
3º - CAPÍTULO: RESULTADOS e DISCUSSÃO

3 – Resultados e Discussão

3.1 - Estudo de Dependência do pH na Formação do Filme

3.1.1 - Comportamento Eletroquímico de Ácido 4-HFA

Voltametria cíclica em solução aquosa contendo o par redox $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ou ácido perclórico foi realizada para verificar as condições do eletrodo e para identificar as superfícies reprodutivas. A diferença de $\Delta E \leq 100 \text{ mV}$ entre os picos de oxidação e redução em solução do par redox $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ foi considerada adequada para a eletrodeposição do filme polimérico.

Os voltamogramas cíclicos da oxidação do monômero ácido 4-HFA em diferentes valores de pH na faixa de potencial de -0,7 V a +1,2V são mostrados na Figura 23. As primeiras varreduras apresentaram ondas de oxidação irreversíveis, características de compostos fenólicos.

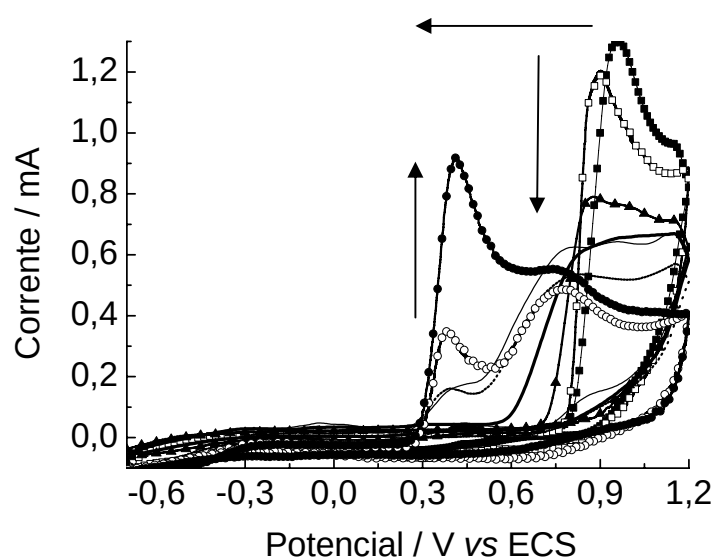


Figura 23 - Primeiros voltamogramas cíclicos de eletrodo de grafite em solução de ácido (4-HFA) ($1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) em meio de HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} . Valores de pH: (■) 0, (□) 1, (▲) 2, (—) 4, (---) 7, (—) 8, (○) 10 e (●) 12. As setas indicam deslocamento de potencial ou aumento/diminuição nos valores de corrente.

A Figura 24 mostra a distribuição das espécies em função do pH e pKa da solução monomérica [185].

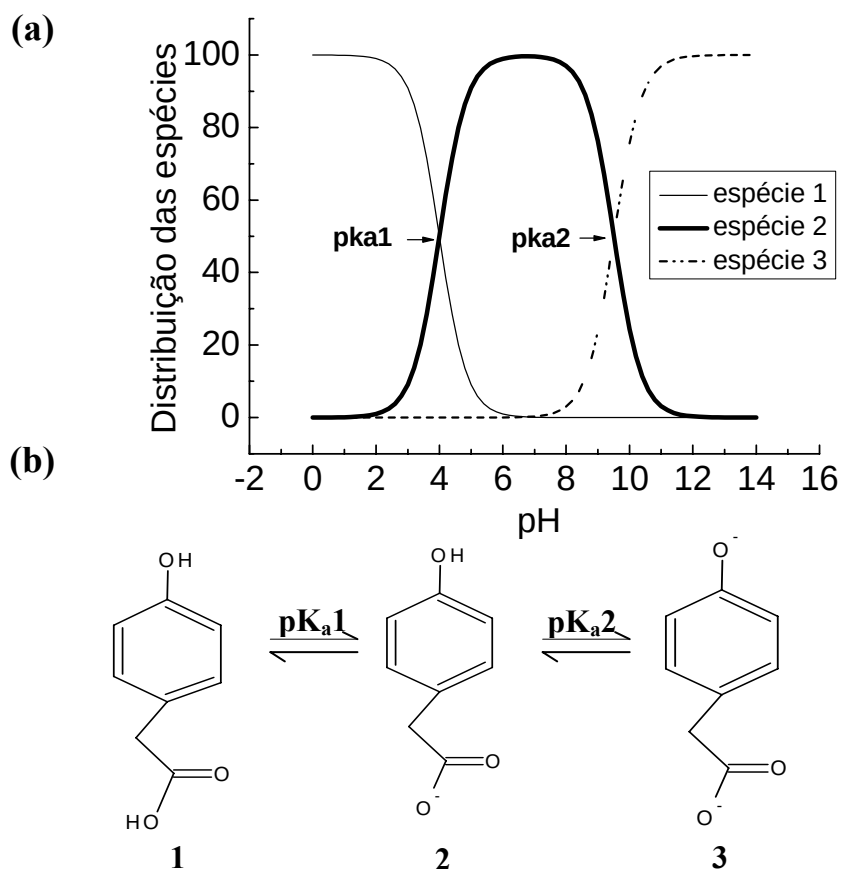


Figura 24 – (a) Distribuição das estruturas de acordo com o pH. **(b)** Equilíbrio presente na solução do monômero de acordo com os valores de pKa [187].

Com o aumento do pH ocorre deslocamento do potencial de oxidação para valores mais catódicos (Figura 23), sendo que, em valores de pH básicos, aparecem dois picos de oxidação. Estes comportamentos podem ser explicados através da distribuição das estruturas em função dos valores de pH (Figura 24a), indicados no pKa1 (pH 4,0) e pKa2 (pH 9,5).

Como mostra a Figura 24b, com o aumento do pH ocorre desprotonação do grupo carboxila e depois desprotonação do fenol, formando o fenóxido. A presença da carga negativa no oxigênio aumenta a ressonância no anel aromático facilitando a formação do cátion-radical e o início da polimerização. Isto explica a mudança brusca nos valores de potencial de oxidação do monômero, a partir de pH 8 (Figura 25), deslocando-se para menores potenciais.

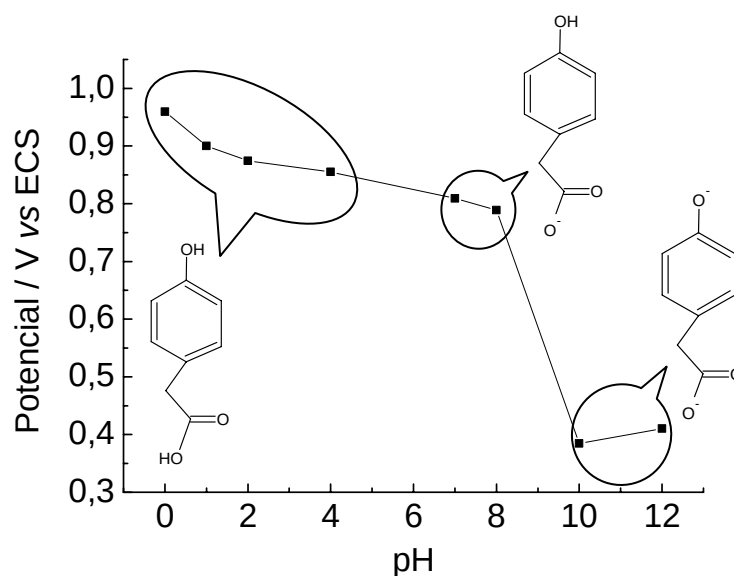


Figura 25 - Dependência do potencial com o valor de pH para poli(4-HFA). As estruturas indicadas ao lado são as predominantes, no respectivo pH.

Também se observa diminuição nos valores de corrente com o aumento dos valores de pH, correspondentes à oxidação das estruturas 1 e 2 e aumento nos valores de corrente para a estrutura 3 (Figuras 23 e 24). A Figura 24 mostra que, com o aumento do pH, ocorre diminuição da concentração da estrutura 1, que é predominante até pK_{a1} . Após este, há um aumento da estrutura 2 e diminuição da estrutura 1, até pH 7,0. Acima deste pH, ocorre aumento da concentração da estrutura 3 e diminuição da estrutura 2. Acima do pH correspondente ao pK_{a2} (9,5) a estrutura 3 é predominante.

Esses comportamentos das diferentes estruturas presentes em solução de acordo com o pH estão em concordância com os espectros de absorvância, apresentados a seguir.

3.1.2 - Estudo da Espectroscopia de Ultravioleta (UV)

A Figura 26 mostra o espectro UV para o monômero 4-HFA nos diferentes valores de pH (0,3; 8,0 e 12,0). Os valores de comprimento de onda estão na Tabela 2.

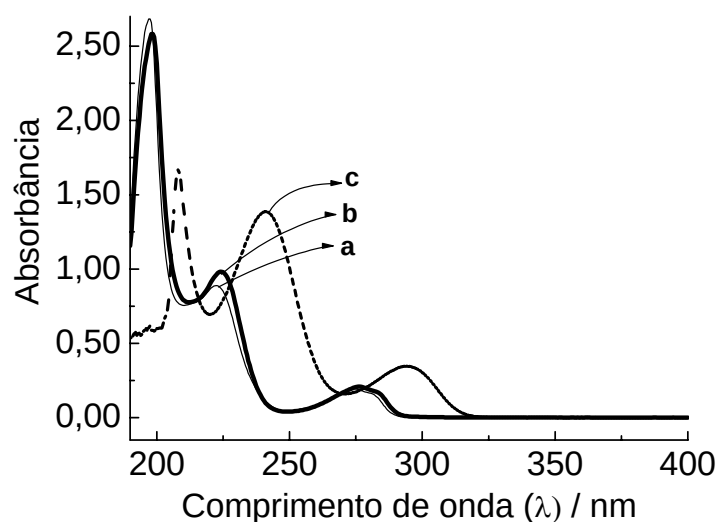


Figura 26 - Espectro de UV de 4-HFA em valores de pH (a) 0,3; (b) 8,0; (c) 12,0.

Tabela 2: Valores de comprimento de onda em diferentes valores de pH de 4-HFA.

pH	Comprimento de onda ($\lambda_{\text{máx}}$)			Estrutura (Figura 25b)
	(nm)			
0,3	197,5	222,5	275,0	I
8,0	198,5	224,0	276,5	II
12,0	208,0	241,0	294,5	III

A presença do cromóforo anel benzeno e dos grupos auxocromos OH/O^- e $\text{CH}_3\text{COOH/CH}_3\text{COO}^-$ diretamente ligados ao anel alteram o comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ e a intensidade da absorção como mostrado na Tabela 2. O primeiro $\lambda_{\text{máx}}$ é característico de compostos aromáticos. Entre o pH 0,3 e 8,0 não foi observada uma mudança significativa nos valores $\lambda_{\text{máx}}$, pois a desprotonação da carboxila não causa uma mudança direta na conjugação do anel aromático. Ao se aumentar o pH, observou-se um deslocamento batocrômico e hiperocrômico, que pode ser explicado pela desprotonação do grupo fenol, deixando a estrutura com maior extensão de conjugação. Comparando-se os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ do fenol, que absorve em 210,5 e 270,0 nm [186], com os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ obtidos (Tabela 2), conclui-se que o 4-HFA em valores de pH básicos produz estruturas mais reativas, por isso os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ são maiores.

3.1.3 – Eletropolimerização de Poli (4-HFA) em Diferentes Valores de pH

A eletropolimerização de poli(4-HFA) foi conduzida por meio de sucessivas varreduras de potencial (Figura 27). Foram feitas eletropolimerizações nos valores de pH de 0,0-12,0.

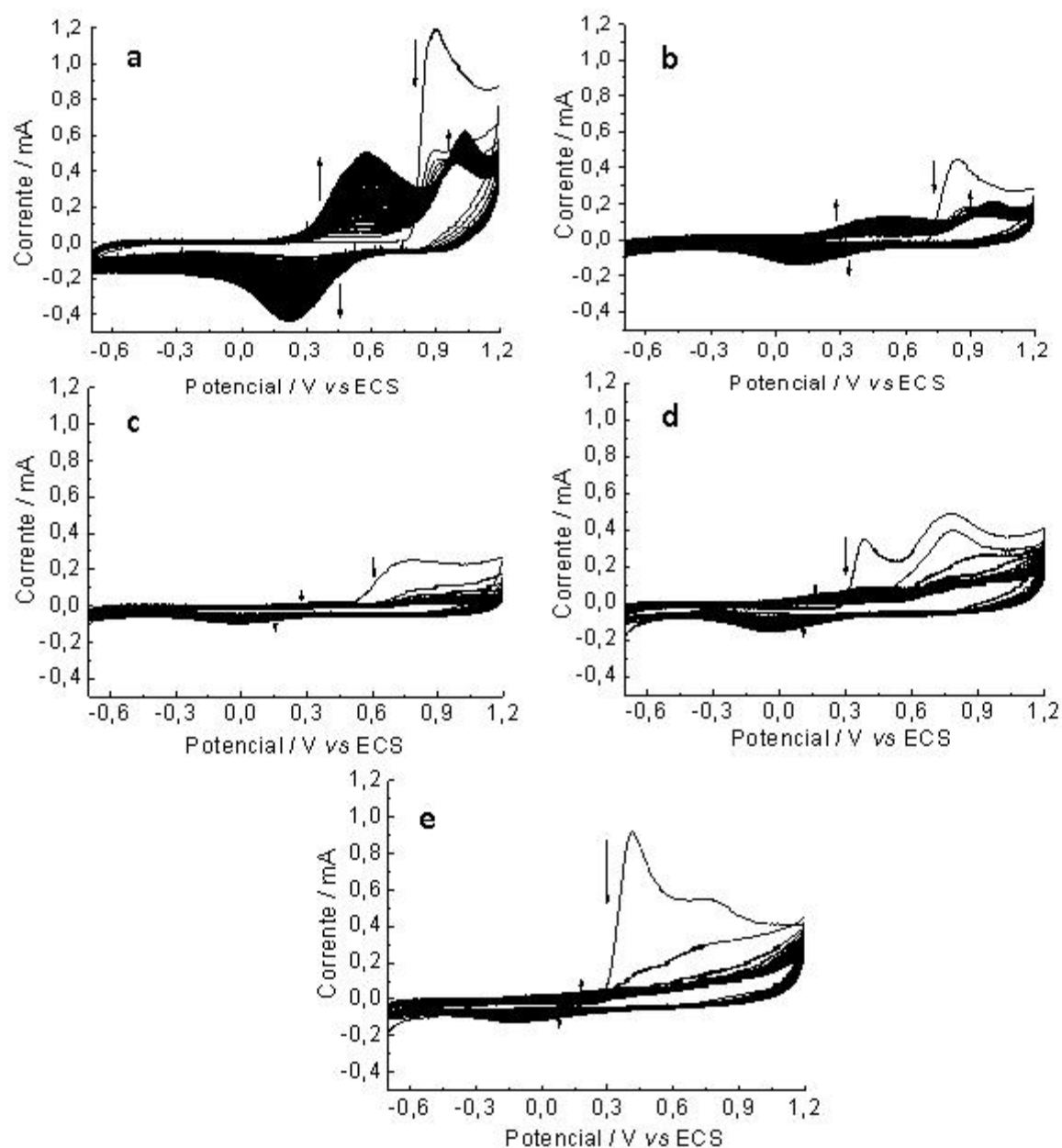


Figura 27 - Voltamogramas cíclicos (100 ciclos) de eletrodo de grafite em solução de 4-HFA $1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em solução aquosa de HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. (a) pH 0,3; (b) 2,0; (c) 7,0; (d) 10,0; (e) 12,0 à 50 mV s^{-1} . As setas indicam o efeito do aumento do número de ciclos nos valores de corrente.

Observou-se que a formação do filme polimérico em valores de pH ácidos (Figuras 27 **a** e **b**) ocorre em potenciais mais anódicos e em valores de pH básicos (Figura 27 **d** e **e**) ocorre em potenciais mais catódicos, o que evidencia uma maior facilidade de oxidação em pH básico. A diferença de potencial entre as ondas de oxidação/redução do eletrodo modificado com poli (4-HFA) aumenta e a corrente de oxidação/redução diminui com o aumento do pH, o que sugere que em valores de pH básicos ocorre uma diminuição na transferência de elétrons entre a superfície modificada com o filme poli (4-HFA) e a solução adjacente ao eletrodo.

Pode-se observar a formação dos filmes nas superfícies dos eletrodos de grafite em diferentes valores de pH. Nos valores de pH 0 e 1, o sinal de corrente é maior. A partir de pH 2, os valores de corrente são próximos (Figura 28), ou seja, não foi observada mudança na eletroatividade do eletrodo modificado com o aumento do numero de varreduras de potencial e com o aumento do pH.

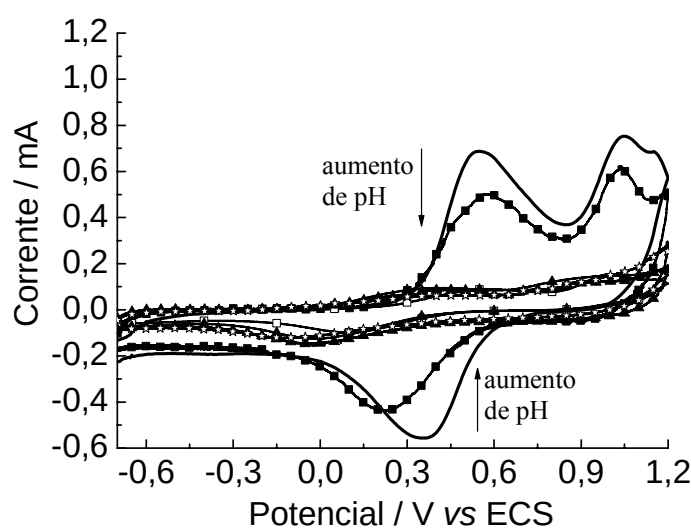


Figura 28 – Voltamogramas cíclicos de eletrodo de grafite modificado com poli(4-HFA) em HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 7,0; 8,0; 10,0; 12,0; 50 mV s^{-1} , 100 varreduras. As setas indicam diminuição nos valores de corrente com aumento dos valores de pH.

Avaliando-se as superfícies dos eletrodos modificados (preparados em diferentes pH) em solução contendo o par redox $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Figura 29), observou-se que os eletrodos modificados com filmes eletropolimerizados em solução de 4-HFA, pH 0 e 1, aumentaram a transferência de elétrons para o par redox, com

redução da reversibilidade. A partir do pH 2 ocorreu diminuição na transferência de elétrons frente ao par redox. Este comportamento revela que em pH básico há uma passivação da superfície.

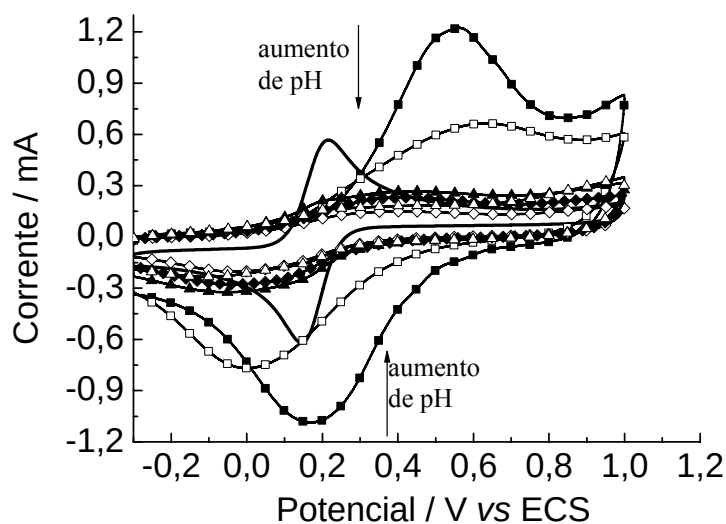


Figura 29 - Voltametria cíclica do eletrodo de grafite modificado com poli(4-HFA), preparado nos valores de pH: 0,0, 1,0, 2,0, 4,0, 7,0, 8,0, 10,0 e 12,0, em solução de $K_3Fe(CN)_6 / K_4Fe(CN)_6$. As setas indicam diminuição nos valores de corrente e aumento dos valores de pH.

A topografia da superfície, analisada por microscopia eletrônica de varredura (Figura 30) mostra a formação de filme nos diferentes valores de pH estudados. As imagens de MEV, com várias ampliações, mostram que em valores de pH mais ácidos tem-se uma superfície homogênea, enquanto que as imagens obtidas em valores de pH mais básicos mostram uma cobertura da superfície do eletrodo com maior número de glóbulos distribuídos irregularmente pela superfície do eletrodo de grafite. Estes resultados sugerem que esta cobertura irregular globulosa dificulta transferência de elétrons causando a passivação do eletrodo modificado.

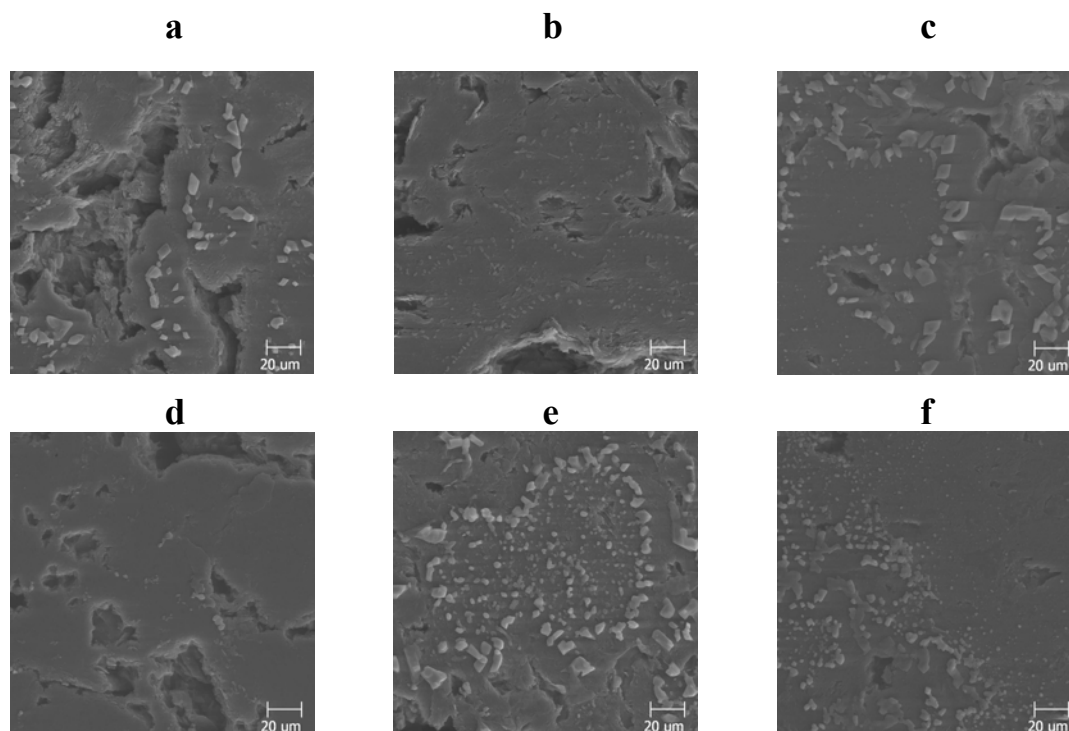


Figura 30 – Imagens de topografia da superfície por MEV dos eletrodos de grafite após a polimerização com HFA, 500x. pH (a) 0,0; (b) 1,0; (c) 2,0; (d) 7,0; (e) 10,0 e (f) 12,0.

3.2 – Estudos de Variação do Número de Varreduras para Eletrodeposição de Poli(4-HFA)

3.2.1 – Eletropolimerização e Propriedades de Poli(4-HFA)

A eletropolimerização de 4-HFA $1,5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ em meio de HClO₄ 0,5 mol L⁻¹, 200 varreduras, pH 0,3, foi realizada sobre eletrodo de grafite (Figura 31). Após o primeiro ciclo ocorre aumento gradual nos valores absolutos de corrente entre os valores de potencial de oxido/redução de +0,3V e 0,8V/+0,25V e +0,59V.

Em +1,05V, tem-se a oxidação de uma estrutura que tem o valor de corrente aumentado com o aumento do número de varreduras, comportamento parecido com a poli(tiramina) [57], cujo monômero possui uma estrutura similar ao monômero 4-HFA, mas com um grupo $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ em substituição ao grupo $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ligado ao anel aromático.

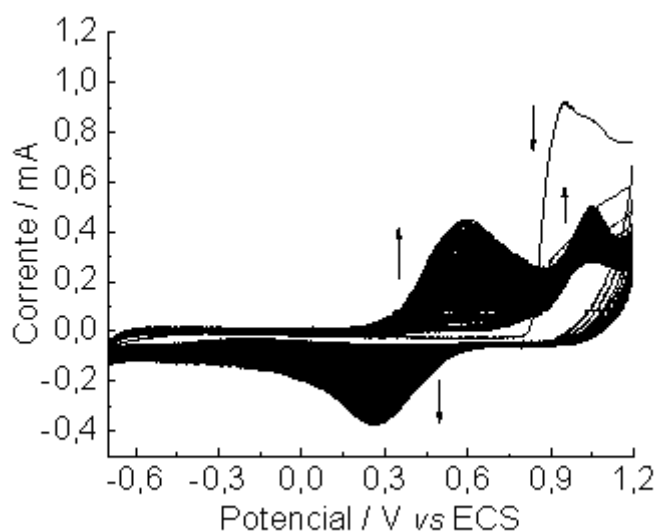


Figura 31 - Voltametria cíclica de eletrodo de grafite em solução aquosa de 4-HFA $1.5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em meio ácido de HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} , 200 varreduras.

O aparecimento de ondas de oxidação e redução em +0,86V, +1,02V e +0,33V, respectivamente, foram observadas na solução do eletrólito (Figura 32) mostrando o caráter eletroativo do filme, o que comprova a modificação da superfície do eletrodo de grafite pelo filme polimérico.

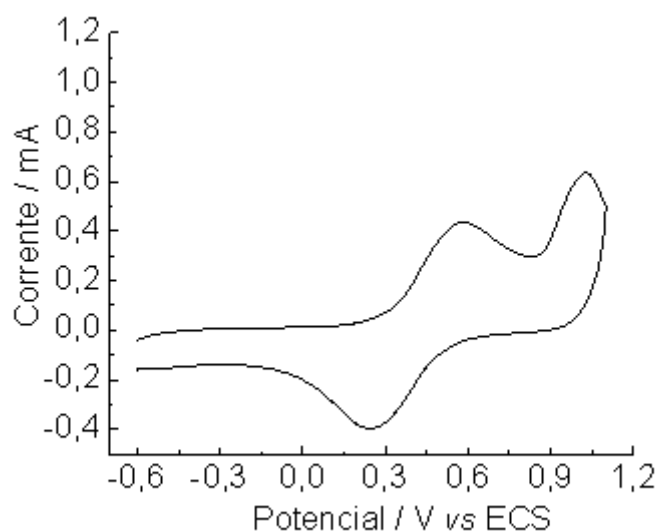


Figura 32 - Voltamograma cíclico de eletrodo de carbono grafite modificado com poli(4-HFA), 200 varreduras, em HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} .

A análise dos eletrodos modificados foi feita em solução contendo o par redox $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Figura 33). O voltamograma mostra que o eletrodo de grafite modificado pelo filme polimérico aumentou a transferência de elétrons na superfície do eletrodo.

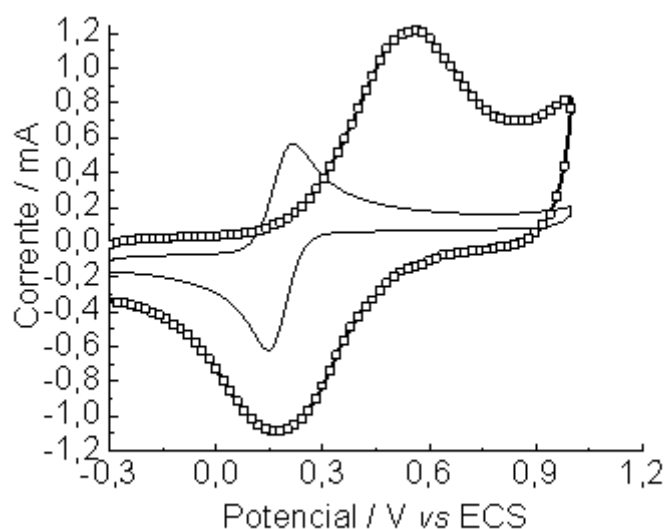


Figura 33 - Voltamograma cíclico de eletrodo de grafite (—) não-modificado e (□) modificado com poli (4-HFA) em $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mmol L^{-1})/ $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mmol L^{-1}) em 0.1 mol L^{-1} KNO_3 , 100 mV s^{-1} .

A eletrodeposição de poli (4-HFA), 100 varreduras sucessivas de potencial, e a caracterização em solução contendo o par redox $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ e em solução aquosa de ácido perclórico foram realizadas (Figura 34).

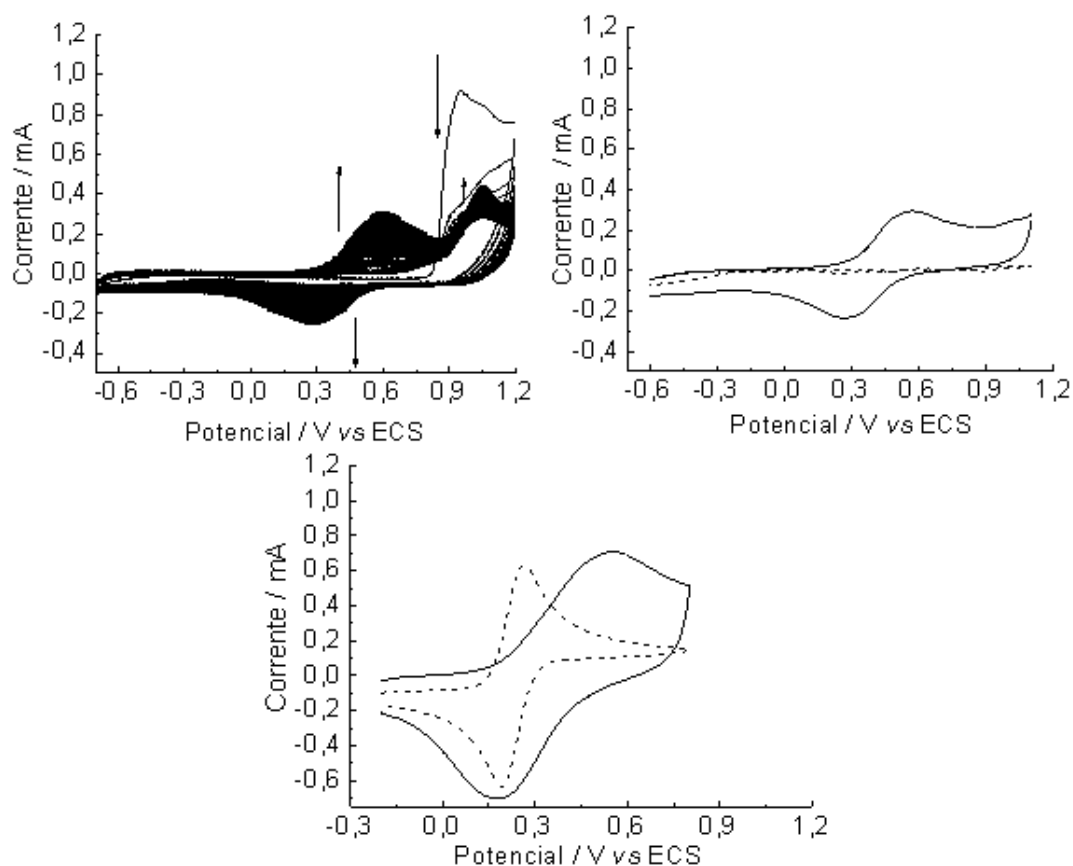


Figura 34 - Voltamogramas cíclicos para o eletrodo de grafite em (a) 4-HFA $1.5 \cdot 10^{-2}$ mol L⁻¹ em HClO₄ 0,5 mol L⁻¹, 100 Varreduras, 50 mV s⁻¹; (b) em solução aquosa de HClO₄ 0,5 mol L⁻¹, 50 mV s⁻¹, (c) solução aquosa de K₃Fe(CN)₆ (5 mmol L⁻¹)/K₄Fe(CN)₆ (5 mmol L⁻¹) em 0,1 mol L⁻¹ KNO₃, 100 mV s⁻¹. (---) não-modificado e (—) modificado com poli (4-HFA).

Comparando os voltamogramas dos filmes de 100 varreduras com filmes de 200 varreduras de potencial (Figura 35), observou-se que os potenciais de oxidação e redução de formação do filme são iguais, entretanto, o poli (4-HFA) eletrodepositado com 200 varreduras sucessivas de potencial apresentou uma maior eletroatividade e maior facilidade na transferência de elétrons frente ao par redox e maiores valores de corrente em ácido perclórico.

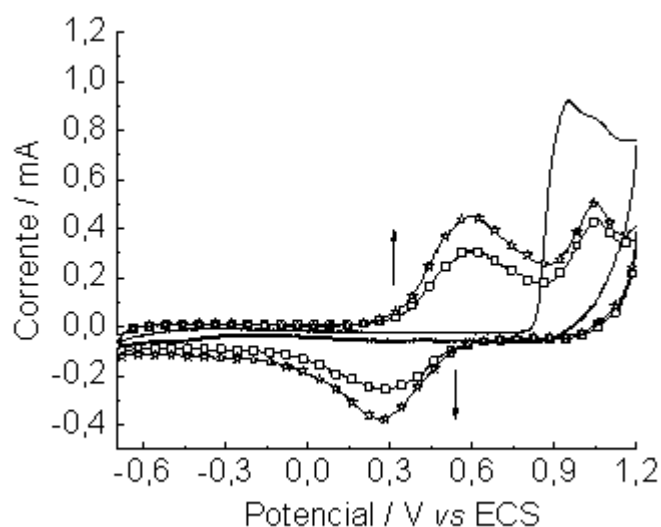


Figura 35 - Voltametria cíclica do poli(4-HFA), eletropolimerizado em diferentes números de varreduras: (□) 100 e (⊗) 200; em solução monomérica de 4-HFA $1,5 \cdot 10^{-2}$ mol L⁻¹ em HClO₄ 0.5 mol L⁻¹, 50mV s⁻¹. As setas indicam aumento de valores de corrente, com o aumento do número de varreduras.

Analisando as imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de poli (4-HFA) $1,5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ à 50mV s⁻¹ (Figura 36) observou-se a formação de estruturas globulares e com o aumento do número de varreduras a superfície se torna mais recoberta.

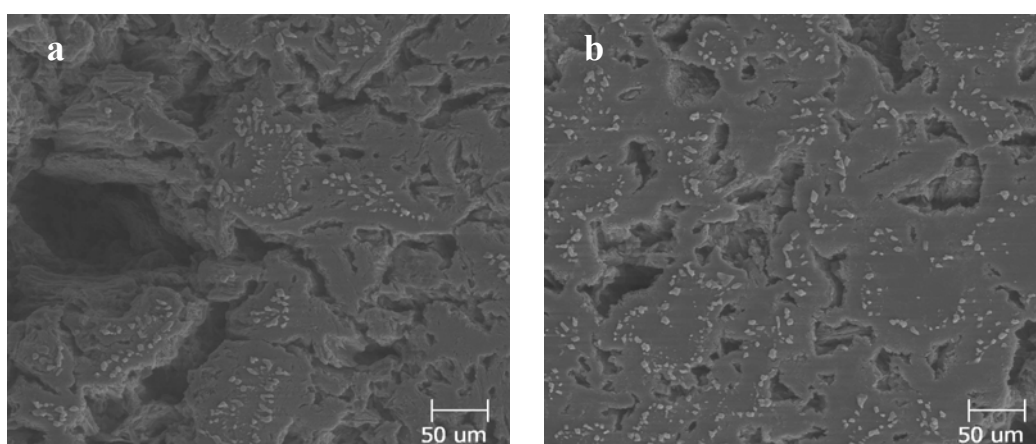


Figura 36 – Imagens de topografia da superfície por MEV dos eletrodos de grafite após a polimerização com poli (4-HFA) em meio ácido com ampliação de 200 x. (a) 100 varreduras e (b) 200 varreduras.

3.2.2 - Estudo de Espectroscopia de Impedância

A EIE é uma técnica de estado estável não-destrutiva e capaz de promover um fenômeno de relaxação dentro de uma larga faixa de frequência [187,188]. As medidas de impedância foram usadas para investigar o comportamento elétrico do filme poli(4-HFA) em solução de KCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Os filmes de poli(4-HFA) foram preparados variando-se o número de varreduras e concentração do monômero (100 e 200 varreduras e 4-HFA $1.5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ou $1.5 \cdot 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$). A Figura 37 mostra a resposta de impedância (diagramas de Nyquist) dos eletrodos de grafite modificados com poli(4-HFA). As medidas foram feitas no potencial de circuito aberto (OCP), enquanto a Figura 38 mostra o circuito equivalente usado para o ajuste dos dados experimentais. A letra n no circuito equivalente é função da condição de polimerização usada. Os valores numéricos para as resistências obtidas a partir dos gráficos podem ser vistos na Tabela 3.

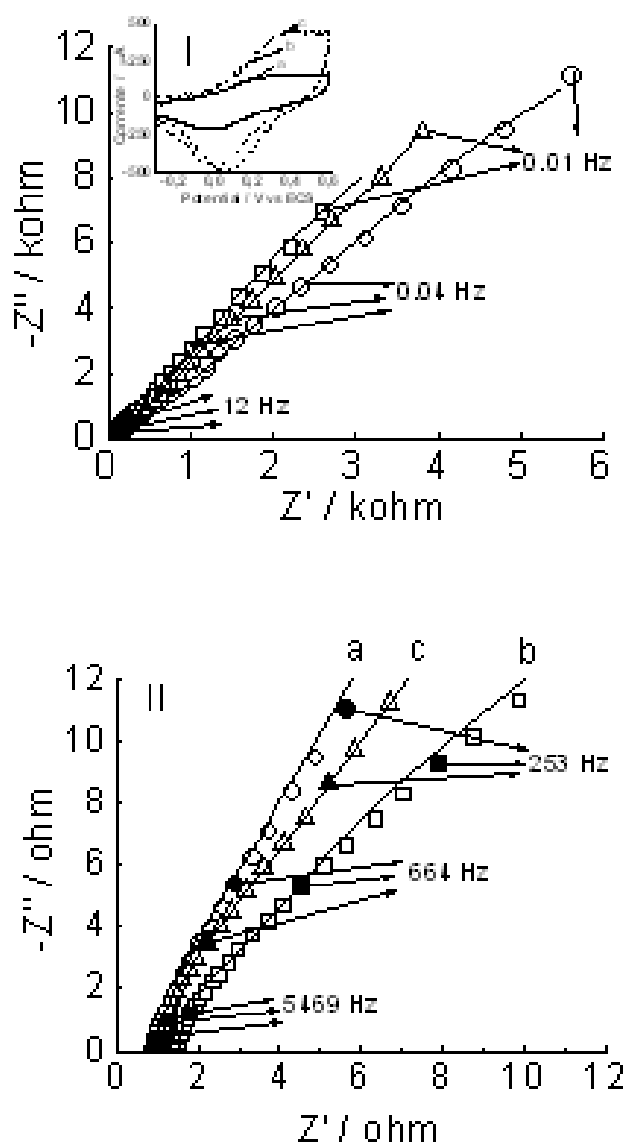


Figura 37 - (I) Diagrama de Nyquist ($-Z''$ vs. Z') em KCl 1.0 mol L^{-1} para eletrodo modificado com poli(4-HFA) usando: (O) 100 ciclos; ($\square$) 200 ciclos e (Δ) 200 ciclos, mas com a concentração do monômero 10x maior ($1.5 \cdot 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$). A linha contínua representa o ajuste usando o circuito equivalente mostrado na Figura 35, onde: $n=6$ para 100 e 200 ciclos; $n=5$ para 200 ciclos com a concentração do monômero $1.5 \cdot 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$. O gráfico inserido corresponde ao voltamograma cíclico de poli(4-HFA) em KCl 1.0 mol L^{-1} à 100 mV s^{-1} sendo (a) 100 ciclos; (b) 200 ciclos e (c) 200 ciclos com a concentração do monômero 10x maior. **(II)** Corresponde a ampliação dos voltamogramas cíclicos na baixa região de Z' .

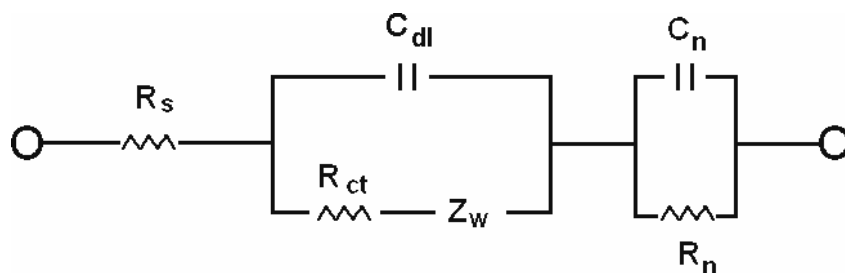


Figura 38 - Circuito equivalente usado para ajustar os dados de EIS.

A impedância é geralmente discutida em termos do circuito equivalente, Figura 38, que consiste de elementos que representam a resistência da solução frente ao eletrólito (R_s) e a capacitância da dupla camada (C_{dl}). Esta interface também é formada por impedância da difusão (Z_w), conhecida por impedância de Warburg e resistência à transferência de carga na superfície (R_{ct}) [189]. O n representa um valor entre 5 e 6 de acordo com a condição experimental.

A curva experimental mostra um semicírculo combinado com uma pequena reta com inclinação de 45° no domínio de altas frequências seguido por um comportamento complexo no domínio de baixas frequências sugerindo a existência de duas constantes de tempo, as quais foram confirmadas pelo diagrama de Bode. Os resultados sugerem que o sistema é controlado cineticamente em regiões de altas frequências e o processo de transferência de massa é controlado em regiões de baixas frequências [189].

Tabela 3: Valores do ajuste do circuito equivalente para o poli (4-HFA) preparado com (A) 100 ciclos (B) 200 ciclos e (C) 200 ciclos e concentração do monômero 10x maior.

	R_s	R_{ct}	C_{dl}	R_1	C_1	R_2	C_2	R_3	C_3	R_4	C_4	R_5	C_5	R_6	C_6
A	1,08	12,6	0,052	1,78	0,11	360	1,56	47800	2,10	676	5,64	133	34,6	4713	4,46
B	1,52	11,0	0,046	1,89	0,046	211	3,58	363	11,57	$2,45e+8$	26,7	$4,2e+7$	5,57	$1,24e+4$	2,90
C	0,92	3,32	0,058	1058	4,90	95	1,28	442	2,06	10,5	0,99	$4,29e+4$	1,58	---	---

R ($\Omega \text{ cm}^2$) and C (mF)

Os valores de R_s são de alguma forma mais altos para um eletrodo submerso em eletrólito forte sugerindo uma ligeira contribuição para a resistência do filme. Isso é uma conclusão razoável para um decréscimo na corrente observada para o potencial analisado nos voltamogramas cíclicos (veja Figura 37 I inserida), característicos da influência da resistência do sistema na corrente.

A combinação ($C_{dl}[R_{ct}W]$) sugere que acontece uma transferência de elétrons na superfície mais externa do eletrodo enquanto a combinação seguinte [R_nC_n] (Figura 38) sugere que a transferência de elétron também ocorra na superfície das regiões mais internas do filme. A C_{dl} pode ser tomada como a medida da superfície externa do polímero. Mudanças não significantes na atividade da área da superfície externa foram observadas em função das condições de preparação. A R_{ct} descreve a velocidade da transferência de elétrons, onde aumentos significativos (menores valores de R_{ct}) ocorrem somente quando a concentração usada do monômero é 10 vezes maior. Esse resultado sugere que o número de grupos oxidados e reduzidos por área de superfície foi aumentado, com o número de varreduras e com o aumento da concentração.

A combinação da sequência (R_nC_n) descreve a resposta da superfície mais interna combinando com a resposta do filme interno, e é função da condição de preparo. Para $n=1$ até $n=3$ a resposta é atribuída à oxidação e redução de grupos eletroativos localizados nas partes mais internas. Para $n > 3$ o valor extremamente alto de R_n suporta a combinação RC e descreve o comportamento elétrico do filme na região adjacente ao coletor de elétron. Para os filmes com 100 e 200 varreduras o n é 6 e para o filme com concentração 10 vezes maior $n=5$, o que explica os valores de resistência a transferência de carga do filme contidos na Tabela 3.

3.3 – Incorporações de Biomoléculas

3.3.1 - Estudo de Incorporação de Nucleotídeos sobre Eletrodos de Grafite sem Filme e Modificados com Poli(4-HFA)

Estudos [190-197] mostram que biomoléculas podem ser imobilizadas sobre eletrodos de carbono grafite. As bases nitrogenadas, adenosina monofosfato e guanosina monofosfato, sofrem oxidação quando imobilizadas sobre a superfície do eletrodo de grafite modificado com poli(4-HFA) preparado em meio ácido (Figura 39).

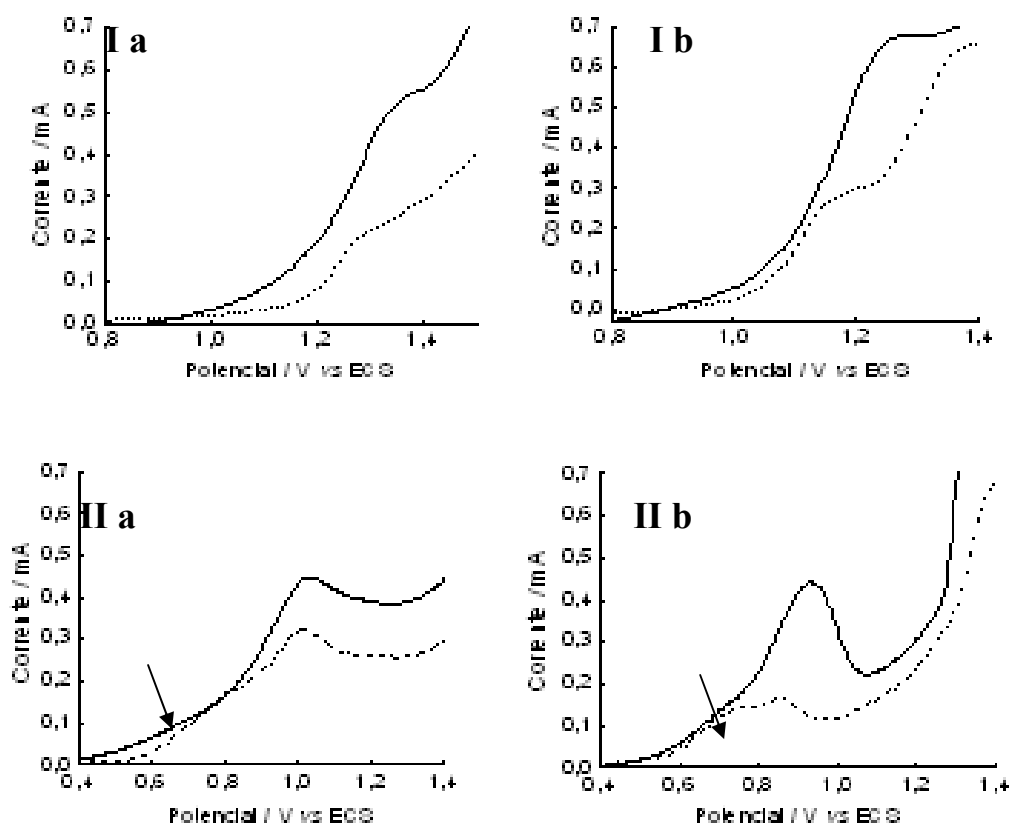


Figura 39 - Voltametrias de eletrodo, subtraídas de suas linhas de base, de grafite sem filme (---) ou modificado (—) com poli (4-HFA), 100 varreduras, contendo bases nitrogenadas imobilizadas. (I) AMP (II) GMP usando-se diferentes eletrólitos para a detecção. (a) tampão acetato, 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5 ou (b) tampão fosfato, 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4; 5 mV s⁻¹. As setas indicam oxidação de traços da base guanina.

Os nucleotídeos apresentaram picos de oxidação em +1,03 V e +1,25 V vs. ECS em tampão acetato para GMP e AMP, respectivamente. Para eletrodos cobertos com filme polimérico contendo as bases nitrogenadas imobilizadas, a magnitude do sinal de corrente aumentou ~2,0 vezes para AMP (Figura 40 I) e ~1,5 vezes para GMP (Figura 40 II) comparados com os eletrodos de grafite sem modificação. A corrente é um importante parâmetro para garantir a sensibilidade de sensores. Em adição, sobre a superfície dos eletrodos modificados com poli(4-HFA), os picos para AMP e GMP deslocaram para potenciais mais positivos de 80 mV e 25 mV, respectivamente. Valores de corrente e potencial de oxidação das bases nitrogenadas incorporadas sobre poli(4-HFA) são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4: Valores de corrente e potencial de oxidação das bases nitrogenadas incorporadas em eletrodo de grafite sem e com filme poli(4-HFA), analisados em solução de tampão acetato (pH 4,50) e de tampão fosfato (pH 7,50).

Parâmetros	Eletrodo de grafite				Eletrodo de grafite modificado com poli(4-HFA), 100 ciclos			
	AMP		GMP		AMP		GMP	
Corrente / mA	tampão acetato 0,21	tampão fosfato 0,26	tampão acetato 0,33	tampão fosfato 0,17	tampão acetato 0,51	tampão fosfato 0,63	tampão acetato 0,60	tampão fosfato 0,50
Potencial / V vs. ECS	1,29	1,15	1,01	0,86	1,34	1,23	1,03	0,93

Os valores apresentados na Tabela 4 mostram que a detecção é dependente do tampão utilizado na análise. A diferença dos potenciais de oxidação dos nucleotídeos pode ser explicada em termos das estruturas dos nucleotídeos (Figura 40). Em pH ácido, no caso do tampão acetato, as estruturas encontram-se protonadas o que dificulta a oxidação e aumenta o potencial de oxidação, já em pH quase neutro, tampão fosfato, elas não estão protonadas facilitando a oxidação diminuindo o potencial de detecção.

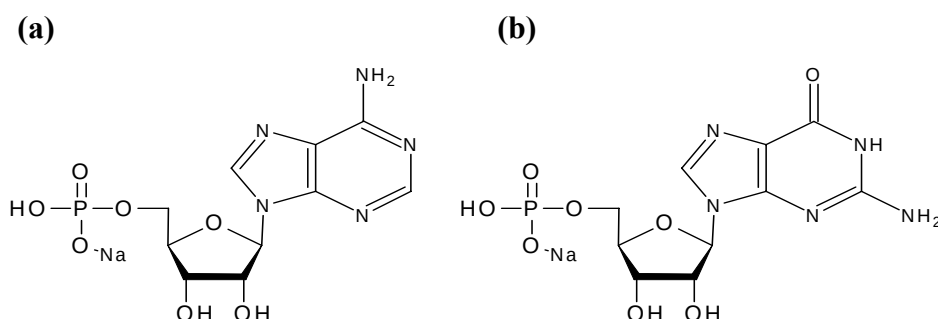


Figura 40 – Estruturas dos nucleotídeos (a) adenosina monofosfato e (b) guanosina monofosfato.

Na oxidação da GMP observou-se o aparecimento segundo pico em torno de +0,7 V representado pela seta na Figura 39, que refere-se a oxidação de traços da base guanina que pode estar presente na amostra [104,107].