para a SAM mista (20 h), ela apresenta menor I_{po} , e E_{po} mais deslocado para potenciais positivos. Acredita-se que isto se deve à desordem dos domínios de 3amp ocasionada pelo deslocamento de moléculas de 3amp por moléculas de 11amu, sendo que estas últimas não se encontram organizadas impondo uma maior resistência a transferência eletrônica entre o $[Fe(CN)_6]^{4-}$ e a superfície do eletrodo.

Ao aumentar o tempo de incubação para 20 horas, observa-se um sensível aumento da I_{po} e o E_{po} se desloca para potenciais mais negativos tornando o sistema mais reversível. Ainda que a SAM mista (20 h) apresente maior θ_{11amu} e menor θ_{3amp} que a SAM mista (10 h), sua I_{po} é mais elevada e o E_{po} mais reversível, isto comprova que tanto os domínios ricos em 3amp, quanto os domínios ricos em 11amu se encontram mais organizados, oferecendo menor resistência a transferência eletrônica do par redox.

Já a SAM mista (96 h) apresenta o maior θ_{11amu} e não se observa domínios ricos em 3amp evidenciando que em períodos muito longos de incubação ocorre a formação de uma mistura quase homogênea dos tióis 11amu e 3amp em regiões antes ocupadas majoritariamente por moléculas de 3amp. O deslocamento no E_{po} para potenciais mais positivos e a menor I_{po} , mostrados na Tabela 5, confirmam a presença de uma fase homogênea em tempos muito elevados de incubação do substrato. Isto ocorre porque em fases homogêneas a barreira para transferência eletrônica é imposta pelo tiol de cadeia mais longa [53, 56]. Nestes casos o par redox não consegue acessar a superfície do substrato metálico a uma distância que permita a ocorrência do processo eletroquímico, acarretando em um sobrepotencial mais elevado para sobrepor a barreira energética.

Assim optou-se por seguir os estudos utilizando a SAM mista formada por incubação do substrato de ouro por um período de 20 horas em solução etanólica contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de 11amu e $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de 3amp, visto que a SAM mista formada nessas condições apresenta domínios distintos de 3amp e 11amu e também a melhor relação entre tamanho dos domínios ricos em 3amp (menores que para a SAM mista (0,08 h)) e organização efetiva da monocamada.

4.3.2. Configuração superficial da SAM mista

Um modelo desenvolvido por Amatore et al. [143] permite calcular o recobrimento da superfície do eletrodo por uma monocamada assumindo algumas aproximações [135]. De acordo com este modelo a resposta eletroquímica do par redox ocorre exclusivamente na superfície de *pinholes* [45]. Estes por sua vez, estão distribuídos regularmente pela superfície do substrato apresentando um diâmetro fixo, tal como a representação da SAM mista na

Figura 25. Tais aproximações fazem com que a SAM, de um componente isolante, seja considerada um conjunto de UME e aplicando o modelo de Amatore et al. podemos calcular o raio dos *pinholes* e a distância entre eles. Entretanto, para a SAM mista, as respostas de corrente observadas com a voltametria cíclica e os dados da EIE indicam que ocorre efeito de tunelamento quântico dos elétrons através da SAM, dessa forma o modelo de Amatore et al. pode ser adaptado para calcular o raio das ilhas de 3amp (*pinholes*) e a distância inativa entre elas (regiões ricas em 11amu), já que a resposta eletroquímica do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ é controlada por essas ilhas.

Para calcular o recobrimento da superfície do eletrodo utiliza-se a seguinte equação:

$$\theta_R = 1 - \left(\frac{R_{tc}^{Au}}{R_{tc}^{SAM}} \right) \quad \text{equação 16}$$

onde θ_R é o recobrimento da superfície, R_{tc}^{Au} é a resistência de transferência de carga do eletrodo de Au não modificado e R_{tc}^{SAM} é a resistência de transferência de carga da superfície do eletrodo de Au modificado com a SAM. De acordo com os espectros de plano complexo mostrados na Figura 26, para simulação dos espectros utilizando um circuito de Randles modificado observou-se uma R_{tc} de 17,14 k Ω para a SAM mista e 0,23 k Ω para o eletrodo de ouro não modificado. Assim têm-se $\theta_R = 0,986$ para a SAM mista.

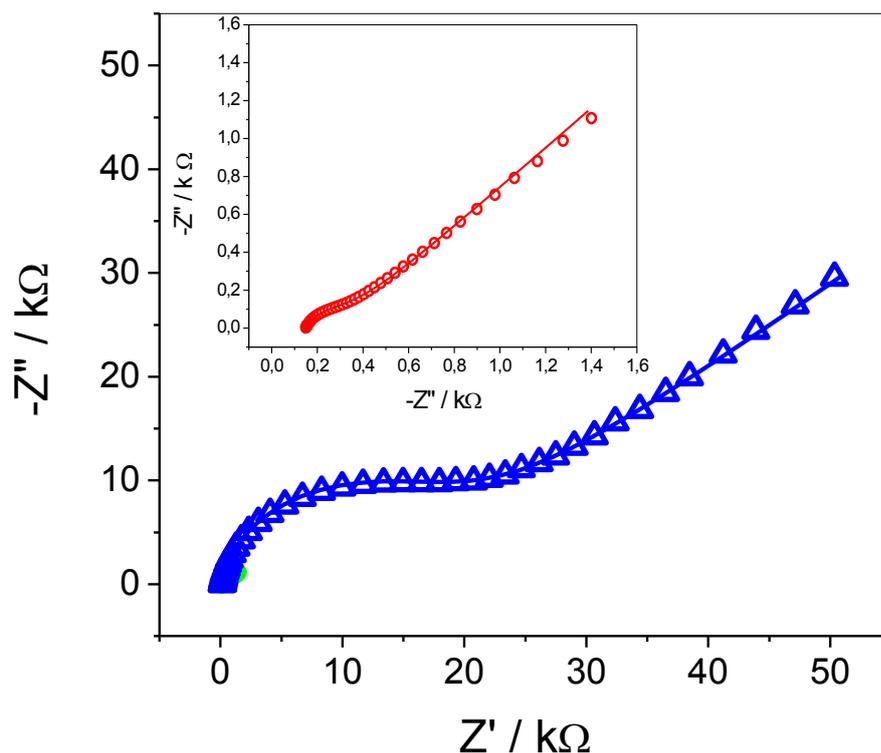


Figura 26: Espectros de plano complexo obtidos para o ouro limpo (●) e SAM mista (◆). Eletrólito suporte tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 3,0 contendo 6,0 mmol L⁻¹ de [Fe(CN₆)^{4-/3-}]. Faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz, onda senoidal de 10 mV aplicada no E_{po} observado na Figura 14 para cada superfície. As linhas ultrapassando os identificadores são os resultados de simulação com *software* empregando o circuito de Randles modificado.

Quando $\theta_R > 0,9$ a equação acima não é apropriada para calcular o recobrimento, então, deve-se usar a seguinte equação:

$$\theta_\sigma = 1 - \left(\frac{\sigma_w}{m - \sigma_w} \right) \quad \text{equação 17}$$

onde σ_w é o coeficiente angular da impedância de Warburg obtido do eletrodo de ouro não modificado ($\sigma_w = 0,94$), m é a inclinação da curva da impedância real (Z') vs $\omega^{-1/2}$ em regiões de altas frequências obtidos com o eletrodo de ouro recoberto com a SAM (ω é a frequência radial aplicada no eletrodo ($\omega = 2\pi f$)). A Figura 27 mostra o gráfico de Z' vs $\omega^{-1/2}$, onde obteve-se um valor de $m = 1,47 \times 10^5 \Omega \text{ s}^{-1/2}$ para a região linear de altas frequências.

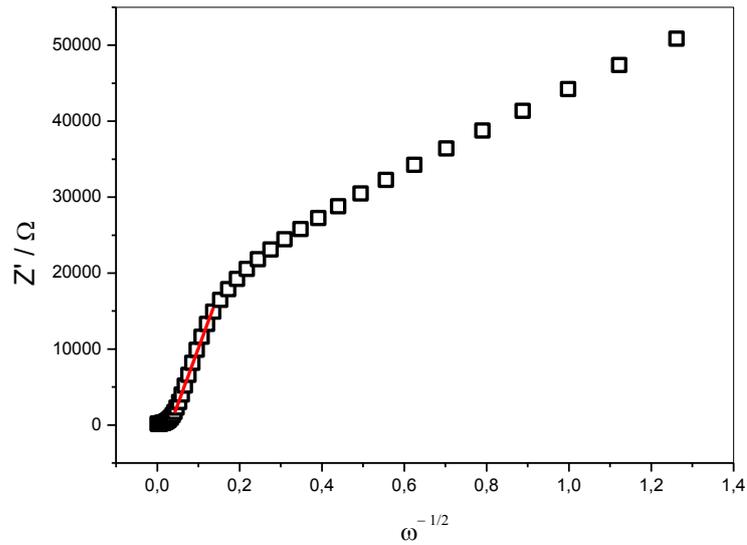


Figura 27: Relação de Z' vs $\omega^{-1/2}$ observada para a SAM mista

Substituindo-se os valores na **equação 17** tem-se $\theta_\sigma = 0,999$

Na seqüência, construindo-se um gráfico de Z'' vs $\omega^{-1/2}$, onde Z'' é a impedância imaginária obtida com a EIE, obtêm-se um valor máximo de $\omega^{-1/2}_{\text{máx}}$ na região de altas frequências que está relacionado com a frequência de transição radial, q . Conhecendo-se o valor de $\omega^{-1/2}_{\text{máx}}$, utiliza-se o seu correspondente $\omega_{\text{máx}}$ para calcular q pela equação:

$$\omega_{\text{máx}} = \frac{q}{2} \quad \text{equação 18}$$

Com a Figura 28 encontrou-se $0,136 \text{ s}^{-1/2}$ para $\omega^{-1/2}_{\text{máx}}$ e, conseqüentemente, seu correspondente $\omega_{\text{máx}}$ é $53,75 \text{ s}^{-1}$. Assim, utilizando a **equação 18** obtém-se $q = 107,50 \text{ s}^{-1}$.

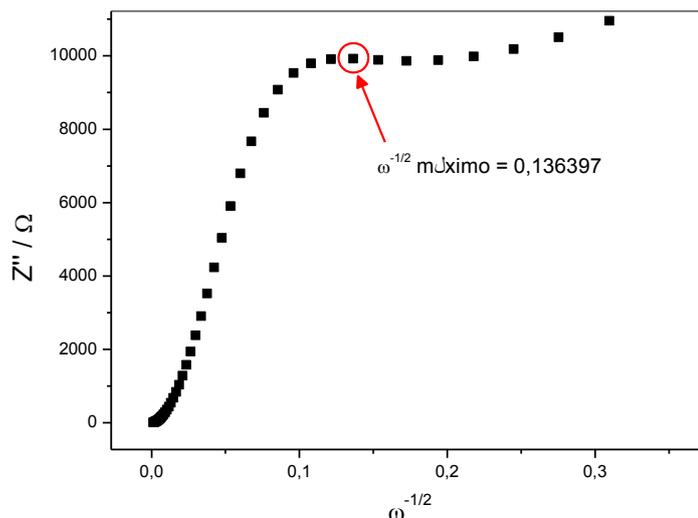


Figura 28: Relação de Z'' vs $\omega^{-1/2}$ observada para a SAM mista

Conhecendo o valor da frequência de transição radial, o raio das ilhas de 3amp formadas na SAM mista pode ser estimado por meio da equação:

$$q = \frac{D_o}{0,36 \cdot r_a^2} \quad \text{equação 19}$$

onde D_o é o coeficiente de difusão total do analito ($7,17 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$). Assim, com a **equação 19** obteve-se um raio de $4,30 \times 10^{-4} \text{ cm}$, ou $4,3 \text{ }\mu\text{m}$. Este seria o valor para o raio médio dos domínios ricos em 3amp formados na SAM mista.

Conhecendo o valor de r_a calcula-se o raio da região inativa entre os domínios ricos em 3amp, ou seja, o raio dos domínios ricos em 11amu, r_b , segundo a equação abaixo:

$$1 - \theta = \frac{r_a^2}{r_b^2} \quad \text{equação 20}$$

De acordo com a **equação 20**, o raio ocupado por moléculas de 11amu entre os domínios ricos em 3amp é de $37,71 \text{ }\mu\text{m}$. Portanto, de acordo com o modelo proposto por

Amatore et al., a SAM mista apresenta uma configuração de acordo com a Figura 29, apresentando domínios ricos em 3amp e domínios ricos em 11amu.

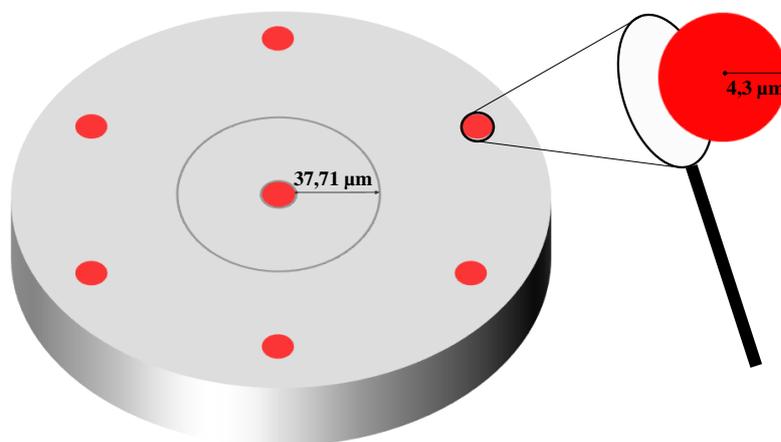


Figura 29: Representação da SAM mista formada por domínios ricos em 3amp (●) com raio de 4,3 µm circundados por uma região inativa de raio 37,71 µm formados por moléculas de 11amu (●).

A configuração da SAM mista projetada pelo modelo de Amatore et al. como um conjunto de ultramicroeletrodos deveria resultar em um voltamograma cíclico sigmoidal tal como mostrado no *inset* da Figura 30, porém com uma corrente limite maior. Todavia o perfil voltamétrico obtido com a SAM mista apresenta um máximo seguido de uma queda na corrente. Os principais motivos para essa diferença de comportamento são a limitação do transporte de massa da espécie eletroativa dentro do canal formado pela recessão das ilhas de 3amp, como mostrado na Figura 20, e as aproximações de que a SAM mista possui domínios ricos em 3amp estritamente esféricos e com tamanhos e distância regulares entre si ^[52]. Estudos com STM comprovam que essas suposições dificilmente são válidas para deposição por co-adsorção de tióis e que os domínios ricos em um tiol são em geral na escala de nanômetros de diâmetros ^[76-77, 144-145]. Sendo assim, os resultados obtidos com o modelo de Amatore et al. apoiam a formação de uma SAM mista com configuração de um conjunto de ultramicroeletrodos, mas superestima o diâmetro dos domínios de 3amp.

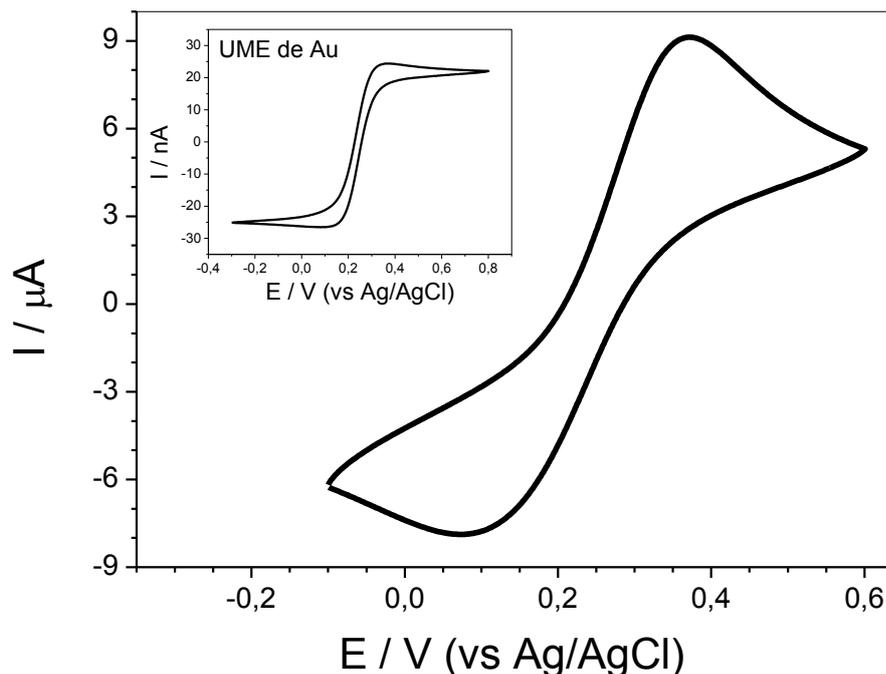


Figura 30: Voltamograma cíclico obtido em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $6,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ com velocidade de varredura de 5 mV s^{-1} para a SAM mista. *Inset:* voltamograma cíclico utilizando um ultramicroeletrodo de ouro não modificado de $25 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro a 100 mVs^{-1} no mesmo eletrólito suporte.

Ainda que com este modelo tenha sido calculado $4,3 \text{ }\mu\text{m}$ de raio para os domínios de 3amp, é provável que o modelo não descreva corretamente o sistema, visto que a resposta eletroquímica não ocorre sobre a superfície metálica e sim por efeito quântico de tunelamento de elétrons pela cadeia de 3amp. Também deve-se destacar que, conforme estabelecido pelos resultados de MECQ, há uma região de transição de fases, nos limites dos domínios de 3amp e dos domínios de 11amu, que também pode contribuir com as respostas de corrente. No entanto essa contribuição não é uniforme, visto que sua composição varia com a distância dos domínios.

Entretanto, os resultados experimentais obtidos até então, estabelecem que a SAM mista formada por co-adsorção dos tiois 3amp e 11amu apresenta configuração de um conjunto de UMEs. Os domínios ricos em 3amp representam a área eletroativa e os domínios ricos em 11amu a área inativa do conjunto. Deste modo, sua aplicação como sensor eletroquímico, plataforma para imobilização enzimática, estabilização de nanopartículas

metálicas ou até mesmo para ancoragem de fármacos podem enfim ser exploradas. Neste trabalho, a SAM mista foi utilizada como sensor para o estudo eletroquímico do flavonóide fisetin.

4.4. Estudo do comportamento eletroquímico do fisetin

Com os parâmetros para obtenção da SAM-mista contendo 3amp e 11amu definidos, prosseguiu-se com a aplicação do eletrodo modificado no estudo do comportamento eletroquímico e determinação de fisetin (3,3',4',7-tetrahidroxiflavona) em água pura.

4.4.1. Estudo do mecanismo redox do fisetin

A seguir avaliou-se o comportamento eletroquímico do fisetin, frente às diferentes superfícies eletródicas, utilizando a voltametria cíclica. Os perfis voltamétricos registrados na Figura 31, correspondem a respostas distintas para cada modificação, tal como observado para o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ nos resultados discutidos anteriormente.

O eletrodo de ouro e a SAM-3amp apresentam respostas eletroquímicas semelhantes entre si. De acordo com a Figura 31 (a) e (b) observa-se três ondas de oxidação pouco definidas na região de 0,42 a 0,7 V. Ao inverter a varredura para potenciais mais negativos observa-se um processo bem definido em 0,39 V e uma onda de redução em 0,095 V. Com a SAM-11amu, observa-se apenas um processo redox, o qual apresenta potenciais de pico afastados, indicando que a reversibilidade do processo redox do fisetin é influenciada pela modificação da superfície com 11amu. A SAM mista demonstra um comportamento

eletroquímico semelhante a SAM-11amu, no entanto o processo redox é completamente reversível e as correntes de pico são maiores.

Também se observa que ocorre a formação de um filme sobre a superfície do eletrodo de ouro e da SAM-3amp enquanto para a SAM mista e para a SAM-11amu não se observa variação significativa do perfil voltamétrico realizados em eletrólito puro após 10 ciclagens em solução contendo fisetin. O processo de redução próximo a 0,39 V observado para o eletrodo de ouro e para a SAM-3amp, permanece evidente mesmo após lavar os eletrodos com água pura e deixá-los imerso em eletrólito puro por 15 minutos. Já com a SAM mista e com a SAM-11amu o mesmo tratamento resulta em um voltamograma muito próximo do observado antes das ciclagens com fisetin.

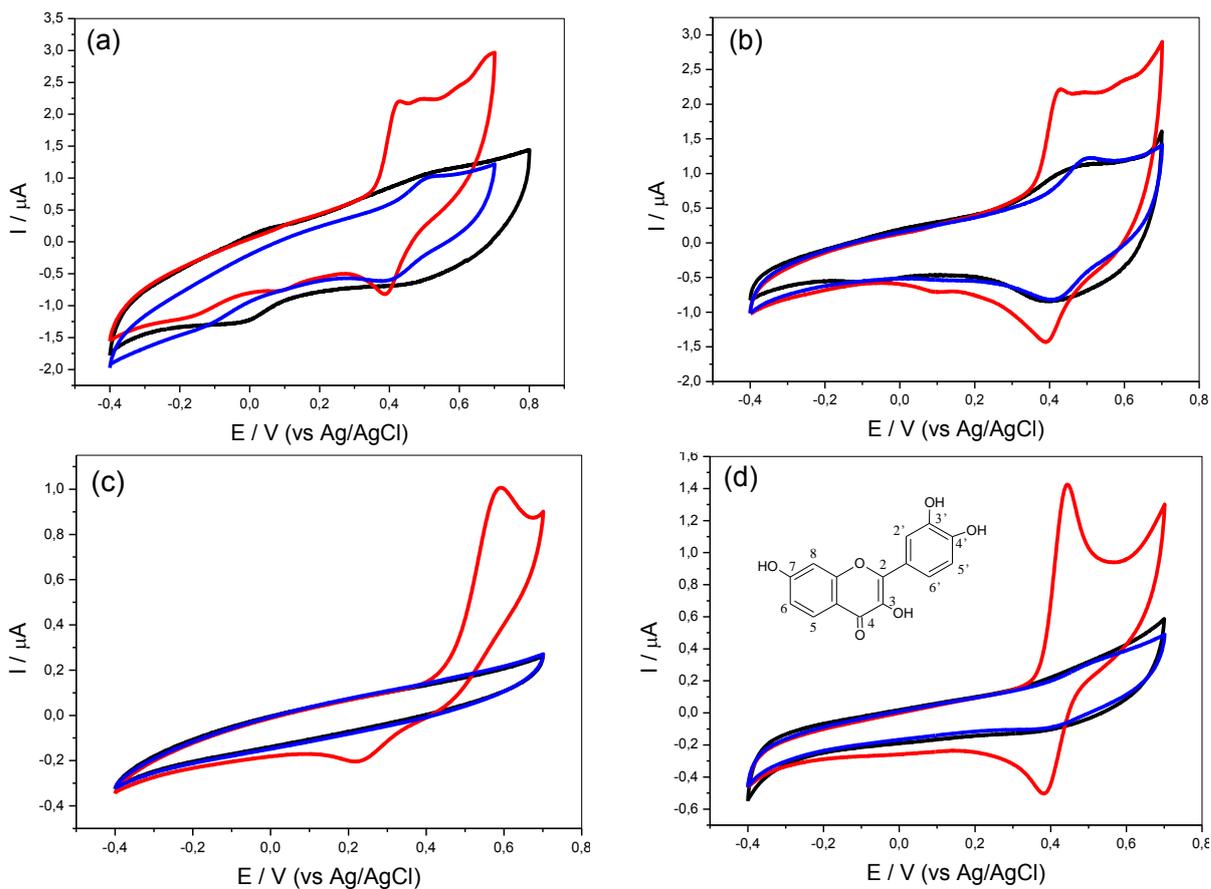


Figura 31: Voltamogramas cíclicos para o eletrodo de ouro (a), SAM-3amp (b), SAM-11amu (c) e SAM mista (d), obtidos em eletrólito tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 3,0 (—), contendo 4,5 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de fisetin (—) e novamente em eletrólito puro após 10 varreduras cíclicas na presença de fisetin (—). Velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

O perfil voltamétrico obtido para as superfícies de ouro e SAM-3amp é muito semelhante ao observado por Marković et al. [123] sobre superfície de carbono vítreo. A onda de oxidação observada em potenciais mais negativos é atribuída à oxidação do grupo catecol do fisetin em C3' e C4' (visualizados no *inset* da Figura 31 (d)) para a *o*-quinona correspondente. Essa oxidação é seguida por um rearranjo intramolecular que restaura o grupo catecol, formando uma nova espécie oxidável (Fig. 32). Isso é possível devido ao extenso sistema π -conjugado que causa uma deslocalização eletrônica por toda a estrutura química da molécula. O terceiro processo de oxidação consiste na oxidação do grupo hidroxila em C7.

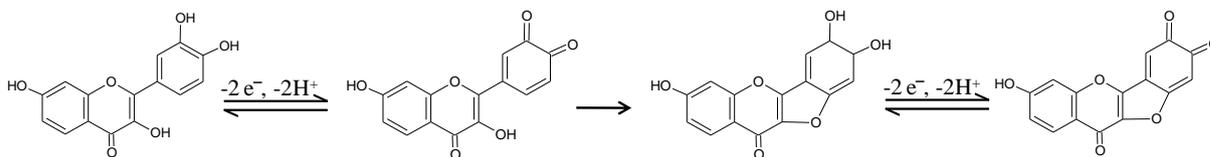


Figura 32: Mecanismo de oxidação proposto para o fisetin em soluções tamponadas [146].

A presença de somente um pico de oxidação e redução para a SAM-11amu e SAM mista sugere a ocorrência de somente o primeiro processo redox do analito. Para essas condições experimentais, não ocorre o rearranjo intramolecular do fisetin, observado para o ouro e para a SAM-3amp. Este mesmo mecanismo foi proposto por Brondani et al. [118] ao determinar fisetin com um sensor baseado em nanopartículas de ouro e complexo de níquel imobilizados em sílica.

A dependência do potencial de oxidação do fisetin frente a SAM mista com o pH do eletrólito também foi avaliada utilizando a voltametria linear. Na Figura 33 é mostrado a dependência da I_{po} e do E_{po} em função do pH. O deslocamento do E_{po} para valores mais negativos com o aumento do pH, demonstra uma relação linear com inclinação de 67,7 mV por unidade de pH. Tal inclinação da curva sugere o envolvimento do mesmo número de

prótons e de elétrons na reação de eletro-oxidação do fisetin como proposto no mecanismo da Figura 32^[123].

Na mesma faixa de pH observa-se que a I_{po} também aumenta até um valor máximo no pH 5,0, após o qual a I_{po} diminui drasticamente. Este comportamento pode ser atribuído a intensidade da interação entre o fisetin e os domínios ricos em 3amp ou ricos em 11amu presentes na superfície da SAM mista.

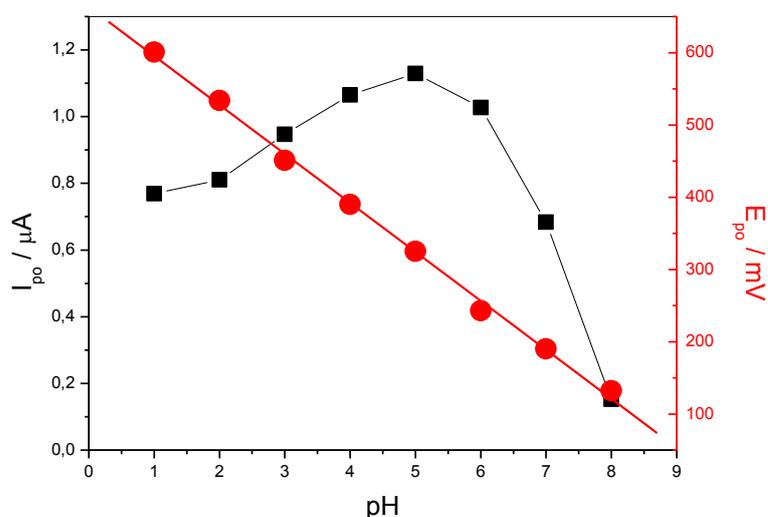


Figura 33: Efeito do pH no E_{po} (●) e I_{po} (●) para a oxidação do fisetin sobre a SAM mista em tampão BR 0,1 mol L⁻¹ contendo 4,0 mmol L⁻¹ de fisetin.

Para a compreensão adequada do mecanismo eletroquímico envolvido na interface do eletrodo é importante conhecer o pK_a tanto do analito, quanto dos tióis adsorvidos no substrato. O fisetin possui quatro hidrogênios ionizáveis, enquanto tanto o 3amp quanto o 11amu possuem apenas um, mas a principal influência do pH na resposta de corrente de oxidação está na diferença entre o pK_a da SAM-3amp e da SAM-11amu (Fig. 34).

De acordo com Zhao et al.^[134] o pK_a da SAM-3amp é aproximadamente 5,2, logo no pH 5,0 os domínios ricos em 3amp encontram-se parcialmente dissociados, portanto com carga líquida negativa. Acredita-se que neste ponto a interação entre a molécula de fisetin e a superfície os domínios de 3amp é energeticamente mais favorável que a interação com os domínios de 11amu, uma vez que os domínios de 11amu encontram-se quase totalmente

protonados. Dessa forma, ao aumentar o pH do eletrólito a intensidade da interação do analito com a superfície nos domínios ricos em 3amp também aumenta até um valor máximo de pH 5,0, ocasionando o aumento da I_{po} observada. Ao aumentar o pH da solução para 6,0 as moléculas de 11amu encontram-se dissociadas, como resultado a I_{po} diminui já que tanto os domínios ricos em 3amp quanto domínios ricos em 11amu podem interagir com fisetin. Com valores de $pH \geq 7,0$ moléculas de fisetin também se apresentam parcialmente dissociadas, isso faz com que interações repulsivas prevaleçam entre a molécula de analito e a SAM mista, dificultando a aproximação de fisetin até a superfície, e conseqüentemente diminuindo drasticamente a taxa de oxidação do substância.

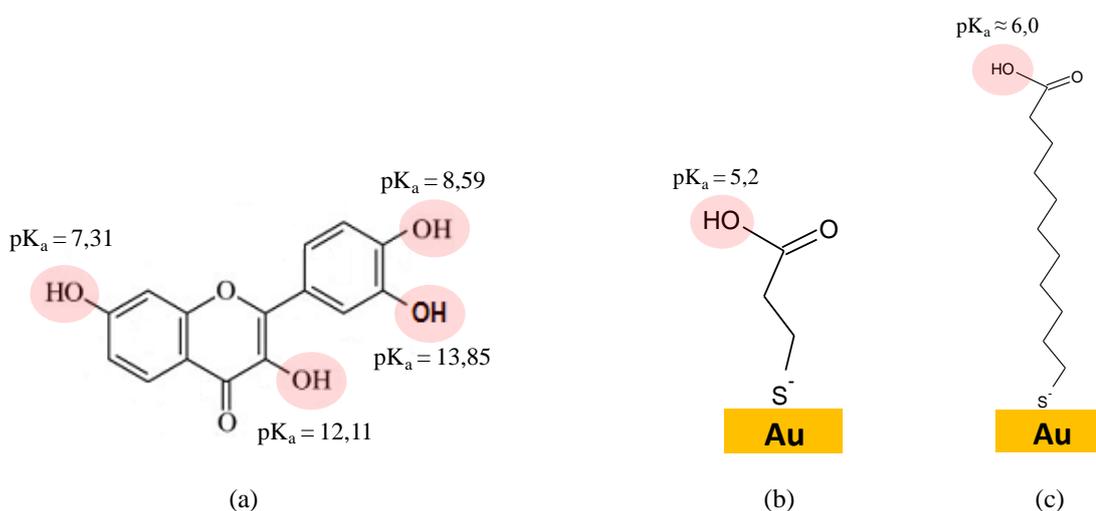


Figura 34: pK_a para os hidrogênios ionizáveis do fisetin ^[125] (a), da SAM-3amp ^[134] (b) e da SAM-11amu ^[63] (c).

A melhor resposta de corrente foi obtida no pH 5,0, logo todas as demais medidas foram realizadas em tampão BR 0,1 mol.L⁻¹ pH 5,0 (ajustado com NaOH 5,0 mol.L⁻¹). Com a finalidade de se evidenciar o tipo de transporte de massa envolvido no processo de oxidação do fisetin foi realizado um estudo de variação da velocidade de varredura no intervalo de 10 a 200 mV s⁻¹. Na Figura 35 são mostrados os voltamogramas cíclicos obtidos, onde se observa uma relação linear entre a I_{po} em função da velocidade de varredura que pode ser descrito pela equação $I_{po} (\mu A) = 0,414 + 4,2 \times 10^{-3} v (mV s^{-1})$, com $r = 0,9965$. De acordo com esses

resultados a cinética de transferência eletrônica é controlada por adsorção das espécies na superfície da SAM mista. Golabi et al.^[146], utilizando um eletrodo de carbono vítreo, também caracterizaram o processo redox do fisetin (em pH 6,0) como controlado por adsorção da espécie eletroativa na superfície do eletrodo.

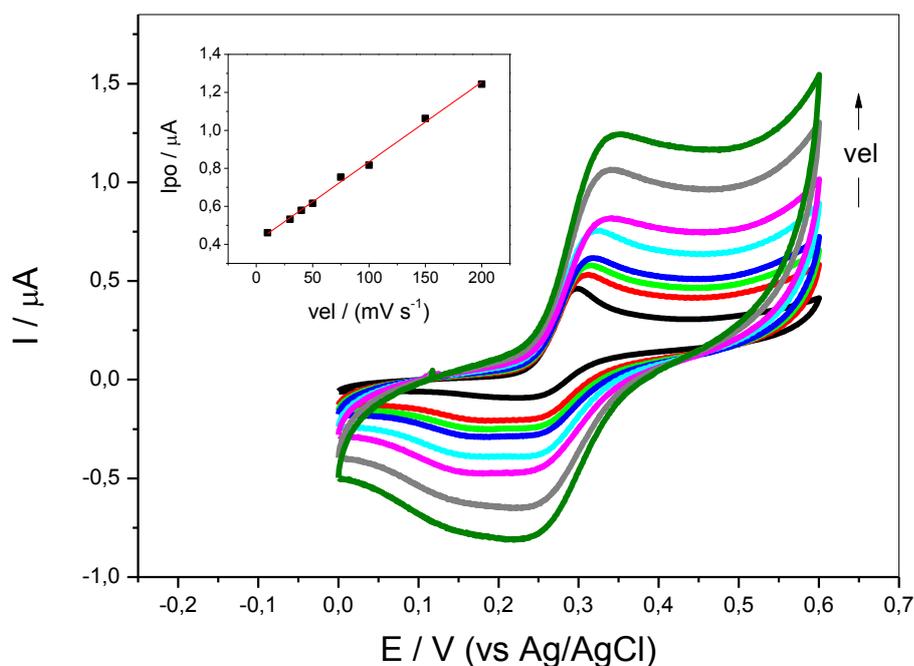


Figura 35: Voltamogramas cíclicos para a SAM mista em tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0 contendo 0,4 mmol L⁻¹ de fisetin nas velocidades de 10; 30; 40; 50; 75; 100; 150 e 200 mV s⁻¹. Inset: relação linear entre I_{po} e velocidade de varredura.

Embora o mecanismo de oxidação do fisetin seja controlado por adsorção na superfície do eletrodo, o produto de oxidação não permanece adsorvido. Na Figura 31 (d), mesmo após 10 ciclos na presença do analito, após lavar o eletrodo contendo a SAM mista com água pura, o voltamograma em eletrólito puro não apresenta nenhum processo redox referente a espécies adsorvidas. É certo que esse fenômeno está relacionado com a presença de domínios ricos em 11amu, visto que somente a SAM-11amu e a SAM mista exibiram este comportamento. Assim sendo, acredita-se que o tamanho dos domínios de 3amp e o fato de apresentarem espessura reduzida, se comparados a espessura dos domínios de 11amu, fazem

com que após o grupo catecol ser oxidado o ambiente químico seja desfavorável para que ocorra o rearranjo e a espécie se difunde para a solução.

4.4.2. Construção da curva analítica para fisetin em água pura

4.4.2.1. Otimização dos parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada

Os parâmetros da voltametria de onda quadrada que influenciam a resposta eletroquímica do analito são a amplitude de pulso (A), o incremento de potencial (ΔE_s) e frequência de aplicação do pulso (f). A resposta de I_p aumenta com o aumento da amplitude, mas acima de 70 mV não ocorre um aumento significativo de corrente enquanto a área do pico aumenta linearmente, assim fixou-se a amplitude de pulso em 70 mV. Fixando-se a amplitude de pulso em 70 mV e variando-se a frequência de aplicação de pulso de 10 a 100 Hz, observou-se a melhor relação entre I_p e área do pico em 60,0 Hz e incremento de potencial de 1,0 mV.

Portanto, a fim de testar a viabilidade da SAM mista como sensor eletroquímico procedeu-se a construção da curva analítica em água, com os parâmetros da voltametria de onda quadrada otimizados.

4.4.2.2. Curva analítica

Com todas as condições otimizadas, construiu-se uma curva analítica utilizando a SAM mista como eletrodo de trabalho e tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0 como eletrólito

suporte. A curva analítica mostrada na Figura 36 apresentou uma resposta linear no intervalo de $1,9 \times 10^{-8}$ a $2,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de fisetin.

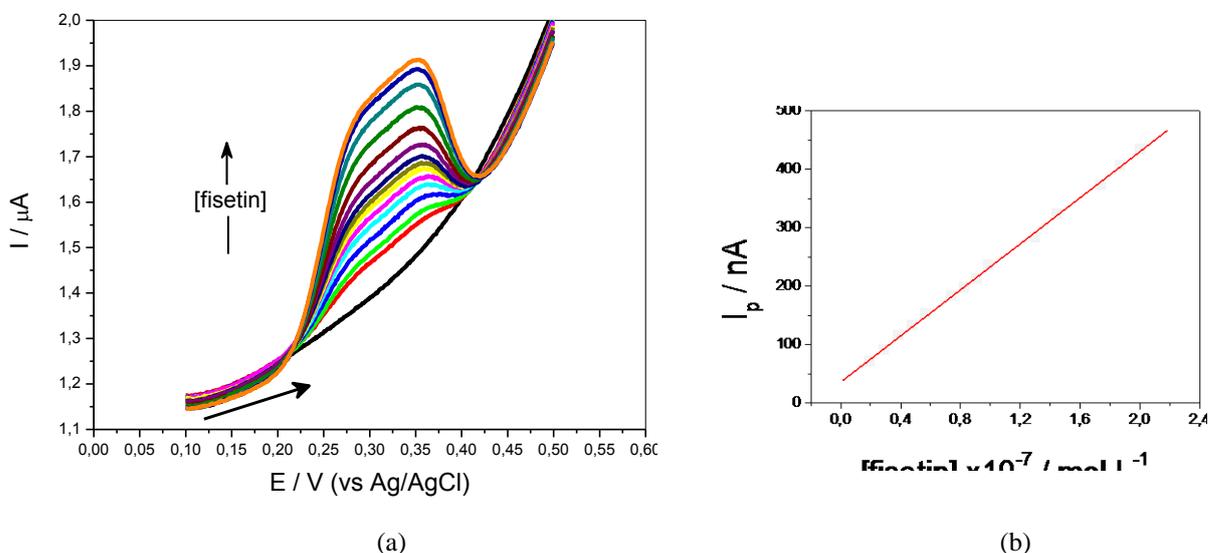


Figura 36: (a) Voltamogramas de onda quadrada obtidos com fisetin nas concentrações de $1,96 \times 10^{-8}$; $2,91 \times 10^{-8}$; $3,85 \times 10^{-8}$; $4,76 \times 10^{-8}$; $5,66 \times 10^{-8}$; $7,41 \times 10^{-8}$; $8,26 \times 10^{-8}$; $9,09 \times 10^{-8}$; $9,91 \times 10^{-8}$; $1,3 \times 10^{-7}$; $1,45 \times 10^{-7}$; $1,74 \times 10^{-7}$; $1,87 \times 10^{-7}$ e $2,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ em tampão BR 0,1 mol.L⁻¹ pH 5,0. $f = 60$ Hz, $\Delta = 70$ mV e $\Delta E_s = 1,0$ mV. (b) curva analítica de I_p (obtidas em 353 mV) em função da concentração de fisetin.

Observa-se linearidade entre a resposta eletroquímica do fisetin e a concentração do mesmo em solução. O fator de correlação linear encontrado foi de 0,999 e a equação da reta correspondente a curva analítica é:

$$I_{po} \text{ (A)} = 3,57 \times 10^{-8} + 1,97 \text{ (A / mol L}^{-1}\text{)} [\text{fisetin}] \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$$

O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram calculados segundo recomendação da IUPAC^[147] a partir da equação:

$$LD = \frac{3 S_b}{\alpha} \qquad LQ = \frac{10 S_b}{\alpha} \qquad \text{equação 21}$$

onde S_b é o desvio padrão de dez medidas realizadas nas mesmas condições experimentais mas com a ausência do analito ($S_b = 1,09 \times 10^{-8}$ A) e α é a inclinação da curva analítica

experimental ($1,97 \text{ A mol}^{-1}$). Assim obteve-se $1,66 \times 10^{-8}$ e $5,53 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para LD e LQ, respectivamente.

O LD obtido utilizando a SAM mista como sensor eletroquímico para o fisetin é menor que o relatado na literatura utilizando outras superfícies eletródicas. Brondani et al. [118], por exemplo, obtiveram um LD de $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ utilizando um sensor a base de nanopartículas de ouro imersas em líquido iônico. Jiang et al. [124] aplicando a técnica de eletroforese capilar alcançou um LD de $2,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Volikakis et al. [126] utilizou um sistema em fluxo e um sensor a base de grafite modificado chegando a um LD de $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Nota-se então que a modificação da superfície com a SAM mista apresenta o menor LD quando comparada com os trabalhos mencionados acima, logo os resultados mostram-se promissores, visto que o eletrodo modificado com a SAM mista possibilita a análise de amostras contendo até $4,78 \mu\text{g L}^{-1}$ do analito.

Avaliando as respostas de corrente para uma concentração fixa de fisetin, mas utilizando as monocamadas dos tiois puros como sensores, observa-se uma I_p de apenas 32,27 e 8,37 % para a SAM-3amp e SAM-11amu, respectivamente, quando comparada com o valor de I_p obtida com a SAM mista (Fig. 37).

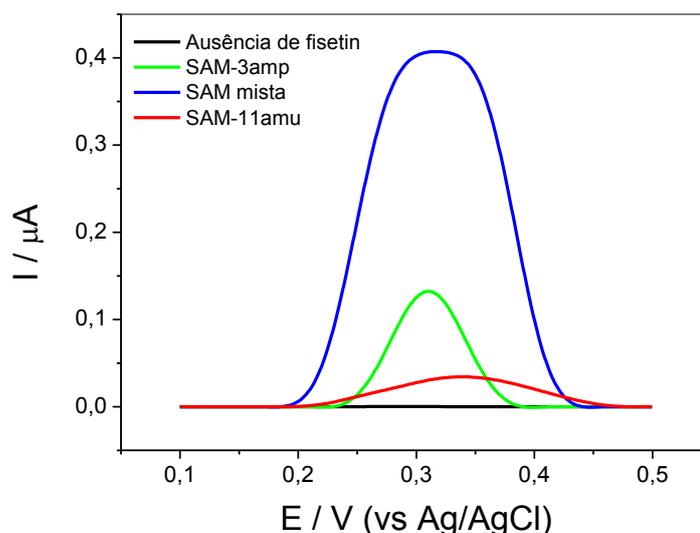


Figura 37: Voltamogramas de onda quadrada obtidos em tampão BR $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 5,0 contendo $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de fisetin. $f = 60 \text{ Hz}$, $\Delta = 70 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 1,0 \text{ mV}$ com fisetin. Correntes resultantes da correção de linha de base dos voltamogramas.

As diferenças de I_p , observadas com as SAMs dos tiois puros e com a monocamada mista, são atribuídas a presença de domínios ricos em 3amp formando um conjunto de ultramicroeletrodos na superfície da SAM mista. Esses domínios, além de formarem sítios que permitam transferência eletrônica entre analito e superfície metálica, oferecem um microambiente químico com propriedades diferentes de uma SAM contendo o componente puro devido as interações com o 11amu. Como resultado o fisetin não se adsorve na superfície do eletrodo e apresenta contribuições no transporte de massa por difusão hemisférica semi-infinita possibilitando respostas de corrente mais expressivas que as monocamadas dos tiois puros.

5. CONCLUSÃO

O estudo do processo redox para o par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ demonstrou que monocamadas auto-organizadas de tióis saturados podem permitir a transferência eletrônica, entre a espécie eletroativa e a superfície metálica, por efeito de tunelamento quântico dos elétrons através da cadeia carbônica do tiol. Embora o argumento mais utilizado na literatura para esses sistemas seja a transferência eletrônica via *pinholes* ou defeitos da monocamada, os resultados obtidos para a SAM mista, bem como para a SAM-3amp e SAM-11amu, não podem ser explicados por essa teoria.

Para a SAM mista constatou-se a formação de domínios ricos em 3amp, domínios ricos em 11amu e regiões entre esses domínios compostos por uma mistura de ambos os tióis que varia sua composição com o tempo de incubação do substrato. O deslocamento dos E_p , observados com a voltametria cíclica, aliado as R_{tc} obtidas com a EIE comprovam a existência de regiões recobertas pelo 3amp que oferecem resistência intermediária a transferência eletrônica do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ entre as SAM-3amp e SAM-11amu.

As cargas de dessorção redutiva e Δm obtidas com a MECQ para a SAM mista evidenciaram alto recobrimento da superfície e um mecanismo de adsorção que pode ou não resultar na segregação de fases de acordo com o tempo de incubação do substrato. Em breves tempos de incubação observou-se um recobrimento da superfície predominantemente com 3amp e formação de fases bem definidas. Ao aumentar este período para 20 horas de incubação do substrato, acredita-se que a SAM mista adquira uma configuração com domínios de 3amp dispersos tal como um conjunto de ultramicroeletrodos, formadas por ilhas de 3amp circundadas por 11amu. Todavia, ao aumentar ainda mais o tempo de incubação, observou-se uma tendência à formação de uma mistura homogênea dos tióis fazendo com que a SAM mista mostrasse comportamento eletroquímico semelhante a SAM-11amu.

O estudo do comportamento eletroquímico do fisetin confirma o surgimento de propriedades diferenciadas com a SAM mista. Enquanto para a SAM-3amp e para o ouro limpo observou-se um mecanismo redox envolvendo dois processos de oxi-redução seguido de adsorção do fisetin na superfície do eletrodo, para a SAM mista observou-se apenas um processo redox sem que o analito permanecesse adsorvido na superfície da SAM. Este comportamento foi atribuído a configuração dos domínios ricos em 3amp, os quais devem apresentar dimensões tão reduzidas que impedem que o fisetin alcance o requerimento estérico necessário para se rearranjar e sofrer uma nova oxiredução. Dessa forma a modificação da superfície com ambos os tiois permite maior tempo de vida útil para o sensor.

Com este trabalho evidenciou-se tanto a transferência eletrônica via efeito de tunelamento quântico dos elétrons através da monocamada, quanto o surgimento de propriedades físico-químicas diferenciadas com a SAM mista. A configuração obtida com a SAM mista apresentou potencial para aplicação na determinação de fisetin, uma vez que observou-se um limite de detecção de $1,67 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para o analito em água, um valor 3 ordens de grandeza menor que o obtido com técnicas eletroforéticas.

Este trabalho demonstra ainda, que a formação e organização de monocamadas mistas por co-adsorção dos tiois precursores em solução é dinâmica e pode ser controlada a fim de se obter um arranjo superficial específico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHITESIDES, G.M.; KRIEBEL, J.K.; LOVE, J.C. Molecular engineering of surfaces using self-assembled monolayers. **Science Progress**, v. 88, n. 1, p. 17-48, 2005.
2. MANDLER, D.; TURYAN, I. Applications of self-assembled monolayers in electroanalytical chemistry. **Electroanalysis**, v. 8, n. 3, p. 207-213, 1996.
3. RICKERT, J.; WEISS, T.; GÖPEL, W. Self-assembled monolayers for chemical sensors: molecular recognition by immobilized supramolecular structures. **Sensor and Actuators**, v. 31, p. 45-50, 1996.
4. CHAKI, N.K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 17, p. 1-12, 2002.
5. LOVE, J. C.; ESTROFF, L. A.; KRIEBEL, J. K.; NUZZO, R. G.; WHITESIDES, G. M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 4, p. 1013-1170, 2005.
6. LIN, Y-C.; YU, B-Y.; LIN, W-C.; LEE, S-H.; KUO, C-H.; SHYUE, J-J. Tailoring the surface potential of gold with self-assembled monolayers with mixed functional groups. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 340, p. 126-130, 2009.
7. MURRAY, C.B.; KAGAN, C.R.; BAWENDI, M.G. Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and closed-packed nanocrystal assemblies. **Annual Reviews of Material Science**, v. 30, p. 545-610, 2000.
8. SMITH, R.K.; LEWIS, P.A.; WEISS, P.S. Patterning self-assembled monolayers. **Progress in Surface Science**, v. 75, p. 1-68, 2004.
9. FREIRE, R.S.; PESSOA, C.A.; KUBOTA, L. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003.
10. ZASADZINSKI, J.A.; VISWABATHAN, R.; MADSEN, L.; GARNAES, L.; SCHWARTZ, D.K. Langmuir-Blodgett films. **Science**, v. 263, p. 1726-1733, 1994.
11. RIUL JR., A.; DOS SANTOS JR., D.S.; WOHNATH, K.; DI TOMMAZO, R.; CARVALHO, A.C.P.L.F.; FONSECA, F.J.; OLIVEIRA JR., O.N.; TAYLOR, D.M.; MATTOSO, L.H.C. Artificial taste sensor: efficient combination of sensors made from Langmuir-Blodgett films of conducting polymers and a ruthenium complex and self-assembled films of an azobenzene-containing polymer. **Langmuir**, v. 18, n. 1, p. 239-245, 2002.

12. LINDHOLM-SETHSON, B. Electrochemistry at ultrathin organic films at planar gold electrodes. **Langmuir**, v. 12, n. 13, p. 3305-3314, 1996.
13. SANO, M.; KAMINO, A.; OKAMURA, J.; SHINKAI, S. Self-organization of PEO-graft-Single-Walled Carbon Nanotubes in solutions and Langmuir-Blodgett films. **Langmuir**, v. 17, n. 17, p. 5125-5128, 2001.
14. NUZZO, R.G.; ALLARA, D.L. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, n. 105, p. 4481-4483, 1983.
15. BAIN, C.D.; TROUGHTON, E.B.; TAO, Y-T.; EVALL, J.; WHITESIDES, G.M.; NUZZO, R.G. Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 111, n. 1, p. 321-335, 1989.
16. POIRIER, G. E. Mechanism of formation of Au vacancy islands in alkanethiol monolayers on Au(111). **Langmuir**, v. 13, n. 7, p. 2019-2026, 1997.
17. BAIN, C.D.; WHITESIDES, G.M. Molecular-level control over surface order in self-assembled monolayer films of thiol on gold. **Science**, v. 240, n. 4848, p. 62-63, 1988.
18. DAKKOURI, A.S.; EDELSTEIN-SHIMA, R.; MANDLER, D. Scanning tunneling microscopy study of l-cysteine on Au(111). **Langmuir**, v. 12, n. 11, p. 2849-2852, 1996.
19. VERICAT, C.; VELA, M.E.; BENITEZ, G.; CARRO, P.; SALVAREZZA, R.C. Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. **Chemical Society Reviews**, v. 39, p. 1805-1834, 2010.
20. ULMAN, A.; EVANS, S. D.; SHNIDMAN, Y.; SHARMA, R.; EILERS, J. E.. Mixed alkanethiol monolayers on gold surfaces: wetting and stability studies.. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 39, p. 175-224, 1992.
21. SCHNEIDER, T.W.; BUTTRY, D.A. Electrochemical Quartz Crystal Microbalance studies of adsorption and desorption of self-assembled monolayers of alkyl thiols on gold. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 115, n. 26, p. 12391-12397, 1993.
22. SUMI, T.; UOSAKI, K. Electrochemical oxidative formation and reductive desorption of a self-assembled monolayer of decanethiol on a Au(111) surface in KOH ethanol solution. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 20, p. 6422-6428, 2004.
23. BERCHMANS, S.; NIRMAL, R.G.; PRABAHARAN, G.; MISHRA, A.K.; YEGNARAMAN, V. Solution phase electron transfer versus bridge mediated electron transfer across carboxylic acid terminated thiols. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 10, p. 439-446, 2006.

24. MENDES, R.K.; FREIRE, R.S.; FONSECA, C.P.; NEVES, S.; KUBOTA, L.T. Characterization of self-assembled thiols monolayers on gold surface by electrochemical impedance spectroscopy. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 15, n. 6, p. 849-855, 2004.
25. ADAMCZYK, L.A.; ANDERSON, M.R. Impedance differences found with n-alkanethiol monolayers prepared by contact printing and solution adsorption. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 336, p. 761-765, 2009.
26. GONELLA, G.; TERRENI, S.; CVETKO, D.; COSSARO, A.; MATTERA, L.; CAVALLERI, O.; ROLANDI, R.; MORGANTE, A.; FLOREANO, L.; CANEPA, M. Ultrahigh Vacuum Deposition of L-Cysteine on Au(110) studied by high-resolution X-ray photoemission: from early stages of adsorption to molecular organization. **Journal Physical Chemistry B**, v. 109, n. 38, p. 18003-18009, 2005.
27. GORHAM, J.; SMITH, B.; FAIRBROTHER, D.H. Modification of alkanethiolate self-assembled monolayers by atomic hydrogen: influence of alkyl chain length. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 1, p. 374-382, 2007.
28. XU, S.; CRUCHON-DUPEYRAT, S.J.N.; GARNO, J.C.; LIU, G-Y.; JENNINGS, G.K.; YONG, T-H.; LAIBINIS, P.E. In situ studies of thiol self-assembly on gold from solution using at force microscopy. **Journal of Chemical Physics**, v. 108, n. 12, p. 5002-5012, 1998.
29. WITTSTOCK, G.; SCHUHMANN, W. Formation and imaging of microscopic enzymatically active spots on an alkanethiolate-covered gold electrode by scanning electrochemical microscopy. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 24, p. 5059-5066, 1997.
30. ULMAN, A. Self-assembled monolayers of alkyltrichlorosilanes: Building blocks for future organic materials. **Advanced Materials**, v. 2, n. 12, p. 573-582, 1990.
31. ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1533-1554, 1996.
32. O'DWYER, C.; GAY, G.; VIARIS DE LESEGNO, B.; WEINER, J. The nature of alkanethiol self-assembled monolayer adsorption on sputtered gold substrates. **Langmuir**, v. 20, n. 19, p. 8172-8182, 2004.
33. ARAKAWA, T.; HOBARA, D.; YAMAMOTO M.; KAKIUCHI, T. Effect of the state of gold substrates on the surface composition of two-component alkanethiol self-assembled monolayers. **Electrochemistry Communications**, v. 7, p. 848-852, 2005.
34. SHIMAZU, K.; SATO, Y.; YAGI, I.; UOSAKI, K. Packing state and stability of self-assembled monolayers of 11-ferrocenyl-1-undecanethiol on platinum electrodes. **Bulletin of Chemical Society of Japan**, v. 67, n. 3, p. 863-865, 1994.

35. BRYANT, M.A.; PEMBERTON, J.E. Surface Raman scattering of self-assembled monolayers formed from 1-alkanethiols at silver [electrodes]. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, n. 10, p. 3630-3637, 1991.
36. LAIBINIS, P.E.; WHITESIDES, G.M.; ALLARA, D.L.; TAO, Y.-T.; PARIKH, A.N.; NUZZO, R.G. Comparison of the structures and wetting properties of self-assembled monolayers of n-alkanethiols on the coinage metal surfaces, copper, silver, and gold. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, n. 19, p. 7152-7167, 1991.
37. NOËL, S.; HOUZÉ, F.; BOYER, L.; MEKHALIF, Z.; DELHALLE, J.; CAUDANO, R. Self-assembled monolayers of alkanethiols on nickel surfaces for low level electrical contact applications. **Transactions on Components and Packaging Technology**, v. 22, n. 1, p. 79-84, 1999.
38. KATABY, G.; PROZOROV, T.; KOLTYPIN, YU.; COHEN, H.; SUKENIK, C.N.; ULMAN, A.; GEDANKEN, A. Self-assembled monolayer coatings on amorphous iron and iron oxide nanoparticles: thermal stability and chemical reactivity studies. **Langmuir**, v. 13, n. 23, p. 6151-6158, 1997.
39. LOVE, J.C.; WOLFE, D.B.; CHABINYC, M.L.; PAUL, K.E.; WHITESIDES, G.M. Self-assembled monolayers of alkanethiolates on palladium are good etch resists. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 8, p. 1576-1577, 2002.
40. ARIAS, Z.G.; ÁLVAREZ, J.L.M.; FONSECA, J.M.L. Formation and electrochemical characterization of 6-thioguanosine monolayers on the mercury surface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 300, p. 60-68, 2006.
41. CARVALHAL, R. F. **Desenvolvimento de sensor biomimético empregando monocamadas auto-organizadas de tióis sobre eletrodo de ouro**. 2005. 98 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2005.
42. BIEBUYCK, H.A.; WHITESIDES, G.M. Interchange between monolayers on gold formed from unsymmetrical disulfides and solutions of thiols: evidence for sulfur-sulfur bond cleavage by gold metal. **Langmuir**, v. 9, n. 7, p. 1766-1770, 1993.
43. GOODING, J. J.; MEARNS, F.; YANG, W.; LIU, J. Self-assembled monolayers into the 21st century: recent advances and applications. **Electroanalysis**, v. 15, n. 2, p. 81-93, 2003.
44. GARCÍA-RAYA, D.; MADUEÑO, R.; SEVILLA, J.M.; BLÁQUEZ, M.; PINEDA, T. Electrochemical characterization of a 1,8-octanedithiol self-assembled monolayer (ODT-SAM) on a Au(111) single crystal electrode. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 8026-8033, 2008.

45. DIAO, P.; GUO, M.; TONG, R. Characterization of defects in the formation process of self-assembled thiol monolayers by electrochemical impedance spectroscopy. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 495, p. 98-105, 2001.
46. LI, S-S.; XU, L-P.; WAN, L-J.; WANG, L-J.; JIANG, L. Time-dependent organization and wettability of decanethiol self-assembled monolayer on Au(111) investigated with STM. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 4, p. 1794-1799, 2006.
47. KAWASAKI, M.; SATO, T.; TANAKA, T.; TAKAO, K. Rapid self-assembled of alkanethiol monolayers on sputter-grown Au(111). **Langmuir**, v. 16, n. 4, p. 1719-1728, 2000.
48. YANG, G.; LIU, G-Y. New insights for self-assembled monolayers of organothiols on Au(111) revealed by Scanning Tunneling Microscopy. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 34, p. 8746-8759, 2003.
49. GIZ, M.J.; DUONG, B.; TAO, N.J. In situ STM study of self-assembled mercaptopropionic acid monolayers for electrochemical detection of dopamine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 465, p. 72-79, 1999.
50. POIRIER, G.E. Coverage-dependent phases and phases stability of decanethiol on Au(111). **Langmuir**, v. 15, n. 4, p. 1167-1175, 1999.
51. POIRIER, G.E.; PYLANT, E.D. The self-assembly mechanism of alkanethiols on Au(111). **Science**, v. 272, n. 5265, p. 1145-1148, 1996.
52. AOKI, K. Theory of phase separation of binary self-assembled films. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 513, p. 1-7, 2001.
53. BAIN, C.D.; WHITESIDES, G.M. Formation of Monolayers by the Coadsorption of Thiols on Gold: Variation in the Length of the Alkyl Chain. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 18, p. 7164-7175, 1989.
54. WARING, C.; BAGOT, P.A.J.; BEBBINGTON, M.W.P.; RÄISÄNEN, M.T.; BUCK, M.; COSTEN, M.L.; MCKENDRICK, K.G. How penetrable are thioalkyl self-assembled monolayers?. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 1, p. 1917-1921, 2010.
55. SHAO, X.; LUO, X.; HU, X.; WU, K. Chain-length effects on molecular conformation in and chirality of self-assembled monolayers of alkoxyated benzo[c]cinnoline derivatives on highly oriented pyrolytic graphite. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 31, p. 15393-15402, 2006.
56. EVANS, S.D.; SHARMA, R.; ULMAN, A. Contact angle stability: reorganization of monolayer surfaces?. **Langmuir**, v. 7, n. 1, p. 156-161, 1991.

57. FREDERIKSEN, T.; MUNUERA, C.; OCAL, C.; BRANDBYGE, M. PAULSSON, M.; SANCHEZ-PORTAL, D.; ARNAU, A. Exploring the tilt-angle dependence of electron tunneling across molecular junctions of self-assembled alkanethiols. **ACS Nano**, v. 3, n. 8, p. 2073-2080, 2009.
58. MÜLLER-MESKAMP, L.; KARTHÄUSER, S.; WASER, R.; HOMBERGER, M.; WANG, Y.; ENGLERT, U.; SIMON, U. Structural ordering of w-ferrocenylalkanethiol monolayers on Au(111) studied by Scanning Tunneling Microscopy. **Surface Science**, v. 603, p. 716-722, 2009.
59. BREWER, N.J.; BEAKE, B.D.; LEGGETT, G.J. Friction force microscopy of self-assembled monolayers: Influence of adsorbate alkyl chain length, terminal group chemistry, and scan velocity. **Langmuir**, v. 17, n. 6, p. 1970-1974, 2001.
60. KELLEY, A.T.; NGUNJIRI, J.N.; SEREM, W.K.; LAWRENCE, S.O.; YU, J.-J.; CROWE, W.E.; GARNO, J.C. Applying AFM-based nanofabrication for measuring the thickness of nanopatterns: the role of head groups in the vertical self-assembly of w-functionalized n-alkanethiols. **Langmuir**, v. 26, n. 5, p. 3040-3049, 2010.
61. IMABAYASHI, S.-I.; IIDA, M.; HOBARA, D.; FENG, Z.Q.; NIKI, K.; KAKIUCHI, T. Reductive desorption of carboxylic-acid-terminated alkanethiol monolayers from Au(111) surfaces. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 428, p. 33-38, 1997.
62. UMEDA, K.-I.; FUKUI, K.-I. Observation of redox-state-dependent reversible local structural change of ferrocenyl-terminated molecular island by electrochemical frequency modulation AFM. **Langmuir**, v. 26, n. 11, p. 9104-9110, 2010.
63. SANDERS, W.; VARGAS, R.; ANDERSON, M.R. Characterization of carboxylic acid-terminated self-assembled monolayers by electrochemical impedance spectroscopy and scanning electrochemical microscopy. **Langmuir**, v. 24, n. 12, p. 6133-6139, 2008.
64. LIU, Y.-F.; YANG, Y.-C.; LEE, Y.-L. Assembly behavior and monolayer characteristics of OH-terminated alkanethiol on Au(111): in situ scanning tunneling microscopy and electrochemical studies. **Nanotechnology**, v. 19, p. 1-9, 2008.
65. MRKSICH, M.; WHITESIDES, G.M. Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 25, p. 55-78, 1996.
66. VALÉRIO, E.; ABRANTES, L.M.; VIANA, A.S. 4-aminothiophenol self-assembled monolayer for the development of a DNA biosensor Aiming the detection of cylindrospermopsin producing cyanobacteria. **Electroanalysis**, v. 20, n. 22, p. 2467-2474, 2008.

67. KAKIUCHI, T.; IIDA, M.; IMABAYASHI, S-I.; NIKI, K. Double-layer-capacitance titration of self-assembled monolayers of w-functinalized alkanethiols on Au(111) surface. **Langmuir**, v. 16, n. 12, p. 5397-5401, 2000.
68. RAOOF, J.B.; KIANI, A.; OJANI, R. Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid and dopamine at the surface of electrodes modified with self-assembled gold nanoparticle films. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 14, p. 1171-1176, 2010.
69. THEBAULT, P.; DE GIVENCHY, E.T.; LEVY, R.; VANDENBERGHE, Y.; GUITTARD, F.; GÉRIBALDI, S. Contact-active microbicidal gold surfaces using immobilization of quaternary ammonium thiol derivatives. **European journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 4227-4234, 2009.
70. BAIN, C.D.; EVALL, J.; WHITESIDES, G.M. Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the head group, tail group, and solvent. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 18, p. 7155-7164, 1989.
71. SMITH, R.K.; REED, S.M.; LEWIS, P.A.; MONNEL, J.D.; CLEGG, R.S.; KELLY, K.F.; BUMM, L.A.; HUTCHISON, J.E.; WEISS, P.S. Phase Separation within a binary self-assembled monolayer on Au(111) driven by an amide-containing alkanethiol. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 6, p. 1119-1122, 2001.
72. FOLKERS, J.P.; LAIBINIS, P.E.; WHITESIDES, G.M. Self-assembled monolayers of alkanethiols on gold: comparisons of monolayers containing mixtures of short- and long-chain constituents with CH₃ and CH₂OH terminal groups. **Langmuir**, v. 8, n. 5, p. 1330-1341, 1992.
73. LEWIS, P.A.; SMITH, R.K.; KELLY, K.F.; BUMM, L.A.; REED, S.M.; CLEGG, R.S.; GUNDERSON, J.D.; HUTCHISON, J.E.; WEISS, P.S. The role of buried hydrogen bonds in self-assembled mixed composition thiols on Au(111). **Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 43, p. 10630-10636, 2001.
74. FRASCONI, M.; D'ANNIBALE, A.; FAVERO, G.; MAZZEI, F.; SANTUCCI, R.; FERRI, T. Ferrocenyl alkanethiols-thio B-cyclodextrin mixed self-assembled monolayers: evidence of ferrocene electron shuttling through the B-cyclodextrin cavity. **Langmuir**, v. 25, n. 22, p. 12937-12944, 2009.
75. FONTAINE, O.; TRIPPÉ, G.; FAVE, C.; LACROIX, J.-C.; RANDRIAMAHAZAKA, H.N. Microstructured electroactive surface based on binary self-assembled monolayer. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 632, p. 1-7, 2009.
76. HOBARA, D.; SASAKI, T.; IMABAYASHI, S-I.; KAKIUCHI, T. Surface structure of binary self-assembled monolayers formed by electrochemical selective replacement of adsorbed thiols. **Langmuir**, v. 15, n. 15, p. 5073-5078, 1999.

77. SHIMAZU, K.; KAWAGUCHI, T.; ISOMURA, T. Construction of mixed mercaptopropionic acid/alkanethiol monolayers of controlled composition by structural control of a gold substrate with underpotentially deposited lead atoms. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 124, n. 4, p. 652-661, 2002.
78. DONTEN, M.L.; KRÓLIKOWSKA, A.; BUKOWSKA, J. Structure and composition of binary monolayers self-assembled from sodium 2-mercaptoethanesulfonate and mercaptoundecanol mixed solutions on silver and gold supports. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, p. 3390-3400, 2009.
79. KAKIUCHI, T.; IIDA, M.; GON, N.; HOBARA, D.; IMABAYASHI, S-I.; NIKI, K. Miscibility of adsorbed 1-undecanethiol and 11-mercaptoundecanoic acid species in binary self-assembled monolayers on Au(111). **Langmuir**, v. 17, n. 5, p. 1599-1603, 2001.
80. PHONG, P.H.; TOMONO, H.; NISHI, N.; YAMAMOTO, M.; KAKIUCHI, T. Artificially phase-separated binary self-assembled monolayers composed of 11-amino-1-undecanethiolate and 10-carboxy-1-decanethiolate on Au(111): A comparative study of two preparing methods. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 4900-4906, 2008.
81. OYAMATSU, D.; KANEMOTO, H.; KUWABATA, S.; YONEYAMA, H. Nanopore preparation in self-assembled monolayers of alkanethiols with use of the selective desorption technique assisted by underpotential deposition of silver and copper. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 497, p. 97-105, 2001.
82. ŠTULÍK, K.; AMATORE, C.; HOLUB, K.; MAREČEK, V.; KUTNER, W. Microelectrodes. Definitions, characterization and applications. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v. 72, n. 8, p. 1483-1492, 2000.
83. CORREIA, A.N.; MASCARO, L.H.; MACHADO, S.A.S.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A. Ultramicroeletrodos. Parte I: revisão teórica e perspectivas. **Química Nova**, v. 18, n. 5, p. 475-480, 1995.
84. COOPER, J. B.; BOND, A. M.; OLDHAM, K. B.. Microelectrode studies without supporting electrolyte: Model and experimental comparison for singly and multiply charged ions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 331, p. 877-895, 1992.
85. SILVA, S.M.; ALVES, C.R.; CORREIA, A.N.; MARTINS, R.M.; NOBRE, A.L.R.; MACHADO, S.A.S.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A. Ultramicroeletrodos. Parte II: construção e aplicações. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 78-85, 1998.
86. GOODING, J.J.; HIBBERT, D.B. The application of alkanethiol self-assembled monolayers to enzyme electrodes. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 8, p. 525-533, 1999.

87. GOODING, J. J.; EROKHIN, P.; LOSIC, D.; YANG, W.; POLICARPIO, V.; LIU, J.; HO, F. M.; SITUMORANG, M.; HIBBERT, D. B.; SHAPTER, J. G. Parameters important in fabricating enzyme electrodes using self-assembled monolayers of alkanethiols. **Analytical Sciences**, v. 17, n. 1, p. 3-10, 2001.
88. KUBOTA, L. T.; FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003.
89. WEISS, T.; SCHIERBAUM, K. D.; GÖPEL, W.; THODEN VAN VELZEN, U.; REINHOUDT, D. N.. Self-assembled monolayers of supramolecular compounds for chemical sensors. **Sensors and actuators. B, Chemical**, v. 26, n. 3, p. 203-207, 1995.
90. BOOZER, C. L.; YU, Q.; CHEN, S.; LEE, C. Y.; HOMOLA, J.; YEE, S. S.; JIANG, S. Surface functionalization for self-referencing surface plasmon resonance (SPR) biosensors by multi-step self-assembly. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 90, n. 1, p. 22-30, 2003.
91. WINK, T.; VAN ZUILEN, S. J.; BULT, A.; VAN BENNEKOM, W. P. Self-assembled monolayers for biosensors. **The Analyst**, v. 122, p. 43R-50R, 1997.
92. MALEM, F.; MANDLER, D.. Self-assembled monolayers in electroanalytical chemistry: application of ω -mercapto carboxylic acid monolayers for the electrochemical detection of dopamine in the presence of a high concentration of ascorbic acid. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 1, p. 37-41, 1993.
93. RAJ, C. R.; OHSAKA, T. Electroanalysis of ascorbate and dopamine at a gold electrode modified with a positively charged self-assembled monolayer. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 496, p. 44-49, 2001.
94. ZHANG, X.; WANG, S. Voltammetric behavior of noradrenaline at 2-mercaptoethanol self-assembled monolayer modified gold electrode and its analytical application. **Sensors**, v. 3, p. 61-68, 2003.
95. WAN, Q.; YANG, N.; YE, Y. Electrochemical behavior of thiamine on a self-assembled gold electrode and its square-wave voltammetric determination in pharmaceutical preparations. **Analytical Sciences**, v. 18, p. 413-416, 2002.
96. CLARK, R.A.; BOWDEN, E.F. Voltammetric peak broadening for cytochrome c/ alkanethiolate monolayer structures: dispersion of formal potentials. **Langmuir**, v. 13, n. 3, p. 559-565, 1997.
97. BRIAND, E.; HUMBLLOT, V.; PRADIER, C-M.; KASEMO, B.; SVEDHEM, S. An OEGylated thiol monolayer for the tethering of liposomes and the study of liposome interactions. **Talanta**, v. 81, p. 1153-1161, 2010.

98. LIU, Z.; SHEN, Z.; ZHU, T.; HOU, S.; YING, L. Organizing Single-Walled Carbon Nanotubes on gold using a wet chemical self-assembling technique. **Langmuir**, v. 16, n. 8, p. 3569-3573, 2000.
99. RAHMAN, M.M.; UMAR, A.; SAWADA, K. Development of self-assembled monolayers of Single-Walled Carbon Nanotubes assisted cysteamine on gold electrodes. **Advanced Science Letters**, v. 2, n. 1, p. 28-34, 2009.
100. GUISEPPI-ELIE, A.; RAHMAN, A.R.A.; SHUKLA, N.K. SAM-modified microdisc electrode arrays (MDEAs) with functionalized carbon nanotubes. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 4247-4255, 2010.
101. PARK, B-W.; KIM, D-S.; YOON, D-Y.. Surface modification of gold electrode with gold nanoparticles and mixed self-assembled monolayers for enzyme biosensors. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 64-70, 2011.
102. HUMBLLOT, V.; YALA, J-F.; THEBAULT, P.; BOUKERMA, K.; HÉQUET, A.; BERJEAUD, J-M.; PRADIER, C-M. The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers. **Biomaterials**, v. 30, p. 3503-3512, 2009.
103. SCHREIBER, F. Structure and growth of self-assembling monolayers. **Progress in Surface Science**, v. 65, p. 151-256, 2000.
104. VARELA, H.; MALTA, M.; TORRESI, R.M. Técnicas in situ e baixo custo em eletroquímica: a microbalança a cristal de quartzo. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 664-679, 2000.
105. DAMOS, F.S.; MENDES, R.K.; KUBOTA, L.T. Aplicação de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 970-979, 2004.
106. SMITH, A. The Quartz Crystal microbalance. In: GALLANGHER, P. K.; BROWN, M. E. (Ed.). **Handbook of thermal analysis and calorimetry: recent advances, techniques and applications**. Amsterdam: Elsevier, 2008. v. 5, p. 133-159.
107. CABRAL, M. F. **Estudos Voltamétricos e microgravimétricos da deposição em subtensão de cádmio e chumbo sobre filmes finos de selênio**. 2008. 155 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos. 2008.
108. KARPOVICH, D.S.; BLANCHARD, G.J. Direct measurement of the adsorption kinetics of alkanethiols self-assembled monolayers on a microcrystalline gold surface. **Langmuir**, v. 10, n. 9, p. 3315-3322, 1994.

109. KIM, H.J.; KWAK, S.; KIM, Y.S.; SEO, B.I.; KIM, E.R., LEE, H. Adsorption kinetics of alkanethiols studied by quartz crystal microbalance. **Thin Solid Films**, v. 327-329, p. 191-194, 1998.
110. SATO, Y.; MIZUTANI, F. Determination of real composition of 3-mercaptopropionic acid and 1-octadecanethiol mixed self-assembled monolayers by using electrochemical and Electrochemical Quartz Crystal Microbalance measurements. **Electroanalysis**, v. 10, n. 9, p. 633-637, 1998.
111. KAWAGUCHI, T.; YASUDA, H.; SHIMAZU, K. Electrochemical Quartz Crystal Microbalance investigation of the reductive desorption of self-assembled monolayers of alkanethiols and mercaptoalcanoic acids on Au. **Langmuir**, v. 16, n. 25, p. 9830-9840, 2000.
112. NIJVELDT, R.J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D.E.C.; BOELENS, P.G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Society for Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418-425, 2001.
113. GUZZO, M.R.; UEMI, M.; DONATE, P.M.; NIKOLAOU, S.; MACHADO, A.E.H.; OKANO, L.T. Study of the complexation of fisetin with cyclodextrins. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 110, n. 36, p. 10545-10551, 2006.
114. JIMÉNEZ, M.; ESCRIBANO-CEBRIÁN, J.; GARCÍA-CARMONA, F. Oxidation of the flavonol fisetin by polyphenol oxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1425, p. 534-542, 1998.
115. JOVANOVIĆ, S.V.; STEENKEN, S.; TOSIĆ, M.; MARJANOVIĆ, B.; SIMIĆ, M. Flavonoids as antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 11, p. 4846-4851, 1994.
116. TOREL, J.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. **Phytochemistry**, v. 25, n. 2, p. 383-385, 1986.
117. VAN ACKER, S.A.B.E.; VAN DEN BERG, D.-J.; TROMP, M.N.J.L.; GRIFFIOEN, D.H.; VAN BENNEKOM, W.P.; VAN DER VIJGH, W.J.F.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.
118. BRONDANI, D.; VIEIRA, I.C.; PIOVEZAN, C.; DA SILVA, J.M.R.; NEVES, A.; DUPONT, J.; SCHEEREN, C.W. Sensor for fisetin based on gold nanoparticles in ionic liquid and binuclear nickel complex immobilized in silica. **Analyst**, v. 135, p. 1015-1022, 2010.

119. MAHER, P. A comparison of the neurotrophic activities of the flavonoid fisetin and some of its derivatives. **Free Radical Research**, v. 40, n. 10, p. 1105-1111, 2006.
120. SPENCER, J.P.E.; VAUZOUR, D.; RENDEIRO, C. Flavonoids and cognition: The molecular mechanisms underlying their behavioural effects. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 492, p. 1-9, 2009.
121. SPENCER, J.P.E. Flavonoids and brain health: multiple effects underpinned by common mechanisms. **Genes and Nutrition**, v. 4, p. 243-250, 2009.
122. PARK, H.-H.; LEE, S.; OH, J.-M.; LEE, M.-S.; YOON, K.-H.; PARK, B.H.; KIM, J.W.; SONG, H.; KIM, S.-H. Anti-inflammatory activity of fisetin in human mast cells (HMC-1). **Pharmacological Research**, v. 55, p. 31-37, 2007.
123. MARKOVIC, Z.S.; MENTUS, S.V.; MARKOVIC, J.M.D. Electrochemical and density functional theory study on the reactivity of fisetin and its radicals: implications on in vitro antioxidant activity. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 113, n. 51, p. 14170-14179, 2009.
124. JIANG, L.; FANG, G.; ZHANG, Y.; CAO, G.; WANG, S. Analysis of flavonoids in propolis and Ginkgo biloba by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 24, p. 11571-11577, 2008.
125. HERRERO-MARTÍNEZ, J.; SANMARTIN, M.; ROSÉS, M.; BOSCH, E.; RÀFOLS, C. Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 26, p. 1886-1895, 2005.
126. VOLIKAKIS, G.J.; EFSTATHIOU, C.E. Determination of rutin and other flavonoids by flow-injection: adsorptive stripping voltammetry using nujol-graphite and diphenylether-graphite paste electrodes. **Talanta**, v. 51, p. 775-785, 2000.
127. MOCCELLINI, S.K.; FERNANDES, S.C.; CAMARGO, T.P.; NEVES, A.; VIEIRA, I.C. Self-assembled monolayer of nickel(II) complex and thiol on gold electrode for the determination of catechin. **Talanta**, v. 78, p. 1063-1068, 2009.
128. TKAC, J.; DAVIS, J.J. An optimised electrode pre-treatment for SAM formation on polycrystalline gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 621, p. 117-120, 2008.
129. ANGERSTEIN-KOZLOWSKA, H.; CONWAY, B.E.; HAMELIN, A.; STOICOVICIU, L. Elementary steps of electrochemical oxidation of single-crystal planes of Au-I. Chemical basis of processes involving geometry of anions and the electrode surfaces. **Electrochimica Acta**, v. 31, n. 8, p. 1051-1061, 1986.
130. RAND, D.A.J.; WOODS, R. The nature of adsorbed oxygen on rhodium, palladium and gold electrodes. **Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 31, p. 29-38, 1971.

131. TRASATTI, S.; PETRII, O.A. Real surface area measurements in electrochemistry. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 5, p. 711-734, 1991.
132. BRUCKENSTEIN, S.; SHAY, M. An in situ weighing study of the mechanism for the formation of the adsorbed oxygen monolayer at a gold electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 188, n. 1-2, p. 131-136, 1985.
133. BARD A.J., FAULKNER L.R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2. ed. New York: John Wiley, 2001. 850 p.
134. ZHAO, J.; LUO, L.; YANG, X.; WANG, E.; DONG, S. Determination of surface pKa of SAM using an electrochemical titration method. **Electroanalysis**, v. 11, n. 15, p. 1108-1111, 1999.
135. CAMPUZANO, S.; PEDRERO, M.; MONTEMAYOR, C.; FATÁS, E.; PINGARRÓN, J.M. Characterization of alkanethiol-self-assembled monolayers-modified gold electrodes by electrochemical impedance spectroscopy. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 586, p. 112-121, 2006.
136. KAKIUCHI, T.; SATO, K.; IIDA, M.; HOBARA, D.; IMABAYASHI, S.-I.; NIKI, K. Phase separation of alkanethiol self-assembled monolayers during the replacement of adsorbed thiolates on Au(111) with thiols in solution. **Langmuir**, v. 16, n. 18, p. 7238-7244, 2000.
137. BAUR, J.E., WIGHTMAN, R.M. Diffusion coefficients determined with microelectrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 305, p. 73-81, 1991.
138. SABATANI, E.; RUBINSTEIN, I.; MAOZ, R.; SAGIV, J. Organized self-assembling monolayers on electrodes. Part I. Octadecyl derivatives on gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 219, p. 365-371, 1987.
139. LAVACCHI, A.; BARDI, U.; BORRI, C.; CAPORALI, S.; FOSSATI, A.; PERISSI, I. Cyclic voltammetry simulation at microelectrode arrays with COMSOL multiphysics. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 39, p. 2159-2163, 2009.
140. UCHIDA, H.; HIEI, M.; WATANABE, M. Electrochemical quartz crystal microbalance study of copper adatoms on Au(111) electrodes in solutions of perchloric and sulfuric acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 452, p. 97-106, 1998.
141. ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. Porto Alegre: Bookman, 2001. v. 1, 1097 p.

142. SANTOS, M.C.; MIWA, D.W.; MACHADO, S.A.S. Study of anion adsorption on polycrystalline Pt by electrochemical quartz crystal microbalance. **Electrochemistry Communications**, v. 2, p. 692-696, 2000.
143. AMATORE, C.; SAVÉANT, J.M.; TESSIER, D. Charge transfer at partially blocked surfaces: A model for the case of microscopic active and inactive sites. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 147, p. 39-51, 1983.
144. HOBARA, D.; MIYAKE, K.; IMABAYASHI, S.-I.; NIKI, K.; KAKIUCHI, T. *In situ* Scanning Tunneling Microscopy imaging of the reductive desorption process of alkanethiols on Au(111). **Langmuir**, v. 14, n. 13, p. 3590-3596, 1998.
145. HOBARA, D.; KAKIUCHI, T. Domain structure of binary self-assembled monolayers composed of 3-mercapto-1-propanol and 1-tetradecanethiol on Au(111) prepared by coadsorption. **Electrochemistry Communications**, v. 3, p. 154-157, 2001.
146. GOLABI, S.M.; IRANNEJAD, L. Preparation and electrochemical study of fisetin modified glassy carbon electrode. Application to the determination of NADH and ascorbic acid. **Electroanalysis**, v. 17, n. 11, p. 985-996, 2005.
147. COMMITTEE, A. M. Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit. **Analyst**, v. 112, n. 2, p. 199-204, 1987.